

---

**Kerstin Boll**

---

Klonierung und Charakterisierung eines  
Phagenlysins und sein Einsatz zur  
diagnostischen Erkennung von  
*Bacillus anthracis*



**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

und

Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik  
der Universität Hohenheim  
Betreuer: PD Dr. habil. W. Beyer

**Klonierung und Charakterisierung eines  
Phagenlysins und sein Einsatz zur  
diagnostischen Erkennung von  
*Bacillus anthracis***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von  
**Kerstin Boll**  
Tierärztin aus Ludwigsburg

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. R. Bauerfeind  
PD Dr. habil. W. Beyer  
Prof. Dr. Dr. E. Usleber

Tag der Disputation: 20.03.2013

*Wenn der Praktiker denkt, er kann alles,  
das Ego meint, es weiß alles,  
und sich beide auf ihrem Titel ausruhen  
dann wird sie die Unwissenheit überschwemmen  
und begraben.*

**Karl-Heinz Pilz-Drewniak**

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**K. Boll, U. Hahn, R. Böhm, W. Beyer (2006):** Klonierung und Charakterisierung eines Phagenlysin und dessen Einsatz in der Diagnostik von *Bacillus anthracis*. Posterpräsentation, DVG-Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 15.-17.06.06, Wetzlar.

**K. Boll, O. Hartmann, U. K. Hahn, R. Böhm, W. Beyer (2007):** Recombinant  $\gamma$ -phage lysin as a substitute for the *Bacillus anthracis*  $\gamma$ -phage in anthrax diagnostics and as a potential therapeutic agent against anthrax infection in rodent infection models. Poster, The International Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*, 17.-21.06.07, Oslo, Norwegen.

**K. Boll, O. Hartmann, U. K. Hahn, R. Böhm, W. Beyer (2010):** Recombinant  $\gamma$ -phage lysin as a substitute for the *Bacillus anthracis*  $\gamma$ -phage in anthrax diagnostics. Posterpräsentation. Nationales Symposium für Zoonosenforschung, 07.-08.10.10, Berlin.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>3</b>
2.1	Der Milzbrand.....	3
2.1.1	Geschichte und Gegenwart.....	3
2.1.2	Eigenschaften von <i>B. anthracis</i> .....	6
2.1.3	Pathogenese und Klinik .....	8
2.1.4	Eng verwandte <i>Bacillus</i> -Spezies.....	12
2.2	Identifizierung von <i>Bacillus anthracis</i> .....	14
2.2.1	Mikrobiologische Methoden .....	14
2.2.2	Serologische Methoden .....	16
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	16
2.2.4	Sonstige Methoden .....	17
2.2.5	Zusammenfassung der Diagnostikmethoden.....	18
2.3	Therapie und Prophylaxe des Milzbrands .....	20
2.4	Bakteriophagen .....	21
2.4.1	Die Entdeckung der Phagen .....	21
2.4.2	Lysewirkung der Phagen.....	21
2.4.3	Bekannte Phagen und ihre Anwendung.....	22
2.4.4	Phagen von <i>B. anthracis</i> .....	23
2.5	Phagenlysine.....	26
2.5.1	Definition und Eigenschaften von Lysinen .....	26
2.5.2	Bekannte Phagenlysine in der Anwendung.....	28
2.5.3	<i>B. anthracis</i> -spezifische Phagenlysine.....	29
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.1	Material .....	31
3.1.1	Chemikalien, Puffer und Kits.....	31
3.1.2	Bakterienstämme .....	31
3.1.3	Bakteriophage.....	34
3.1.4	Plasmide und Vektoren.....	34
3.1.5	Antibiotika .....	36
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die Klonierung.....	37
3.2.2	Restriktionsspaltung von DNA .....	38
3.2.3	Ligation .....	38
3.2.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	38
3.2.5	Transformation.....	39
3.2.6	Präparation von Plasmid-DNA .....	39
3.2.7	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	39
3.2.8	Agarose-Gelelektrophorese .....	40
3.2.9	Herstellung rekombinanter Proteine.....	40
3.3	Proteinanalytische Methoden.....	42
3.3.1	Proteinaufreinigung.....	42

3.3.2	Methoden zum Umpuffern von Proteinlösungen .....	44
3.3.3	Methoden zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	45
3.3.4	SDS-PAGE .....	46
3.4	Endotoxinbestimmung und –entfernung.....	47
3.4.1	Endotoxinbestimmung .....	47
3.4.2	Entfernung des Endotoxins .....	47
3.5	Diagnostische Methoden.....	48
3.5.1	Varianten des $\gamma$ -Phagentests .....	48
3.5.2	Sporenfärbung .....	50
3.5.3	Nachweis der Kapselbildung.....	50
3.5.4	LightCycler-PCR .....	51
3.5.5	Bestimmung der Keimzahl .....	54
3.6	Anwendung des rPlyG.....	55
3.6.1	rPlyG-Lysetest mittels photometrischer Trübungsmessung von Flüssigkulturen.....	55
3.6.2	rPlyG-Aktivitätstest.....	56
3.6.3	Entwicklung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests.....	57
3.6.4	Wirkung des rPlyG auf bekapselte Isolate .....	60
3.6.5	Einsatz des rPlyG zur DNA-Präparation aus Bakterien .....	60
3.7	Untersuchung der Langzeitlagerung des rPlyG.....	62
3.7.1	Anwendung unterschiedlicher Lagerpuffer.....	62
3.7.2	Lagerung nach Lyophilisation .....	62
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>63</b>
4.1	Herstellung des rekombinanten PlyG .....	63
4.1.1	Klonierung des rPlyG in einen <i>E. coli</i> -Stamm .....	63
4.1.2	Expressionstest.....	64
4.1.3	Aufreinigung mittels FPLC .....	67
4.1.4	Entfernung von Endotoxin.....	70
4.2	Vorversuche zur Entwicklung eines diagnostischen rPlyG-Lysetests ..	70
4.2.1	Ermittlung der OD <sub>600</sub> -Abnahme zum Nachweis der Lyse.....	70
4.2.2	Optimierung der Lysebedingungen .....	71
4.2.2.1	Reaktionsmedium.....	72
4.2.2.2	pH-Wert.....	73
4.2.2.3	Temperatur.....	73
4.2.2.4	Wachstumsphase .....	74
4.2.2.5	Bakteriendichte.....	76
4.2.2.6	rPlyG-Konzentration .....	77
4.2.3	Zusätzliche Anwendung einer Polypropylenfolie.....	78
4.3	Prüfung der <i>Bacillus</i> -Isolate im turbidimetrischen rPlyG-Lysetest (Variante 2) .....	79
4.3.1	Ergebnisse der <i>Bacillus</i> spp. (nicht <i>B. anthracis</i> )-Isolate .....	79
4.3.2	Ergebnisse der <i>B. anthracis</i> -Isolate .....	81
4.4	Entwicklung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests .....	83
4.4.1	Optimierung einzelner Untersuchungsparameter.....	83
4.4.2	Endgültiges Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests .....	87
4.4.3	Definition des Grenzwertes .....	87



4.5	Prüfung der <i>Bacillus</i> spp.-Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest .	89
4.5.1	Ergebnisse der <i>B. anthracis</i> -Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest.....	89
4.5.2	Ergebnisse von Isolaten anderer <i>Bacillus</i> spp. im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest .....	93
4.6	Prüfung der <i>Bacillus</i> spp.-Isolate im $\gamma$ -Phagentest .....	98
4.6.1	Ergebnisse der <i>B. anthracis</i> -Isolate im $\gamma$ -Phagentest.....	98
4.6.2	Ergebnisse der anderen <i>Bacillus</i> spp.-Isolate im $\gamma$ -Phagentest .....	99
4.7	Vergleich der Ergebnisse der <i>Bacillus</i> spp.-Isolate in den angewendeten Testmethoden.....	99
4.7.1	Vergleich der Ergebnisse der <i>B. anthracis</i> -Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest und im $\gamma$ -Phagentest.....	99
4.7.2	Vergleich der Ergebnisse der anderen <i>Bacillus</i> spp.-Isolate in den einzelnen rPlyG-Lysetests und im $\gamma$ -Phagentest.....	100
4.8	Korrelation zwischen den hämolytischen Eigenschaften der <i>Bacillus</i> -Isolate und ihren Ergebnissen im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest....	103
4.9	Wirkung des rPlyG auf bekapselte Zellen von <i>B. anthracis</i> .....	105
4.10	Wirkung des rPlyG auf Sporen von <i>B. anthracis</i> .....	108
4.11	Anwendung des rPlyG zur DNA-Präparation aus vegetativen Zellen von <i>B. anthracis</i> .....	109
4.12	Definition einer Einheit für das rPlyG .....	112
4.13	Überprüfung der Langzeitlagerung des rPlyG .....	114
4.13.1	Überprüfung der Stabilität des rPlyG in unterschiedlichen Lagerpuffern.....	114
4.13.2	Lyophilisation des rPlyG zur Erhöhung der Stabilität bei Lagerung.....	116
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>117</b>
5.1	Rekombinante Herstellung des rPlyG .....	117
5.2	Spezifität und Sensitivität des rPlyG im Vergleich zum $\gamma$ -Phagen .....	121
5.3	Vergleiche in der Anwendung von $\gamma$ -Phage und rPlyG.....	124
5.4	Entwicklung eines Diagnostiktests .....	127
5.4.1	Erste Versuche mit rPlyG als diagnostisches Nachweisreagenz für <i>B. anthracis</i> .....	128
5.4.2	Methoden zum indirekten Nachweis der Lyse durch rPlyG .....	130
5.4.3	Entwicklung des endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests ....	131
5.5	Anwendung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests in der Routinediagnostik.....	133
5.6	Wirkung des rPlyG auf bekapselte Bakterienzellen.....	135
5.7	Wirkung des rPlyG auf Sporen.....	136
5.8	Lagerfähigkeit.....	137
5.9	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	138
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>139</b>

<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>141</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>143</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>156</b>
9.1	Verwendete Medien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	156
9.2	Eigenschaften der verwendeten <i>Bacillus</i> -Isolate .....	161
9.2.1	<i>B. anthracis</i> -Isolate .....	161
9.2.2	Andere <i>Bacillus</i> spp.-Isolate.....	166
9.3	Verwendete Vektorplasmide .....	172
9.4	Ermittelte Sequenz für das Plasmid pQE60plyG .....	174
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>178</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>180</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Ergebnis eines positiven Phagentests von <i>B. anthracis</i> A58 auf Schafblutagar.....	15
Abb. 2:	Empfohlene Vorgehensweise bei der Diagnostik von Milzbrand (NEUMEISTER et. al., 2009).....	19
Abb. 3:	Elektronenmikroskopische Aufnahme mehrerer Bakteriophagen, die an eine Zellwand gebunden sind. Einige Köpfe beinhalten DNA (weiß), während andere leer sind und ihre DNA bereits in die Bakterienzelle injiziert haben. ( <a href="http://de.wikibooks.org/wiki/Medizinische_Mikrobiologie:_Allgemeine_Bakteriologie">http://de.wikibooks.org/wiki/Medizinische_Mikrobiologie:_Allgemeine_Bakteriologie</a> ).....	25
Abb. 4:	Chemische Struktur des bakteriellen Peptidoglykans mit den Spaltstellen der vier Peptidoglykanhydrolasen (PRITCHARD et al., 2004).....	27
Abb. 5:	Ausschnitt einer Mikrotiterplatte nach Durchführung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests mit den drei Referenzstämmen. ....	59
Abb. 6:	1 %-iges Agarosegel mit Plasmid-DNA nach erneuter Restriktionsspaltung zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation.....	64
Abb. 7:	Analyse der Bakterienlysate von <i>E. coli</i> Top10F´-Stämmen jeweils vor und nach Induktion mittels Coomassie-gefärbtem SDS-PAGE-Gel (Pfeil zeigt die zusätzliche Bande des rPlyG).....	65
Abb. 8:	Analyse der im osmotischen Schocktest hergestellten Bakterienfraktionen des <i>E. coli</i> -Stammes Top10F´ mittels Coomassie-gefärbtem SDS-PAGE-Gel.....	66
Abb. 9:	Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel zur Analyse einer Bakteriensuspension von <i>E. coli</i> OrigamiB pQE60 plyG3 pREP4 RIL und dessen Lysat sowie das mittels FPLC über die 1 ml-Anionenaustauschsäule mit 50 mM Tris-Puffer, 20 mM NaCl, pH 8 aufgereinigte Lysat. Der Pfeil markiert die Lage des rPlyG.....	68
Abb. 10:	Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel zur Analyse des Bakterienlysats von <i>E. coli</i> OrigamiB pQE60 plyG3 pREP4 RIL nach Aufreinigung mittels FPLC über die 5 ml-Anionenaustauschsäule mit 50 mM Tris-Puffer, 20 mM NaCl, pH 8 und die 5 ml-Kationenaustauschsäule mit 50 mM Tris-Puffer, pH 6.....	69

Abb. 11:	Korrelation zwischen der Keimzahl (KBE/ml) und der OD <sub>600</sub> einer Suspension von <i>B. cereus</i> ATCC4342 in Std.-I-Bouillon.....	71
Abb. 12:	Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von <i>B. cereus</i> ATCC4342 in unterschiedlichen Reaktionsmedien. ....	72
Abb. 13:	Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von <i>B. anthracis</i> A58 in PBS bei unterschiedlichen pH-Werten.....	73
Abb. 14:	Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 1) mit einer Bakteriensuspension von <i>B. cereus</i> ATCC4342 in PBS bei unterschiedlichen Temperaturen.....	74
Abb. 15:	Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von <i>B. cereus</i> ATCC4342 in PBS in unterschiedlichen Wachstumsphasen (untere Phase: OD <sub>600</sub> =0,4; mittlere Phase: OD <sub>600</sub> =0,88; obere Phase: OD <sub>600</sub> =1,1; ü. N.-Kultur: OD <sub>600</sub> =1,24). ....	75
Abb. 16:	Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von <i>B. anthracis</i> A11 in PBS in unterschiedlichen Wachstumsphasen.....	75
Abb. 17:	Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von <i>B. cereus</i> ATCC4342 in PBS mit unterschiedlicher Ausgangsdichte der Kultur. ....	77
Abb. 18:	Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von <i>B. anthracis</i> A58 in PBS mit unterschiedlichen Konzentrationen von rPlyG.....	78
Abb. 19:	Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von <i>B. anthracis</i> A58 in PBS mit und ohne Folienabdeckung der Mikrotiterplatte. ....	79
Abb. 20:	Ergebnisse der 200 <i>Bacillus</i> spp. (nicht <i>B. anthracis</i> )-Isolate im turbidimetrischen rPlyG-Lysetest (Variante 2).....	80
Abb. 21:	Ergebnisse des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests (Variante 2) von 2 <i>B. subtilis</i> - (B13, B14), ein <i>B. cereus</i> - (B16) und einem <i>B. megaterium</i> -Isolat (B17). ....	80

Abb. 22:	Ergebnisse der 108 <i>B. anthracis</i> -Isolate im turbidimetrischen rPlyG-Lysetest (Variante 2).....	81
Abb. 23:	Ergebnisse des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests (Variante 2) mit 4 unterschiedlichen <i>B. anthracis</i> -Isolaten.....	82
Abb. 24:	Ergebnisse des vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests mit 4 <i>B. anthracis</i> -Isolaten (A93, A108, A110, A58) nach Inkubationszeiten von 5, 15 und 25 min. Außerdem ist die unterschiedliche OD-Reduktion bei Anzucht auf Std.-I-Agar ohne Zusatz bzw. mit 300.000 U/l und 600.000 U/l Lysozym-Zusatz dargestellt. ....	84
Abb. 25:	Ergebnisse des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von <i>B. cereus</i> ATCC4342 mit und ohne zusätzlichen Waschschrift mit PBS. ....	85
Abb. 26:	Ergebnisse des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests mit 3 <i>B. anthracis</i> -Isolaten (A38, A39, A58) und der Negativkontrolle <i>B. cereus</i> B181. ....	86
Abb. 27:	Ergebnisse des vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und –temperaturen mit 3 verschieden <i>B. anthracis</i> -Isolaten (A39, A93, A58) und der Negativkontrolle <i>B. cereus</i> B181. ....	87
Abb. 28:	Ergebnisse der 3 Referenzstämme ( <i>B. cereus</i> ATCC4342, <i>B. anthracis</i> A58, <i>B. cereus</i> B181) getestet in jeweils 12 Wiederholungen mittels vorläufigem kolorimetrischen rPlyG-Lysetest. Jeder schwarze Punkt steht für einen Ergebniswert (LANG, 2006), die schwarzen gestrichelten Linien repräsentieren die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte. Außerdem dargestellt der aus diesen Ergebnissen definierte Grenzwert von 0,05 (grau, gepunktet). ....	88
Abb. 29:	OD <sub>540</sub> -Differenzen der 108 <i>B. anthracis</i> -Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest (endgültiges Protokoll). ....	89
Abb. 30	Statistische Auswertung der OD <sub>540</sub> -Differenzen für alle 108 <i>B. anthracis</i> -Isolate mittels Boxplot: Median – schwarze Linie, arithmetischer Mittelwert – schwarze, gestrichelte Linie, außerdem oberes und unteres Quartil, Whisker und Ausreißer. Grenzwert von 0,07 (graue Linie). ....	90

- Abb. 31: Vergleich der Ergebnisse des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests (endgültiges Protokoll) von 7 zuvor negativ oder fraglich getesteten *B. anthracis*-Isolaten. Testansatz mit Kolonien nach Anzucht über 6 h (grau) bzw. über Nacht (schwarz). .....91
- Abb. 32: Zusammenfassung der Ergebnisse aller 108 *B. anthracis*-Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetests (endgültiges Protokoll) mit einem Grenzwert von 0,07. ....93
- Abb. 33: OD<sub>540</sub>-Differenzen der 200 anderen *Bacillus* spp.-Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetests (vorläufiges Protokoll). .....94
- Abb. 34: Statistische Auswertung der OD<sub>540</sub>-Differenzen für alle anderen 200 *Bacillus* spp.-Isolate mittels Boxplot: Median – schwarze Linie, arithmetischer Mittelwert – schwarze, gestrichelte Linie, außerdem oberes und unteres Quartil, Whisker und Ausreißer. Grenzwert von 0,05 (graue Linie). .....95
- Abb. 35: OD<sub>540</sub>-Differenzen von 60 *Bacillus* spp.-Isolaten im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest (endgültiges Protokoll). .....96
- Abb. 36: Häufigkeitsverteilung von rPlyG-resistent (schwarz) und -sensitiv (grau) getesteten 200 Isolaten anderer *Bacillus* spp. nach vorläufigem Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests. Die Zahl hinter der Speziesbezeichnung gibt die Anzahl der getesteten Isolate an. ....97
- Abb. 37: Häufigkeitsverteilung von rPlyG-resistent (schwarz) und -sensitiv (grau) getesteten 60 Isolaten anderer *Bacillus* spp. nach engültigem Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests. Die Zahl hinter der Speziesbezeichnung gibt die Anzahl der getesteten Isolate an. ....98
- Abb. 38: Ergebnisse des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests (endgültiges Protokoll) nach Anzucht verschiedener *Bacillus* spp.-Stämme in FKS und in einer Atmosphäre mit 20 % CO<sub>2</sub> (schwarze Balken) und Zusatz von NaHCO<sub>3</sub> (graue Balken) zur Ausbildung einer Kapsel. .... 106
- Abb. 39: Nachweis der Lyse von Bakterienzellen der *B. anthracis*-Isolate A58 und A93 nach Durchführung des  $\gamma$ -Phagentest in Flüssigkultur nach Bebrütung ohne und mit NaHCO<sub>3</sub> und in 20 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Der Pfeil zeigt das Bakterienpellet bei dem Ansatz mit ausgebildeter Kapsel. .... 107

Abb. 40:	Ergebnis der LightCycler-PCR zum Nachweis von Toxinplasmid in Sporen ( $10^2$ /Ansatz) des <i>B. anthracis</i> -Stammes A1.....	108
Abb. 41:	Analyse der aus Bakterienzellen einer ü. N.-Kultur des <i>B. anthracis</i> -Isolat A72 mit verschiedenen Präparationstechniken freigesetzten DNA in einem 0,8 %-igen Agarosegel.....	110
Abb. 42:	Ergebnis der LightCycler-PCR zum Nachweis von Toxinplasmid in unterschiedlich präparierter DNA des <i>B. anthracis</i> -Isolats A30 in 10-fach konzentriertem Taq-Reaktionspuffer. ....	111
Abb. 43:	Keimzahl in einer Bakterienkultur von <i>B. cereus</i> ATCC4342 vor und nach Einwirkung von rPlyG in der Endkonzentration von 0,1 µg/ml (Charge vom 21.04.2006). ....	113
Abb. 44:	Ergebnisse des rPlyG-Aktivitätstests mit einer Bakteriensuspension von <i>B. cereus</i> ATCC4342 bei Aufnahme des rPlyG in unterschiedlichen Puffern zum Zeitpunkt Null vor der Langzeitlagerung.....	115
Abb. 45:	Ergebnisse des rPlyG-Aktivitätstests mit einer Bakteriensuspension von <i>B. cereus</i> ATCC4342 nach 9-monatiger Lagerung des rPlyG in unterschiedlichen Puffern.....	115
Abb. 46:	Zwei rPlyG-Aktivitätstests mit Bakteriensuspensionen von <i>B. cereus</i> ATCC4342 im Vergleich: Vor bzw. direkt nach Lyophilisation des rPlyG zum Zeitpunkt Null (gestrichelte Linien) und nach 8 Monaten Lagerung des lyophilisierten rPlyG (durchgehende Linien).....	116
Abb. 47:	Vektorenkarten der Expressionsvektoren für die Durchführung des osmotischen Schocktests ( <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a> ) .....	172
Abb. 48:	Vektorenkarte des Expressionsvektors pQE60plyg (LEMNITZER, 2005) .....	173
Abb. 49:	Restriktionskarte des Repressorplasmids pREP-4 (Quelle: Qiagen, 2003) .....	173
Abb. 50:	Vollständige Sequenz des Vektors pQE60plyG (LEMNITZER, 2005) .....	177

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	31
Tab. 2:	Verwendete Referenzstämme.....	32
Tab. 3:	Verwendete <i>Bacillus</i> spp.-Isolate (außer <i>B. anthracis</i> ).....	33
Tab. 4:	Verwendete Vektoren und Plasmide.....	36
Tab. 5:	Verwendete Antibiotika und ihre eingesetzten Konzentrationen.....	36
Tab. 6:	Verwendete Primer.....	37
Tab. 7:	Übersicht über die verschiedenen Versuchsparameter bei der Aufreinigung von rekombinantem Protein mit unterschiedlichen Puffersystemen über die Anionenaustauschsäule (AEX) und / oder die Kationenaustauschsäule (CEX).....	43
Tab. 8:	Verwendete Primer und Sonden in der diagnostischen PCR.....	53
Tab. 9:	Vergleich der Ergebnisse aller 108 <i>B. anthracis</i> -Isolate im endgültigen rPlyG-Lysetest und im $\gamma$ -Phagentest.....	100
Tab. 10:	Vergleich der Ergebnisse von 200 anderen <i>Bacillus</i> spp.-Isolaten in den angewendeten Methoden.....	101
Tab. 11:	Vergleich der Hämolyseeigenschaften aller <i>Bacillus</i> spp.-Isolate mit den Ergebnissen des rPlyG-Lysetests.....	104
Tab. 12:	Nährmedien.....	156
Tab. 13:	Reagentien und Testkits.....	156
Tab. 14:	Lösungen.....	158
Tab. 15:	Verbrauchsmaterialien.....	160
Tab. 16:	Liste der untersuchten <i>B. anthracis</i> -Isolate und deren Eigenschaften.....	161
Tab. 17:	Liste der untersuchten anderen <i>Bacillus</i> spp.-Isolate und deren Eigenschaften. Die mit „(*)“-markierten Ergebnisse des $\gamma$ -Phagentests wurden den Untersuchungsdaten des Labors bei Aufnahme in die Stammsammlung entnommen.....	166



## Abkürzungsverzeichnis

AEX	Anionenaustauschsäule
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BCA	bicinchoninic acid
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEX	Kationenaustauschsäule
CFU	Kolonie formende Einheit
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat-Natriumsalz
EF	Ödemfaktor
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
H <sub>2</sub> O ddion.	doppelt deionisiertes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
KBE	Kolonie-bildende Einheit
kDa	Kilodalton
l	Liter
LF	Letalfaktor
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
mA	Milliampere
min	Minute
MLVA	Multiple Loci VNTR Analysis

mM	Millimol
MWCO	Molecular weight cut-off
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
n	Probenumfang
n. d.	nicht definiert
n. t.	nicht getestet
OD	optische Dichte
P.	Puffer
PA	Schutzantigen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered-saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFU	plaque-forming unit
pmol	Pikomol
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
rPlyG	rekombinantes Phagenlysin-gamma
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
spp.	Subspezies
Std.-I	Standard-I
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Tryptose-Soja
U	Unit
ü. N.	über Nacht
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
v/v	Volumen/Volumen-Prozent
w/v	Gewicht/Volumen-Prozent

## 1 Einleitung

Das Gram-positive Bakterium *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) ist der Erreger des Milzbrandes. Diese Erkrankung tritt vor allem bei Huftieren auf, kann aber auch alle anderen Tierarten und den Menschen betreffen. Je nach Wirt, Infektionsort und Virulenz des Stammes führt die Infektion zu unterschiedlich starker Ausprägung der Symptome, doch ist sie meist mit einer sehr hohen Mortalität nach einer sehr kurzen Inkubationszeit verbunden. Endemisch kommt Milzbrand noch heute in Afrika, Asien, Süd- und Osteuropa sowie Mittel- und Südamerika vor (TURNBULL, 1998). In Deutschland tritt *B. anthracis* nur noch an ehemaligen Industriestandorten für tierische Produkte und durch Importe sporadisch auf. Die letzten Fälle in Deutschland wurden bei Weiderindern 2009 in Bayern (ZIMMERMANN et al., 2009) und 2012 in Sachsen-Anhalt nachgewiesen (OIE, 2012). Die Zahl der Erkrankungen geht zwar weltweit zurück, jedoch ist es noch immer eine Krankheit, die zu selten diagnostiziert und gemeldet wird. Die Erkennung der Infektion ist jedoch sehr wichtig, da die Tiere sonst weiterverarbeitet werden und somit das Infektionsrisiko vor allem für den Menschen erhöht wird (HUGH-JONES, 1999).

Zusätzlich ist *B. anthracis* insbesondere wegen seines Potentials als B-Waffe weltweit von Bedeutung. In diesem Zusammenhang befürchtet man vor allem, dass multiresistente Stämme entwickelt und eingesetzt werden. Deshalb ist es wichtig, eine alternative Behandlungsmethode zur momentanen Antibiotikatherapie zu entwickeln. Es ist seit langem bekannt, dass spezifische Phagen in der Therapie bakterieller Infektionen erfolgreich eingesetzt werden können. Neu ist die Idee, muralytische Endolysine dieser Phagen dafür zu verwenden. Diese Enzyme sollen nicht nur in der Therapie sondern ebenso in der Diagnostik zur Anwendung kommen und die bisherige Bestätigungsdagnostik mit dem  $\gamma$ -Phagen ersetzen. Dazu wurden erste Ergebnisse von SCHUCH et al. (2002) publiziert.

Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, das Endolysin des spezifischen  $\gamma$ -Phagen von *B. anthracis* rekombinant herzustellen und aufzureinigen, so dass es in Versuchen zu Diagnostik und Therapie eingesetzt werden kann. Darüber hinaus sollte dessen Aktivität, Sensitivität und Spezifität geprüft werden, indem *B. anthracis*-Isolate und Isolate anderer *Bacillus*-Spezies aus der Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim untersucht wurden. Des Weiteren sollte ein diagnostischer Test entwickelt und evaluiert werden, der die bisherige Diagnostik mit dem  $\gamma$ -Phagen vereinfacht und besser reproduzierbar macht. Die Wirkung des rekombinanten Phagenlysins (rPlyG) auf bekapselte Bakterienzellen und Sporen sollte ebenso überprüft werden wie die Lagerfähigkeit des rPlyG unter unterschiedlichen Bedingungen.

## 2 Literatur

### 2.1 Der Milzbrand

#### 2.1.1 Geschichte und Gegenwart

Die Krankheit Milzbrand ist schon seit der Antike bekannt und wurde seither immer wieder beschrieben. Im Jahre 1883 wurde das mikroskopische Erscheinungsbild von Delefont dargestellt. Robert Koch (JAY, 2001; KOCH, 1876) züchtete den Erreger 1876 erstmals im Labor an, erarbeitete dessen Vermehrungszyklus und zeigte die Infektiosität der Sporen. Von William Greenfield wurden 1880 und von Louis Pasteur 1881 die ersten Immunisierungen an landwirtschaftlichen Nutztieren durchgeführt (TIGERTT, 1980; PASTEUR, 1881; GREENFIELD, 1880). So gelten Robert Koch und Louis Pasteur durch ihre Untersuchungen an Milzbrand als die Begründer der medizinischen Mikrobiologie. Im 20. Jahrhundert verloren die Forschungsarbeiten an Milzbrand durch die nur sporadischen Ausbrüche und den Einsatz von Impfstoffen zunächst an Bedeutung, bis die bioterroristischen Anschläge das öffentliche Interesse und damit den Forschungsbedarf außergewöhnlich stark steigerten.

Die Entstehung des Namens Anthrax, also der englische Bezeichnung für Milzbrand, geht auf das griechische Wort für Kohle („anthrakis“) zurück und beschreibt die schwarzen Geschwüre auf der Haut bei der kutanen Form der Krankheit. Der Begriff Milzbrand entstand auf Grund des typischen pathologischen Bildes einer durch Hämorrhagie dunkel verfärbten Milz.

Heute tritt die Erkrankung noch immer endemisch bei Nutz- und Wildtieren vor allem in großen Teilen von Afrika, Asien, Süd- und Osteuropa sowie Mittel- und Südamerika auf. Diese Verbreitung beruht vor allem auf klimatischen Bedingungen, da *B. anthracis* bei Temperaturen unter 9 - 12 °C nicht fähig ist zu sporulieren (WHO, 2008). Aber auch in vielen anderen Ländern überall auf der Erde werden sporadische Ausbrüche gemeldet (TURNBULL et al., 1998). Dabei

kommt es immer wieder zu erheblichen Verlusten bei Nutz- und Wildtieren. In Deutschland zählt Milzbrand deshalb noch immer zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen (BUNDESGESETZBLATT, 2004). Nach neun Jahren ohne Ausbruch trat Milzbrand im Juli 2009 in Oberbayern bei Weiderindern aus zwei benachbarten Betrieben auf. Dabei verendeten vier Kühe und ein weiteres erkranktes Rind wurde getötet. Die Infektion konnte bei allen vier Tieren sowohl kulturell als auch mittels PCR nachgewiesen werden, wogegen nur drei Tieren pathologisch-anatomische Hinweise auf Milzbrand zeigten. Ursache der Infektion war vermutlich eine vorab durchgeführte Erdbewegung und die Ausschwemmung von Sporen aus der Erde durch starken Regen (ZIMMERMANN et al., 2009; OIE, 2009). Der neueste Ausbruch wurde im Juli 2012 bei einer Mutterkuhherde in Sachsen-Anhalt gemeldet. Dabei verendeten 10 Tiere der Herde. Die übrigen Tiere wurden mit Langzeitantibiotika behandelt (OIE, 2012; PROMED-MAIL, 2012). Ein weiteres Beispiel für das noch heutzutage sporadische Auftreten in Europa ist Schweden. Dort gab es im Oktober 2008 nach 27 Jahren erstmals wieder einen Ausbruch bei Fleischrindern. Zwölf von 90 Tieren starben, wobei die meisten keine klinischen Symptome außer Fieber zeigten. Als Ursache des Ausbruchs wird eine Kontamination des Raufutters vermutet, wobei Laboranalysen dies nicht belegen konnten. Bekannt ist allerdings, dass im frühen 20. Jahrhundert Kadaver nach einem Milzbrandausbruch im angrenzenden Fluss entsorgt wurden. Deshalb geht man davon aus, dass hier die Quelle des Ausbruchs lag (LEWERIN et al., 2010). Diese aktuellen Fälle zeigen, dass bei unklaren Todesfällen auch in nicht endemischen Regionen eine diagnostische Untersuchung auf *B. anthracis* häufiger vorgenommen werden sollte.

Da es sich bei der Erkrankung um eine Zoonose handelt, kann sich auch der Mensch infizieren. Dies geschieht hauptsächlich über infizierte Tiere, Gewebe von infizierten Tieren, wie z. B. Felle, Häute, Wolle und Fleisch oder bei direktem Kontakt zum Erreger (DAVIES, 1980). Das Risiko einer direkten Übertragung von Mensch zu Mensch wird als sehr gering eingeschätzt. In westlichen Ländern besteht das Risiko der Infektion vor allem über importierte Tierprodukte, wie z. B. Trommeln und Felle oder durch Grabungen auf Flächen, die früher von Schlachthöfen oder verarbeitenden Industrien, wie Gerbereien oder Wollverarbeitungen genutzt wurden. Eine größere Anzahl humaner Erkrankungen

wurde in Europa zwischen Dezember 2009 und Juli 2010 aus Schottland gemeldet. Dabei infizierten sich nachweislich 47 Personen vermutlich über kontaminiertes Heroin, wovon 13 Personen starben (RAMSAY et al., 2010). Gleichzeitig trat nach 1994 der erste humane Fall in Deutschland auf. Im Dezember 2009 starb ein drogensüchtiger Mann in Nordrhein-Westfalen ohne klinische Anzeichen für Milzbrand. Es konnte jedoch *B. anthracis* aus einem Wundtupfer isoliert werden (RADUN, 2010). Eine weitere infizierte Person erkrankte Mitte März 2010 und konnte erfolgreich behandelt werden. Ebenfalls wurden drei Fälle in England gemeldet. Ein Zusammenhang dieser Fälle konnte inzwischen durch die genotypische Analyse der Stämme bestätigt werden (BEYER, pers. Mttl., 2010). Im Juni und Juli 2012 wurden weitere Krankheitsfälle bei Drogensüchtigen in Deutschland, Dänemark, Frankreich und Schottland gemeldet. Es wird vermutet, dass es sich um dieselbe Infektionsquelle wie in den Jahren 2009/2010 handelt, da die gegenwärtig isolierten Stämme mit den damaligen identisch bzw. sehr eng verwandt sind (RKI, 2012; HPA, 2012).

Als bioterroristische Waffe wurde das Bakterium schon seit dem 1. Weltkrieg immer wieder eingesetzt. Durch die Anschläge 2001 in den USA, die zu mehreren Todesfällen führten, gewann Milzbrand vor allem in den Industrienationen wieder beträchtlich an Beachtung (BÖHM und BEYER, 2003). Milzbrand zählt mit Erkrankungen wie Pocken, Pest und Botulismus zu den biologischen Waffen der Kategorie A (CDC, 2006). Diese beinhaltet Mikroorganismen mit dem höchsten Risikograd. Gemeinsam ist ihnen, dass sie einfach übertragbar und zu verbreiten sind und Infektionen mit hoher Mortalität verursachen. Von besonderer Bedeutung für *B. anthracis* ist die natürliche Entstehung oder gezielte Entwicklung multiresistenter Stämme (ATHAMNA et al.; 2004; BRYSKIER, 2002; CHOE et al., 2000), die keine Therapie mit Antibiotika mehr erlauben. Somit stieg das Interesse an einer sicheren Diagnostik und alternativen Therapiemethode in den letzten Jahren enorm an (ATHAMNA et al., 2004; BRYSKIER, 2002; INGLESBY et al., 2002; BROOK, 2002).

Nach Anhang III der Richtlinie 2000/54/EG wird *B. anthracis* in die Risikogruppe 3 der biologischen Arbeitsstoffe eingestuft. Dadurch müssen vor allem gezielte Tätigkeiten immer in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 durchgeführt werden.

Dies bedeutet für die mit diesem Bakterium arbeitenden Personen, dass besondere Schutzkleidung getragen werden muss und entsprechende Fachkenntnis vorliegen muss. Darüber hinaus sind an die Räumlichkeiten besondere Ansprüche gestellt, wie z. B. Zugangsbeschränkung, Abluftfiltration, wasserundurchlässige Böden und die Anwendung spezifischer Desinfektionsverfahren (BUNDESGESETZBLATT, 1999).

### 2.1.2 Eigenschaften von *B. anthracis*

Das Gram-positive Bakterium *Bacillus anthracis* gehört zum Genus *Bacillus* und zur Familie Bacillaceae. Die fakultativ anaerob lebenden Stäbchen sind etwa 3 - 10 µm lang und 1 - 1,5 µm breit, wobei die Enden abgerundet sind (INGLESBY et al., 2002; PILE et al., 1998). In Kulturmedien liegen die Stäbchen in der Regel als lange Ketten vor. Durch Hitzefixierung bilden sie die sogenannte Bambusstockform aus. In infiziertem Gewebe liegen sie jedoch meist einzeln oder in kurzen Ketten vor. Das Zytoplasma und das Kernäquivalent sind nach außen durch mehrere Hüllen abgetrennt: Zytoplasmamembran, Zellwand aus Peptidoglykan, S-Layer und Kapsel. *B. anthracis* ist verantwortlich für die Ausbildung der akuten und unbehandelt bei Herbivoren meist letal verlaufenden Erkrankung Milzbrand.

Von besonderer Bedeutung ist seine Fähigkeit, unter suboptimalen Bedingungen und bei genügend Sauerstoffzufuhr Sporen auszubilden. Die Sporen sind ellipsoidisch, werden mittelständig gebildet und treiben die Mutterzelle nicht auf. Die Spore ist sehr resistent gegen Austrocknung, Hitze, UV-Licht,  $\gamma$ -Strahlung und unterschiedliche Desinfektionsmittel und kann somit Jahrzehnte überleben, ohne ihre Infektionsfähigkeit zu verlieren (TURNBULL et al., 1998; WATSON et al., 1994). Die Spore besteht im Innersten aus einem Chromosomen-tragenden Kern, dem sogenannten Core. Dieser besitzt außerdem einen hohen Gehalt an kleinen säurelöslichen Proteinen (SASPs) und Dipicolinsäure. Der Kern ist zunächst von einer Membran, die der Zytoplasmamembran der vegetativen Zelle entspricht, umgeben und anschließend von einer Peptidoglykanschicht, genannt Cortex oder Sporenrinde. Nach außen folgt daraufhin die sogenannte Sporenhülle (bzw. Mantel), die ein mehrschichtiges sporenspezifisches Proteingerüst darstellt. Über



einen Zwischenraum folgt schließlich als äußerste Schicht eine dünne Proteinhülle, das Exosporium. Diese Oberflächenproteine sind vor allem für die Interaktion mit dem Wirt von Bedeutung und nur bei wenigen anderen *Bacillus* spp. vorhanden. Der dünne Mantel spielt eine entscheidende Rolle bei der Germination. Er besitzt eine flexible Oberfläche, die eine Volumenvergrößerung durch Wasseraufnahme ermöglicht. Außerdem verhindert er das Eindringen von schädigenden Molekülen, wie etwa Enzymen, nicht jedoch von potentiellen Germinanten wie Aminosäuren und Monosaccharide. Der Kern dagegen ist durch die Interaktion von DNA mit SASPs und dem Vorhandensein von Dipicolinsäure vor Hitze und UV-Strahlung geschützt (FICHTEL, 2008; DRIKS, 2009).

Wichtige medizinische und epidemiologische Eigenschaften von *B. anthracis* sind die hohe Tenazität durch Sporenbildung, die Antibiotikaresistenzen und die Bildung mehrerer Virulenzfaktoren. Die Fähigkeit der Sporenbildung und die Eigenschaft der Antibiotikaresistenz sind auf dem Chromosom kodiert, wogegen die drei wichtigsten Virulenzfaktoren, die Kapsel sowie zwei Exotoxine, auf zwei Plasmiden kodiert sind. Die vor Phagozytose schützende Kapsel und die zellschädigenden Toxine sind ausschlaggebend für die Ausbildung des Krankheitsbildes. Die Milzbrandtoxine bestehen aus drei Komponenten, dem Ödemfaktor (EF), dem Letalfaktor (LF) und dem Schutzantigen (PA). Nur wenn das PA mit einem der beiden Faktoren zusammenwirkt, kommt es zur toxischen Wirkung. So bilden PA und EF das Ödemtoxin (Etx) und PA und LF das Letaltoxin (Ltx). Einzeln zeigen die Komponenten keine toxische Wirkung (MOCK und MIGNOT, 2003). Das PA sorgt für die spezifische Bindung der heterodimeren Proteintoxine an die Zielzelle und den Transport von LF und EF in die Zelle (SCHWARTZ, 2009). Die genetischen Informationen für die Ausbildung der Toxinkomponenten werden auf dem Plasmid pXO1 kodiert. Die Kapsel besteht aus einem  $\gamma$ -D-Glutaminsäure-Polypeptid (ZWARTOUW und SMITH, 1956). Sie schützt die Bakterienzelle vor Phagozytose durch Makrophagen und ist nur schwach immunogen. Sie wird von vegetativen Zellen entweder im Tierkörper oder in vitro auf bicarbonathaltigem Nährmedium unter CO<sub>2</sub>-Zufuhr ausgebildet (THORNE et al., 1952). Die genetische Information für die Ausbildung der Kapsel ist auf dem Plasmid pXO2 codiert. Stämme, die nur eines oder keines der beiden Plasmide besitzen, sind für den Menschen avirulent.

Weitere wichtige Eigenschaften von *B. anthracis*, die auch zur Differenzierung von anderen *Bacillus* spp. verwendet werden, sind die fehlende Ausbildung einer Hämolyse auf Schafblutagar, das Fehlen von Geißeln und damit die Unbeweglichkeit des Bakteriums, die Penicillinempfindlichkeit sowie die fehlende Aktivität der Phospholipase C. Typisch ist außerdem die Bildung von großen grauweißen Kolonien von 4 – 5 mm Durchmesser mit Ausläufern, dem sogenannten Medusenhaupt. Diese können jedoch, wie der Eischnee-Effekt, auch bei einigen anderen *Bacillus* spp. beobachtet werden. Bei Ausbildung einer Kapsel erscheinen die Kolonien schleimig (HUDSON et al., 2008; INGLESBY et al., 2002; PILE et al., 1998).

### 2.1.3 Pathogenese und Klinik

Auslöser einer Infektion sind in der Regel die Sporen von *B. anthracis*. Zur Aufnahme der Sporen kommt es über Wunden oder kleine Abschürfungen, orale Aufnahme von kontaminiertem Fleisch, Inhalation von Sporen in der Luft sowie Insektenstiche (MOCK und MIGNOT, 2003). Tiere nehmen die Sporen meist aus der Erde mit ihrer Nahrung oder aus dem Wasser auf. Da es sich bei *B. anthracis* vermutlich um ein nicht-invasives Bakterium handelt, geht man davon aus, dass bei der oralen Aufnahme eine Läsion im Magen-Darm-Trakt vorhanden sein muss, um eine Infektion auszulösen. Es wird vermutet, dass diese vor allem in den heißen, trockenen Gebieten bzw. Jahreszeiten durch spitze und dornige Pflanzenfasern hervorgerufen wird (TURNBULL et al., 1998). Alle Infektionswege können zu einer tödlichen systemischen Form von Milzbrand führen. In seltenen Fällen kann es bei allen Formen sekundär in Folge der Bakteriämie zu einer hämorrhagischen Meningitis kommen (KWONG et al., 1997). Die Inkubationszeit schwankt je nach Empfänglichkeit, Dosis und Infektionsweg von wenigen Tagen bis zu mehreren Wochen. Die Mindestinfektionsdosis ist bei weniger empfänglichen Tieren, wie Pferd, Fleischfresser und Schwein, und dem Menschen deutlich höher als bei Wiederkäuern. Bei gesunden Tieren geht man von einer letalen oralen Dosis zwischen  $1,5 - 5 \times 10^8$  Sporen aus (TURNBULL et al., 2008). Entsprechend der Empfänglichkeit unterscheidet sich auch die Form der Erkrankung. Bei Wiederkäuern zeigt sich meist die perakute und tödlich endende Form, bei Pferden eine akute Erkrankung und bei Fleischfressern und Schweinen

lediglich eine subakute bis chronische Form mit relativ guten Heilungschancen. Die akute Form bleibt als Milzbrand oft unerkant, da sie vor der Ausbildung eindeutiger Symptome zum Tode führt. Eine natürliche Infektion bei Vögeln ist in Einzelfällen nur bei Straußen dokumentiert (BEYER und TURNBULL, 2009). Es wird vermutet, dass die höhere Körpertemperatur im Vergleich zu Säugetieren für die geringe oder sogar fehlende Empfänglichkeit der Vögel verantwortlich ist.

Am schwerwiegendsten verläuft die Erkrankung nach Aufnahme der Sporen durch Inhalation. Auf Grund ihrer geringen Größe erreichen sie die Alveolen und werden dort von Alveolarmakrophagen phagozytiert. Da es sich um eine nicht invasive Spore handelt, kann das Bakterium nur mit Hilfe der Makrophagen das Zellepithel durchdringen (GOOSSENS, 2009). Außerdem wird es mit den Makrophagen zu den regionalen Lymphknoten transportiert. Von dort gelangen die Makrophagen in weitere Lymphknoten und in die Blutbahn. Innerhalb der Phagosomen der Makrophagen keimen die Sporen aus, wobei der genaue Ablauf noch nicht vollständig geklärt ist, aber vom Wirt abhängig zu sein scheint. Nachgewiesen ist, dass das pXO1-Plasmid eine wichtige Rolle dabei spielt (GUIDI-RONTANI et al., 2001; DIXON et al., 2000). Nach der Germination vermehren sich die Bakterienzellen im Zytoplasma der Makrophagen sehr stark und die Expression von Virulenzfaktoren beginnt. Dabei sind eine Körpertemperatur von 37 °C und eine HCO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub>-Konzentration von 15 – 40 mM im Blut für die Vermehrung und Toxinbildung von *B. anthracis* maßgeblich (KOEHLER, 2009). Dies führt 4 – 6 h nach Phagozytose der Endospore zu einer explosionsartigen Freisetzung der Bakterien und deren Verbreitung im Körper, so dass es zur Bakteriämie kommt. Erst zu diesem Zeitpunkt kann der Erreger im Blut nachgewiesen werden (GUIDI-RONTANI et al., 1999).

Mit der Vermehrung der Bakterien werden auch die Toxinkomponenten EF, LF und PA freigesetzt. Beim EF handelt es sich um eine Kalzium- und Calmodulin-abhängige Adenylatzyklase, die einen Anstieg von intrazellulärem c-AMP hervorruft. Das LF ist eine zinkabhängige Metalloprotease, die spezifisch das N-terminale Ende von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKK) abspaltet und den zellulären Signalweg durch die Proteolyse von MAPKK inaktiviert (SCHWARTZ, 2009). Nach der Bindung an das PA entstehen die eigentlichen

Toxine Letal- und Ödemtoxin. Erst diese Bindung an das PA ermöglicht auch die Bindung an die Zielzelle und durch die Ausbildung einer Pore in der Zytoplasmamembran das Eindringen in diese (VAN DER GOOT und YOUNG, 2009). Nach dem Eindringen wirken EF und LF in unterschiedlicher Weise hemmend auf das Immunsystem des Wirtes. Dies spielt eine bedeutende Rolle für die Infektion, da sich die Bakterien dadurch nahezu ungehindert vermehren können (TOURNIER, 2009; MONTECUCCO und MOCK, 2009, BEYER, 2004). So hemmt das LT z. B. die Aktivierung von Makrophagen und somit auch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen durch die Unterbrechung des MAPKK-regulierten Signalwegs. LT hemmt die B-Zell-Proliferation und somit auch deren Antikörperproduktion. Beide Toxine verhindern zusätzlich die Aktivierung von T-Zellen. Die Toxine führen somit nicht wie früher angenommen unmittelbar zum Tod des Wirtes, sondern zur Unterdrückung des Immunsystems, welches ansonsten die Vermehrung der Bakterienzellen verhindern würde. Dazu werden die Signalwege des c-AMP und der MAPK verändert, die für die Aktivierung der Immunzellen essentiell sind (TOURNIER et. al., 2009).

Bei der hämatogenen Verbreitung der Bakterien werden diese zunächst noch in der Milz und anderen lymphatischen Organen aus dem Blut gefiltert. Doch durch die toxinvermittelte Unterdrückung des Immunsystems können die Bakterien schon kurze Zeit nach der Infektion ungehemmt alle Organsysteme erreichen, was in der finalen Phase der Infektion zu den massiven, klinisch apparenten Entzündungserscheinungen führt (POPOV et al., 2004). Zusätzlich kommt es zur Schädigung der Endothelzellen und damit zu inneren Blutungen. Diese führen zu Blutungen aus den Körperöffnungen, die als diagnostischer Hinweis für Milzbrand gelten (TURNBULL et al., 1998). Pathologisch lassen sich unter anderem hämorrhagische Nekrosen der thorakalen Lymphknoten und des Mediastinums nachweisen. Diese führen zusammen mit den systemischen Beschwerden auf Grund der Bakteriämie und Toxämie zum plötzlichen Tod (ABRAMOVA et al., 1993). Darüber hinaus sind nach dem Tod die dunkle Farbe des Blutes, die schlechte Gerinnungsfähigkeit und die dunkle geschwollene Milz als charakteristisch zu erkennen. Klinische Veränderungen sind im akuten Verlauf zunächst vor allem unspezifische Symptome wie etwa Fieber, Abgeschlagenheit und Kurzatmigkeit aber auch Lymphknotenschwellungen und Lungenödem

(GOOSSENS, 2009). Weitere klinische Symptome können je nach Tierart und Infektionsweg sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Der Tod des Wirtes beruht auf dessen Sensitivität gegenüber den Toxinen, denn je sensitiver der Wirt desto stärker die Suppression des Immunsystems und somit auch die Vermehrung der Bakterienzellen (HUGH-JONES und BLACKBURN, 2009).

Die Bakterien gelangen über Blutungen aus den Körperöffnungen oder nach dem Tod durch das Aufbrechen des Körpers meist durch Aasfresser an die Körperoberfläche. Infolge des Kontakts mit Sauerstoff kommt es zur Sporulation und zur Kontamination der Umgebung durch Sporen, die über Jahre andauern kann. Für das Bakterium *B. anthracis* spielt die Fähigkeit Sporen zu bilden eine bedeutende Rolle in seinem Lebenszyklus, denn im Gegensatz zu anderen *Bacillus* spp. ist es kaum fähig, als vegetative Zelle in der Umwelt zu überleben (TURNBULL, 2002).

Dringt der Erreger über Wunden in den Körper ein, keimen die Sporen lokal aus und führen zu Ausbildung der sogenannten Milzbrandkarbunkel. Außerdem lassen sich Gewebszerstörungen mit subepidermale Ödem, Gefäßthrombosen und interstitiellen Blutungen nachweisen (ÖNCÜ et al., 2003). Eine Verletzung des Epithels ist Grundvoraussetzung für die Infektion, denn Sporen können intakte Haut nicht durchdringen (BISCHOF, 2007). Zusätzlich kann es zu einer hämatogenen Streuung des Erregers und zur Toxämie kommen.

Durch die orale Aufnahme der Sporen gelangen diese über die Submukosa vor allem in den Oropharynx und die Ileocaecalregion. Dort können Ulzera, Ödeme und Hämorrhagien der regionalen Lymphknoten entstehen (ÖNCÜ et al., 2003).

Beim Menschen löst *B. anthracis* je nach Eintrittspforte drei verschiedene Formen des Milzbrandes aus: Haut-, Lungen- oder Darmmilzbrand (ÖNCÜ et al., 2003; DIXON et al., 1999). Die häufigste Form ist mit etwa 95 % der Hautmilzbrand (ÖNCÜ et al., 2003; DIXON et al., 1999; TURNBULL et al., 1998). Dabei bilden sich Bläschen auf der Haut, die sich zu den typischen Milzbrandkarbunkeln entwickeln. Diese Form der Erkrankung ist antibiotisch gut therapierbar. Die Letalität von Darm- und Lungenmilzbrand ist dagegen auch unter antibiotischer

Behandlung sehr hoch (SWARTZ, 2001; PILE et al., 1998). Der Tod tritt meist schon innerhalb weniger Tage durch die Septikämie und dem damit verbundenen Schock ein.

#### 2.1.4 Eng verwandte *Bacillus*-Spezies

Sehr nah verwandt mit *B. anthracis* sind vor allem *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* und *B. weihenstephanensis*. Diese werden auf Grund ihrer ähnlichen Eigenschaften als sogenannte *Bacillus cereus*-Gruppe zusammengefasst. Die Isolate von *B. cereus* sensu stricto, *B. thuringiensis* und *B. anthracis* zeigen große chromosomale Übereinstimmung, unterscheiden sich jedoch in ihrer Pathogenität (VILAS-BOAS et al., 2007; KLEE et al., 2006; TURNBULL, 1999). Im Gegensatz zu *B. anthracis* hat *B. thuringiensis* nur eine pathogene Wirkung auf Insekten. *B. cereus* ist vor allem als Verderbniserreger von Lebensmitteln bekannt. Die Spezies-spezifische Pathogenität hängt überwiegend von den vorhandenen Plasmiden ab (KOEHLER, 2009).

Da eine eindeutige Differenzierung zwischen *B. cereus* und *B. anthracis* in vielen diagnostischen Tests schwierig ist und es einige Arten gibt, die Eigenschaften von beiden Arten aufweisen, wurde schon vor über 50 Jahren darüber diskutiert, ob man *B. anthracis* nicht besser als *B. cereus* variety *anthracis* bezeichnen sollte (BROWN et al., 1958). Neuere Untersuchungen, die auch molekularbiologische Eigenschaften einbeziehen, bestätigen vor allem die enge Verwandtschaft zwischen *B. anthracis*, *B. cereus* und *B. thuringiensis* und schlagen eine Zusammenfassung dieser Stämme als *B. cereus* sensu lato vor (HELGASON et al., 2000; BAVYKIN et al., 2004). Dem gegenüber stehen allerdings Studien, die ausreichende genetische Unterschiede darstellen (CHANG et al., 2003; KEIM et al., 1997). Ebenfalls gegen die Zusammenfassung der Stämme als *B. cereus* sensu lato sprechen die eindeutigen phänotypischen Unterschiede, wie etwa Hämolyse, Kapselbildung und Toxinproduktion (VILAS-BOAS et al., 2007). Besonders wichtig ist die eindeutige Differenzierung vor allem bei der Untersuchung von Bodenproben, da Sporen von *B. cereus* und *B. subtilis* ubiquitär im Boden zu finden sind und somit fast immer nachgewiesen werden können.

Verschiedene genetische Merkmale lassen heute vermuten, dass *B. anthracis* einst aus einem *B. cereus*-Stamm hervorging. Dies geschah vor allem durch die nonsense-Mutation des Regulatorgens *plcR* und die Aufnahme der beiden Virulenzplasmide pXO1 und pXO2 (OKINAKA et al., 2006). Einige *B. cereus*-Stämme stimmen genetisch mit *B. anthracis*-Stämmen stärker überein als mit anderen *B. cereus*-Stämmen. Daraus lässt sich schließen, dass die *B. cereus*-Gruppe sehr heterogen ist, wobei einzelnen Mitglieder zwar einerseits sehr charakteristische Einzelmerkmale aufweisen, andererseits aber auch ausgedehnte Gemeinsamkeiten mit anderen Gruppenmitgliedern zeigen, die auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen sind (VILAS-BOAS et al., 2007). Von dieser Arbeitsgruppe werden außerdem einige *B. cereus*-Stämme beschrieben, die Plasmide besitzen, deren Nukleotidsequenzen zum Teil zu über 90 % mit dem pXO1-Plasmid übereinstimmen. Dabei kommt das pXO1-ähnliche Plasmid häufiger vor als das pXO2-ähnliche Plasmid. In einer weiteren Veröffentlichung (KOEHLER, 2009) konnte nachgewiesen werden, dass die Plasmide pXO1 und pXO2 innerhalb der Spezies *B. anthracis* aber auch zwischen den verschiedenen Spezies von *Bacillus* mit Hilfe von Fertilitätsplasmiden übertragen werden können.

Für einige *Bacillus* spp.-Isolate ist bekannt, dass sie auch Anthrax-ähnliche Erkrankungen auslösen. In einer Veröffentlichung von KLEE et al. (2010) wurde erstmals ein Genom eines *Bacillus*-Isolates beschrieben, das eine Milzbrand-ähnliche Krankheit verursacht hat, aber nicht in die Spezies *B. anthracis* eingeordnet werden kann. Es handelt sich dabei um ein Isolat, das aus einem Schimpanse an der Elfenbeinküste isoliert wurde, der mit Hämorrhagien der inneren Organe, Lungenödem und –emphysem klinische Symptome von Milzbrand zeigte und verstarb. Das isolierte Bakterium war beweglich, wies keine nonsense-Mutation des Regulatorgens *plcR* auf und besaß keinen der vier Prophagen, die für *B. anthracis* charakteristisch sind. Es besaß allerdings die beiden Virulenzplasmide von *B. anthracis*, pXO1 und pXO2. Die Sequenzierung des Isolats zeigte eine große Übereinstimmung zum *B. thuringiensis* Serovar Konkukian Stamm 97-27 und zum *B. cereus*-Stamm E33L. Das Bakterium wurde deshalb als "*B. cereus* variety *anthracis*" beschrieben.

## 2.2 Identifizierung von *Bacillus anthracis*

Es gibt keine Möglichkeit, das Bakterium *B. anthracis* über biochemische und Wachstumseigenschaften eindeutig von den andern *Bacillus*-Arten zu differenzieren (BROWN et al., 1958). Deshalb ist der zweifelsfreie Nachweis von *B. anthracis* besonders anspruchsvoll. Zur Untersuchung von verdächtigen Proben werden mikrobiologische, immunologische und molekularbiologische Methoden oder Nachweise mittels Bioassay herangezogen. Als Probenmaterial kommen hauptsächlich organische Proben wie Blut, Sputum, Abstriche und Organe oder Umweltproben in Frage. Vor allem die Isolation aus Umweltproben ist durch die große Anzahl an Begleitkeimen sehr aufwändig.

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Die Anzucht auf Blutagar allein kann keinen eindeutigen Nachweis von *B. anthracis* liefern. Trotzdem können charakteristische Kennzeichen, wie Koloniewachstum und fehlende Hämolyse einen ersten Verdacht nahe legen. Nährmedien wie der Cereus-Ident-Agar<sup>®</sup> oder PLET-Agar können zur Differenzierung verwendet werden, um v. a. die Gram-negative Begleitflora zu unterdrücken. Ein selektives Anreicherungsmedium, welches auch das Wachstum eng verwandter Spezies unterdrückt, steht jedoch nicht zur Verfügung. Dadurch ist der Nachweis in Umweltproben oft sehr schwierig und kann zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Die Unbeweglichkeit kann über eine Stichkultur in halbfestem Agar oder mit dem sogenannten „Hängenden Tropfen“ nachgewiesen werden. Mit Hilfe unterschiedlicher Färbemethoden wie Gram-Färbung, Kapselbestimmung durch Tuschekontrastierung und Sporenfärbung nach Wirtz lassen sich weitere wichtige Eigenschaften von *B. anthracis* prüfen, die jedoch keine Differenzierung von anderen *Bacillus* spp. ermöglichen.

Eine der wichtigsten und sensibelsten Methoden zur Identifizierung von *B. anthracis* ist der  $\gamma$ -Phagentest (KIELWEIN, 1957; BROWN und CHERRY, 1955). Die Lyse von *B. anthracis* durch den  $\gamma$ -Phagen auf einer Agarplatte ist die weltweit angewandte und vom CDC und der WHO (TURNBULL et al., 1998)



empfohlene Methode für die taxonomische Bestätigung mutmaßlicher *B. anthracis*-Isolate. Die Veröffentlichung von ABSHIRE et al. (2005) machte allerdings deutlich, dass unterschiedliche Stämme von *B. anthracis* auch unterschiedlich auf den  $\gamma$ -Phagen reagieren. Dies scheint von den Plasmiden abhängig zu sein, die sie besitzen, denn Stämme ohne pXO1-Plasmid waren gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen empfindlicher als Stämme, die beide Plasmide besaßen. Die Konzentration der verwendeten Phagensuspension sollte bei  $> 10^7$  PFU/ml liegen (ABSHIRE et al., 2005). Der Titer der verwendeten Phagensuspension ist entscheidend für die Funktion des Tests, denn bei einer Steigerung des Titers von  $10^6$  auf  $10^8$  PFU/ml konnte mit dem Phagen PBA 215 die Anzahl an lysierten *B. anthracis*-Stämmen von zunächst 25 auf 50 von 74 Stämmen verdoppelt werden (BUCK et al., 1963). Für die positive Beurteilung einer Reaktion ist die deutliche Ausbildung einer unbewachsenen Zone im Bereich der aufgetropften Phagensuspension mitten in einem dicht bewachsenen Bakterienrasen entscheidend (siehe Abb. 1)

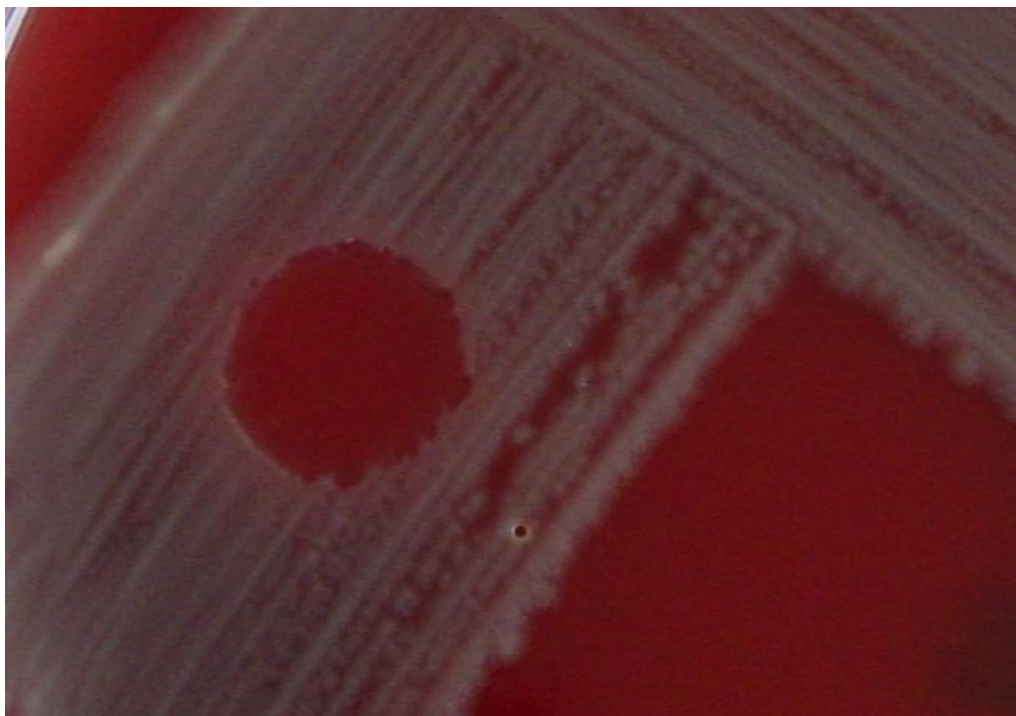


Abb. 1: Ergebnis eines positiven Phagentests von *B. anthracis* A58 auf Schafblutagar.

Als weitere wichtige Eigenschaft von *B. anthracis* gilt die Penicillinempfindlichkeit. Zur Überprüfung wird entweder die Hemmzone um ein penicillingetränktes Filterblättchen auf einer Agarplatte ermittelt oder der Perlschnurtest (JENSEN und

KLEEMEYER, 1953) durchgeführt. Für den Perlschnurtest wird der Keim auf penicillinhaltigem Nährboden angezüchtet. Zeigt der getestete Keim eine Empfindlichkeit gegenüber Penicillin, lagern sich die kugelig deformierten Bakterienzellen in Form einer Perlschnurkette aneinander.

Zur biochemischen Charakterisierung steht der API-50CH<sup>®</sup> kommerziell zur Verfügung. Mit Hilfe dieses Teststreifens werden 49 Kohlenhydratreaktionen gleichzeitig überprüft und können über ein spezielles Auswertungsschema zu einer Differenzierung der einzelnen *Bacillus* spp. beitragen.

### 2.2.2 Serologische Methoden

Zu den früheren Standardtests gehörte der Präzipitationstest nach ASCOLI (ASCOLI, 1957), ein Schnelltest für den Nachweis von löslichem *B. anthracis*-Antigen in Probenmaterial. Dafür wird gelöstes Probenmaterial mit Milzbrandserum überschichtet und bildet im positiven Fall einen weißlichen, trüben Niederschlag. Darüber hinaus wurden unterschiedlichste serologische Untersuchungsverfahren beschrieben, wie z. B. Antikörper- und Antigen-ELISAs, Immunfluoreszenztest (POPOVIC und HOFFMASTER, 2005; BÖHM und STRAUCH, 1974), Toxinneutralisationstest (HERING et al., 2004) oder der Anthraxin-Hauttest (SHLYAKHOV und RUBINSTEIN, 1996). Allerdings zeigen Antigennachweise häufig eine zu geringe Spezifität und Sensitivität, so dass sie für den Einsatz in der Routinediagnostik nicht zu empfehlen sind (BEYER et al., 2003; PILE et al., 1998). Einzelne ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen die Toxinkomponenten sind kommerziell (z. B. SERION ELISA classic *Bacillus anthracis* IgG<sup>®</sup>, Institut Virion/Serion GmbH) erhältlich jedoch nicht validiert. Außerdem sind unterschiedliche Tests in der Entwicklung oder in den Speziallaboren etabliert (HUDSON et al., 2008).

### 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

Für den Nachweis von pXO1- und/oder pXO2-Plasmiden wird meist eine Real-Time-PCR durchgeführt. Die beiden Plasmide sind die wichtigsten Differenzierungsmerkmale (OKINAKA et al., 2006) gegenüber anderen *Bacillus*-

Arten, denn alle virulenten Stämme besitzen mindestens eines der beiden Plasmide. Es wurden jedoch auch avirulente *B. anthracis*-Stämme nachgewiesen, die keine Plasmide besitzen. Außerdem treten immer wieder *B. cereus*-Stämme auf, die homologe Plasmide tragen und fähig sind, eines der Toxine oder eine Kapsel auszubilden und auch Anthrax-ähnliche Krankheiten hervorzurufen (KLEE et al., 2010; OKINAKA et al., 2006). Deshalb ist zusätzlich auch der Nachweis der chromosomalen DNA (z. B. Sasp-Gen) von *B. anthracis* mittels PCR (BEYER et al., 2003; TURNBULL et al., 1992) oder die Isolierung des Bakteriums, welches das PCR-Signal verursacht hat (HUDSON et al., 2008), von Bedeutung.

Zur Typisierung von *B. anthracis*-Isolaten werden seit einigen Jahren Untersuchungen mittels Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA) und Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analyse durchgeführt. Dabei eignet sich die SNP-Analyse vor allem für phylogenetische Untersuchungen und nur die MLVA auch für den Einsatz in der Diagnostik bei epidemiologischen Fragestellungen.

#### **2.2.4 Sonstige Methoden**

Als empfindlichste Methode und am sichersten zum Ausschluss von falsch negativen Ergebnissen gilt noch immer der Nachweis des Erregers durch die Infektion eines Versuchstieres. Aus ethischen Gründen wird dieser jedoch nur wenn nötig zur letzten Abklärung durchgeführt. Es wurden jedoch inzwischen auch einige nicht-*anthracis* Stämme nachgewiesen, die zu Anthrax-ähnlichen Symptomen und schließlich zum Tod von Mäusen führen können (OKINAKA et al., 2006). Somit kann es auch hier zu falsch positiven Ergebnissen kommen.

Auch die Elektronenmikroskopie kann vor allem aus Umweltproben und Proben mit bioterroristischem Hintergrund erste Einschätzungen von vorhandenen Bakterien ermöglichen (BEYER et al., 2003). Sehr effizient und schnell, aber auch sehr teuer und nur auf Speziallabore beschränkt, ist der Nachweis mittels Massenspektrometrie (LASCH et al., 2009; LIU et al., 2007).

### 2.2.5 Zusammenfassung der Diagnostikmethoden

Eine abschließende und sichere Diagnose von Milzbrand ist somit nur durch die Kombination mehrerer Untersuchungen möglich. Dies führt dazu, dass eine sichere Diagnostik oft sehr zeit- und kostenintensiv ist. Besonders Labore in Ländern in denen Milzbrand endemisch vorkommt sind sehr häufig nur einfach ausgestattet und haben keine Möglichkeit molekularbiologische Methoden anzuwenden. Somit ist v. a. dort die Kombination einfacher Diagnostikmethoden wichtig. Die besondere Bedeutung eines zuverlässigen Diagnostiktests wird außerdem deutlich, wenn man Veröffentlichungen betrachtet, die tödliche Anthrax-ähnliche *B. cereus*-Infektionen beschreiben (HOFFMASTER et al., 2004; KLEE et al., 2010).

In Lehrbüchern der Bakteriologie gelten vor allem fehlende Hämolyse und Motilität sowie die Fähigkeit zur Kapselbildung als wichtigste Kriterien zur Differenzierung von *B. anthracis* und *B. cereus*. Von der United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC) werden folgende phänotypische und biochemische Kriterien international zur Identifizierung von *B. anthracis* vorgegeben: a) Ausbildung einer Poly- $\gamma$ -D-Glutaminsäure-Kapsel, b) fehlende Beweglichkeit, c) Sensitivität gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen, d) keine Hämolysebildung, e) Penicillin-Empfindlichkeit f) Vorhandensein spezifischer Zellwandantigene g) besitzt eine 16S RNA vom Typ 6 (OKINAKA et al., 2006; HOFFMASTER et al., 2004). Die Abb. 2 zeigt ein Flussdiagramm, das in aktuellen Veröffentlichungen (NEUMEISTER et al., 2009; HUDSON et al., 2008) für die einzelnen Schritte zum Nachweis von *B. anthracis* empfohlen wird.

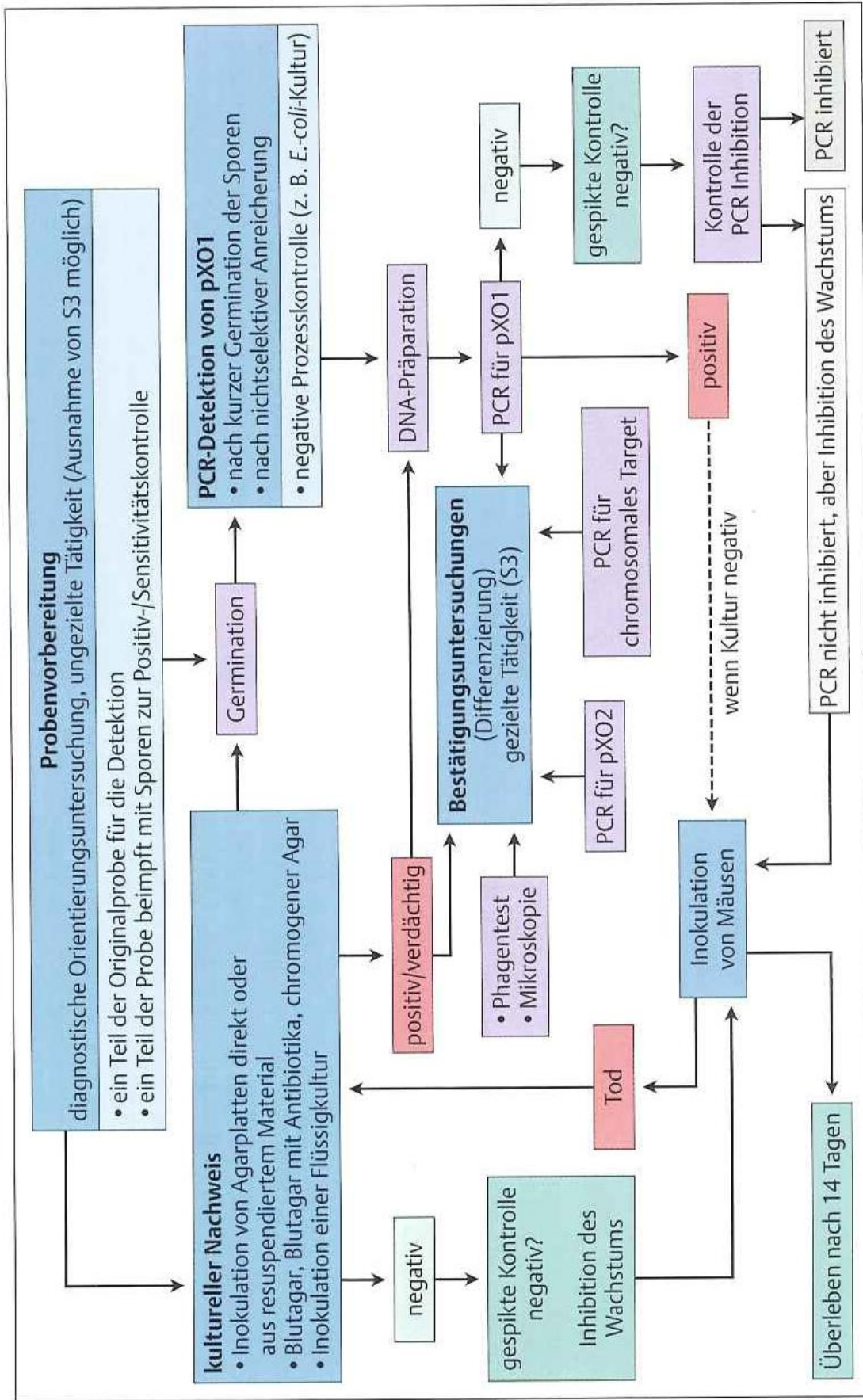


Abb. 2: Empfohlene Vorgehensweise bei der Diagnostik von Milzbrand (NEUMEISTER et. al., 2009).

### 2.3 Therapie und Prophylaxe des Milzbrands

Für die erfolgreiche Therapie des Milzbrands ist eine möglichst frühe Behandlung eine der wichtigsten Voraussetzungen, bevor durch die Bildung der Toxine irreversible Schäden auftreten. Die meisten *B. anthracis*-Stämme sind penicillinempfindlich, allerdings wurden immer mehr Stämme nachgewiesen, die durch eine natürliche Mutation oder gentechnische Manipulationen Resistenzen gegenüber Penicillin aufweisen (CAVALLO et al., 2002; LALITHA und THOMAS, 1997). Deshalb ist eine Behandlung mit Tetracyclinen wie Doxycyclin oder Chinolonen wie Ciprofloxacin vorzuziehen. Empfohlen wird die Kombination von zwei bis drei in vivo wirksamen Antibiotika (BROOK, 2002; INGLESBY et al., 2002). Zur Behandlung des Lungenmilzbrandes werden die Antibiotika in einer hohen Dosis über 60 Tage verabreicht. Diese lange Therapiedauer ist nötig, da die Gefahr besteht, dass im Gewebe vorhandene Sporen für längere Zeit persistieren und zu einem erneuten Milzbrandausbruch führen (RESSEL, 2001). Dies konnte auch in Infektionsversuchen bei Weißbüschelaffen (NELSON et al., 2011) und Mäusen (HEINE et al., 2007) nachgewiesen werden. Zusätzlich sollten bei Lungenmilzbrand die Ödeme, Atembeschwerden und eine eventuell auftretende Meningitis mit Korticosteroiden behandelt werden (RESSEL, 2001).

Der wichtigste Weg, eine Infektion zu verhindern, ist die Eindämmung der Erkrankung bei Nutztieren durch Überwachung, Einhaltung entsprechender Hygienemaßnahmen und Impfungen v. a. in endemischen Gebieten (ÖNCÜ et al., 2003). Von besonderer Bedeutung ist die Erkennung und unschädliche Beseitigung infizierter Tiere ohne dass Blut ausgetreten ist. Nur so kann verhindert werden, dass es zur Kontamination der Umgebung kommt und in diesem Gebiet über Jahre hinweg neue Infektionen auftreten können. Ebenso sollte in Endemiegebieten vermieden werden, dass rohes Fleisch verzehrt wird und Häute und Felle bearbeitet werden. Der Import dieser Produkte birgt gleichzeitig die Gefahr sich auch in nicht endemischen Ländern mit *B. anthracis* zu infizieren. Deshalb ist in Deutschland die Einfuhr dieser Produkte über das Tierseuchengesetz (BUNDESGESETZBLATT, 1909) geregelt. Für den Menschen sind Impfstoffe verfügbar, die allerdings in Deutschland nicht zugelassen sind. Auch Impfungen bei Tieren sind in Deutschland nur mit Zustimmung der zuständigen Behörde zugelassen. Das Vorgehen beim Nachweis von *B. anthracis*

oder dem Verdacht auf Milzbrand ist in Deutschland über die Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand geregelt (BUNDESGESETZBLATT, 1991). Diese beinhaltet das unschädliche beseitigen von Tierkörpern, deren Milch, Einstreu, Dung und Futter. Außerdem sind Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen vorgeschrieben, die über die Desinfektionsrichtlinie (BMELV, 2009) näher definiert sind.

## **2.4 Bakteriophagen**

### **2.4.1 Die Entdeckung der Phagen**

Bereits bei der Entdeckung von Bakteriophagen wurde von Frederick W. Twort (1914) und von Felix d'Herelle (1917) unabhängig voneinander eine bakteriolytische Eigenschaft beschrieben. D'Herelle prägte den Begriff Bakteriophage (griech. für „Bakterienfresser“) und beschrieb den Einsatz dieser bakterienspezifischen Viren als Therapeutikum. Mit der Entdeckung des Penicillins und der Entwicklung weiterer Antibiotika geriet diese Form der Therapie jedoch weitgehend in Vergessenheit (POWLEDGE, 2004; FISCHETTI, 2001). Lediglich in einigen Laboren in Osteuropa wurde weiterhin am Einsatz der Phagen in der Therapie geforscht (POWLEDGE, 2004; STONE, 2002). Durch die enorme Zunahme an antibiotikaresistenten Keimen in den letzten Jahren stieg das Interesse an alternativen Behandlungsmethoden und somit am Einsatz von Phagen in der Therapie erneut an (POWLEDGE, 2004; CARLTON, 1999). Ein weiterer großer Vorteil der Phagen in der Therapieanwendung ist, dass sie sehr spezifisch ihre Wirtsbakterien töten, jedoch anderen Bakterien, wie etwa die natürliche Darmflora, nicht angreifen.

### **2.4.2 Lysewirkung der Phagen**

Man unterscheidet zwei verschiedene Zyklen eines Phagen. Den lysogenen oder lytischen Zyklus, je nach Abschluss des Zyklus. Beim lysogenen Zyklus wird die Phagen-DNA in das Wirtsgenom integriert und als sogenannte Prophagen zusammen mit der Bakterien-DNA repliziert ohne die Bakterienzelle zu schädigen.

Der lytische Zyklus endet dagegen in der Lyse der Bakterienzelle und mit der Freisetzung der Nachkommen-Phagen (UGORCAKOVA und BUKOVSKA, 2003). Einige einsträngige DNA- und RNA-Phagen von Gram-negativen Bakterien bewirken diese Lyse durch ein einfaches Lyseprotein ohne enzymatische Aktivität. Es wird vermutet, dass dieses die Mureinsynthese inhibiert und dadurch die Zellwand schädigt (WANG et al., 2000). Bei den DNA-Doppelstrangphagen spielt dagegen ein bestimmtes Enzym, das Endolysin (auch Phagenlysin oder kurz Lysin genannt) die entscheidende Rolle für die Bakterienzellyse. Es spaltet die Peptidoglykan-Schicht aus querverknüpften Peptiden und Zuckern der Zellwand (FISCHETTI, 2001). Die Phagen produzieren außerdem ein zweites phagenkodiertes Enzym, das Holin. Dieses intrazellulär gebildete Holin sorgt am Ende der Phagenvermehrung für eine unspezifische Läsion in der Zellmembran, wodurch das Lysin durch die Membran hindurchtreten und die Zellwand erreichen kann. Das Endolysin spaltet dort dann die Peptidoglykanverbindungen (KENNY et al., 2004; UGORCAKOVA und BUKOVSKA, 2003; FISCHETTI, 2001).

Die kleineren RNA-Phagen benötigen dagegen keine speziellen Enzyme. Sie benutzen ein Kapsidprotein, das mit zytoplasmatischen Enzymen interferiert. Dies führt zu einer Schwächung der Peptidoglykanstruktur und ermöglicht die Lyse der Bakterienzelle (FISCHETTI, 2001). Da das Kapsidprotein mit etwa 40 kDa jedoch zu groß ist, um von außen in die Bakterienzelle hinein zu gelangen, wo seine Zielstrukturen liegen, kann es nicht als Therapeutikum eingesetzt werden. Diese Proteine wären jedoch Therapeutika mit einem breiten Wirkungsspektrum, da die Stoffwechselwege der Zellwandsynthese bei den meisten Bakterienarten sehr ähnlich sind (FISCHETTI, 2001).

### **2.4.3 Bekannte Phagen und ihre Anwendung**

Es wird vermutet, dass fast jedes Bakterium einen oder mehrere Phagen besitzt. Durch gezielte Untersuchung der Beziehung zwischen Phage und Wirt sollte es künftig möglich sein, neue Phagen-basierte Methoden zur Bekämpfung von Bakterien zu finden (BROUDY et al., 2001). Dies gilt sowohl für den Einsatz in der Therapie aber z. B. auch im Bereich der Desinfektion. Der Einsatz der Phagen in der Therapie wurde schon kurz nach der Entdeckung der Bakteriophagen



beschrieben (CARLTON, 1999). Nachteile der Phagentherapie sind deren schneller Abbau im Körper, der herstellungsbedingte, hohe Endotoxingehalt der Phagensuspensionen und die sich entwickelnde Resistenz durch Antikörperbildung nach wiederholten Behandlungen (FISCHETTI, 2001). Die Wirksamkeit der Phagentherapie bei Nutztieren wird unter anderem für Infektionen mit *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* und Salmonellen beschrieben (JOHNSON et al., 2008).

Auf Grund der hohen Spezifität der Phagen bietet die Diagnostik ein weiteres Einsatzgebiet. Bekannt wurde der erfolgreiche Einsatz von Phagen zur Identifizierung von *Mycobacterium tuberculosis* (BARMAN und GADRE, 2007; SEAMAN et al., 2003), *Vibrio cholerae* (SMIRNOVA et al., 2001), *Yersinia pestis*, *Salmonella* spp. (KUHN et al., 2002), *E. coli* und *Shigella* spp. Außerdem wurden rekombinante Phagen auch zum Nachweis spezifischer Antigene in Form eines ELISAs eingesetzt. Die Anwendung von Phagen zeigte Vorteile gegenüber den klassischen monoklonalen Antikörpern, begründet in den geringeren Produktionskosten, der schnelleren Vermehrung innerhalb von Stunden und dem geringeren Aufwand bei der Aufreinigung (TAN et al., 2007).

Phagen werden darüber hinaus auch in der Lebensmittelherstellung bei der Behandlung von Fleisch, Fisch und Käse eingesetzt, um einer möglichen Kontamination mit *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* spp. oder *Campylobacter* spp. entgegen zu wirken (PEEK und REDDY, 2006; REES und DODD, 2006).

#### **2.4.4 Phagen von *B. anthracis***

Es gibt nachweislich mehrere Phagen von *B. anthracis* mit großer genetischer Vielfalt. Sie gehören zu unterschiedlichen Familien der Phagen, wie den Siphoviridae, Podoviridae, Myoviridae und Tectiviridae (SOZHAMANNAN et al., 2008; SCHUCH und FISCHETTI, 2006; WALTER und BAKER, 2003). Am besten untersucht ist heute der  $\gamma$ -Phage, der *B. anthracis*-spezifisch ist und seit langem erfolgreich in der Diagnostik angewandt wird.

Allerdings wurde auch schon von COWLES (1931) ein Bakteriophage beschrieben, der *B. anthracis* lysierte, jedoch keine Spezies-Spezifität aufwies. Zwanzig Jahre später wurde der Phage W beschrieben (McCLOY, 1951a), der aus einem untypischen *B. cereus*-Stamm, genannt Stamm W (= ATCC11950), isoliert wurde und bereits eine hohe Spezifität für *B. anthracis* aufwies. Kurz darauf wurden zwei weitere, unterschiedliche vom *B. cereus*-Stamm W produzierte Phagen beschrieben (McCLOY, 1951b): Phage  $\alpha$  und Phage  $\beta$ . Der Phage  $\alpha$  greift *B. anthracis*-Stämme und auch den *B. cereus*-Stamm W an, der Phage  $\beta$  dagegen nur *B. anthracis*-Stämme. Von BROWN und CHERRY wurde 1955 eine Variante des Phagen W beschrieben. Dieser  $\gamma$ -Phage zeigte eine hohe Spezifität für *B. anthracis*, lysierte aber auch den *B. cereus*-Stamm W. Im Unterschied zu den Phagen  $\alpha$  und  $\beta$  soll dieser auch Wirkung auf bekapselte Stämme von *B. anthracis* gezeigt haben. Spätere Untersuchungen (BROWN et al., 1958) weisen deutliche Unterschiede zwischen dem  $\gamma$ - und dem W-Phagen nach. Der  $\gamma$ -Phage lysierte alle getesteten 122 *B. anthracis*-Stämme, jedoch keinen der 115 *B. cereus*-Stämme. Lediglich einige *B. mycoides*-Stämme wurden lysiert. Der W-Phage dagegen lysierte nicht nur alle *B. anthracis*-Stämme, sondern auch drei *B. cereus*- und sechs *B. mycoides*-Stämme. Damit zeigte sich eine höhere Spezifität des  $\gamma$ -Phagen für *B. anthracis* im Vergleich zu dem W-Phagen. Wegen seiner hohen Spezifität wird der  $\gamma$ -Phage derzeit vom CDC der USA zur Identifizierung von *B. anthracis* empfohlen (SCHUCH et al., 2002; TURNBULL, 1998; PILE et al., 1998).

In der Veröffentlichung von BUCK et al. (1963) wurden außerdem mehrere verschiedene Phagen mit einer großen Anzahl von *B. anthracis*-Stämmen getestet. Dabei zeigte sich, dass kein Phage alle Stämme lysieren konnte. Deshalb wurde vorgeschlagen, in der Diagnostik mehrere Phagen parallel anzuwenden, um eine höhere Sensitivität zu erreichen, was sich allerdings nicht durchsetzte.

Der  $\gamma$ -Phage besitzt einen ikosaedrischen Kopf und einen langen, nicht kontraktilen Schwanz ohne Scheide (Davison et al., 2005). Er hat eine Kaulquappen-ähnliche Form mit einem Kopf von 59 - 90 nm Durchmesser und einem Schwanz, der 180 - 200 nm lang und etwa 35 nm dick ist (SCHUCH und

FISCHETTI, 2006; BUCK et al., 1963). Der Bakteriophage  $\gamma$  ist ein Doppelstrang-DNA-Virus mit einer Genomgröße von 37 kb. Er gehört zu der Ordnung *Caudovirales*, der Familie *Siphoviridae* und dem Genus Lambda-ähnliche Viren.

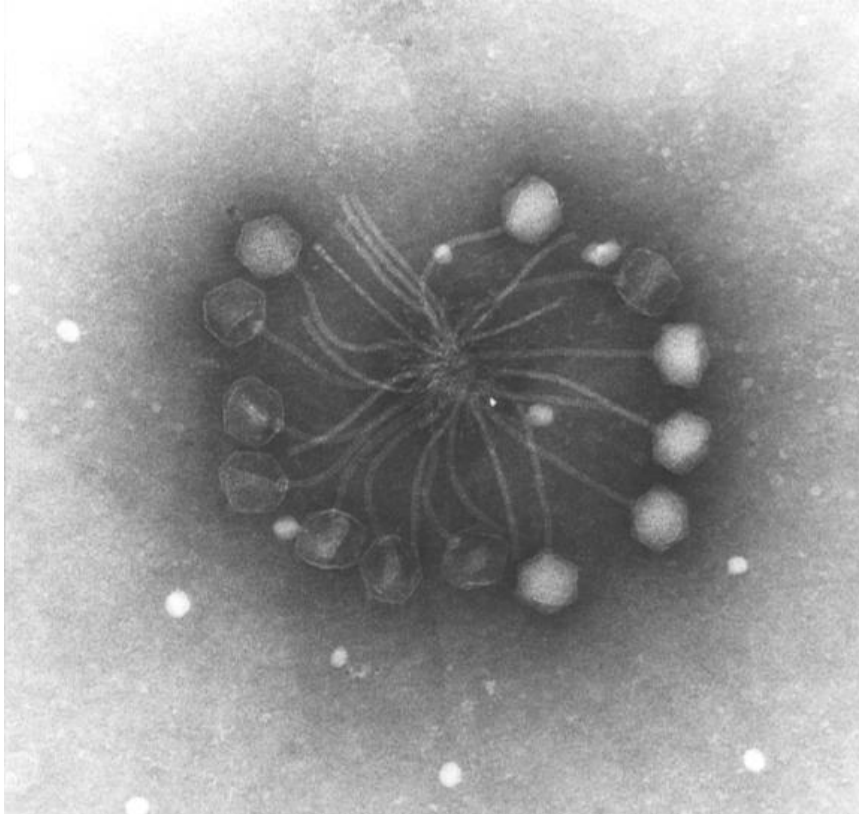


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme mehrerer Bakteriophagen, die an eine Zellwand gebunden sind. Einige Köpfe beinhalten DNA (weiß), während andere leer sind und ihre DNA bereits in die Bakterienzelle injiziert haben. ([http://de.wikibooks.org/wiki/Medizinische\\_Mikrobiologie:\\_Allgemeine\\_Bakteriologie](http://de.wikibooks.org/wiki/Medizinische_Mikrobiologie:_Allgemeine_Bakteriologie))

Nach neuesten Untersuchungen (DAVISON et. al, 2005) bindet der  $\gamma$ -Phage an einen bestimmten Rezeptor, der über eine Sortase A im Peptidoglykan der Zellwand verankert ist. Dieser Rezeptor wurde als GamR (*Gamma phage Rezeptor*) bezeichnet. Bei dem Rezeptor handelt es sich um ein Oberflächenprotein, das sogenannte LPXTG-Protein. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Mutation dieses Rezeptors auch die Sensitivität gegenüber dem Phagen verloren geht. Außerdem wurde nachgewiesen, dass  $\gamma$ -Phagen-sensitive *B. cereus*-Stämme ein Protein besitzen, das in seiner Primärstruktur zu 89 % mit dem GamR übereinstimmt. Die Beteiligung dieses Proteins an der Bindung konnte auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

## 2.5 Phagenlysine

### 2.5.1 Definition und Eigenschaften von Lysin

Phagenlysine sind lysierende Proteine, die von Bakteriophagen mit doppelsträngiger DNA gebildet werden, um nach ihrer intrazellulären Vermehrung die Wirtszellen zu zerstören und die neu gebildeten Phagen in die Umgebung zu entlassen. Das Endolysin gelangt durch Läsionen der Zytoplasmamembran vom Zytoplasma zur Zellwandmatrix und hydrolysiert dort essentielle kovalente Bindungen im Peptidoglykan. Es spaltet vor allem Kohlenhydratepitope der Zellwand und bewirkt somit eine Zerstörung der Zelle (YOONG et al., 2006). Die Lysinmoleküle bestehen in der Regel aus jeweils zwei Einheiten, einer katalytischen und einer spezifischen Domäne. Die spezifische oder auch Bindungsdomäne ist gegen spezies- oder stammspezifische Kohlenhydratverbindungen gerichtet und vermittelt damit die Spezies- und Stammspezifität des jeweiligen Bakteriophagen (LOESSNER et al., 2002; FISCHETTI, 2001). Die katalytische oder enzymatische Domäne erkennt eine spezifische Bindung im Peptidoglykan und führt zu deren enzymatischer Spaltung (GARCIA et al., 1988).

Die Endolysine sind lösliche Proteine, die zu den Peptidoglykanhydrolasen gehören. Diese spalten die Mureinstruktur der Zellwand an bestimmten Stellen. Man unterscheidet je nach Spaltungsort vier verschiedene Peptidoglykanhydrolasen: N-Acetylmuramidasen, N-Acetylglukosaminidasen, N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen und Endopeptidasen (KENNY et al., 2004; UGORCAKOVA und BUKOVSKA, 2003; HUARD et al., 2003).

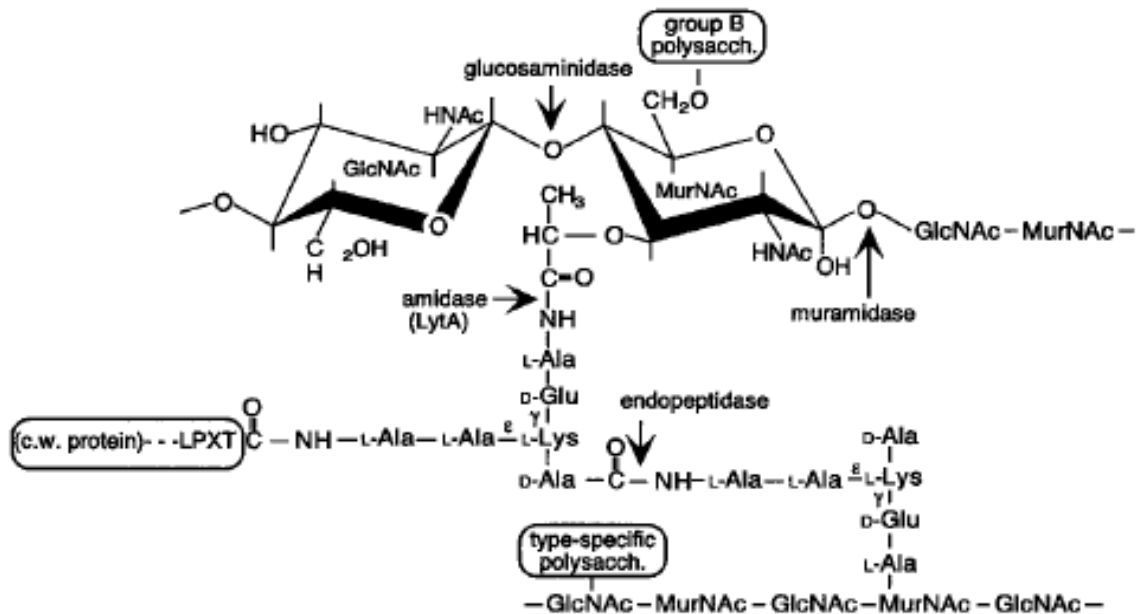


Abb. 4: Chemische Struktur des bakteriellen Peptidoglykans mit den Spaltstellen der vier Peptidoglykanhydrolasen (PRITCHARD et al., 2004).

Endolysine liegen bereits in der vegetativen Phase des Phagen vollständig gefaltet und aktiv im Zellplasma der Bakterienzelle vor (WANG et al., 2000; YOUNG und BLAESI, 1995). Um am Ende des Vermehrungszyklus an die Zellwand zu gelangen, wird das hydrophobe Protein Holin benötigt. Dieses liegt in der Membran vor und bestimmt durch die unspezifische Permeabilisierung der Zellmembran den Zeitpunkt, an dem die Bakterienzelle lysiert wird und die Nachkommen-Bakteriophagen freigesetzt werden (UGORCAKOVA und BUKOVSKA, 2003; GRUENDLING et al., 2001; WANG et al., 2000; YOUNG und BLAESI, 1995). Bisher ist nicht eindeutig geklärt, ob Holin durch Proteininhibitoren gesteuert wird (WANG et al., 2000) oder ob eine bestimmte Enzymkonzentration seine Wirkung auslöst (GRUENDLING et al., 2001). Sicher ist dagegen, dass dieses Enzym letztendlich ausschlaggebend für die Dauer des Infektionszyklus des Phagen ist. Es gibt viele unterschiedliche Holine, die in über 30 verschiedene orthologe Gruppen eingeteilt werden (UGORCAKOVA und BUKOVSKA, 2003; WANG et al., 2000) und somit eine der vielseitigsten funktionellen Gruppen von Proteinen bilden (GRUENDLING et al., 2001).

Man geht davon aus, dass während der Evolution eine enge Verbindung zwischen Phage und Wirt entstanden ist. Ein Grund, warum das Bakterium die Lyse durch

einen Phagen nicht verhindern kann, könnte darin liegen, dass sich der Phage eine spezifische Struktur in der Bakterienzellwand ausgewählt hat, die gleichzeitig lebensnotwendig für das Bakterium ist (FISCHETTI, 2001). Dies wäre auch eine Erklärung dafür, dass es nur äußerst selten zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber Phagen kommt (SCHUCH et al., 2002; LOEFFLER et al., 2001). Für den potenziellen Einsatz in der Therapie ist diese Beobachtung von großer Bedeutung. Gleichzeitig gewährt sie bei der Anwendung im Diagnostiktest die Sicherheit, dass dieser seine Spezifität nicht verliert. Die Versuche von JADO et al. (2003) und LOEFFLER et al. (2003) zeigen, dass die Proteine selbst zwar potentiell immunogen sind, sie jedoch auf Grund ihrer geringen Halbwertszeit nicht lange genug im Körper verbleiben, um eine Immunreaktion auszulösen. Ein weiterer Vorteil der Lysine und auch der Phagen ist, dass sie nur zielgerichtet spezifische Bakterienzellen angreifen und nicht wie Antibiotika auch die Bakterien der Darmflora schädigen (FISCHETTI, 2001).

### **2.5.2 Bekannte Phagenlysine in der Anwendung**

Eine Reihe von Untersuchungen zur Wirksamkeit der Phagenlysine wurde bereits publiziert. So töten z. B. 10 ng gereinigtes Lysin eines Typ A-Streptokokken-Phagen innerhalb von Sekunden die Bakterien einer Suspension mit einer Konzentration von  $10^6$  KBE/ml vollständig ab (NELSON et al., 2001). Der gleiche Erfolg wurde auch in vivo beschrieben. Durch Versuche mit dem Lysin eines Pneumokokkenphagen konnte nachgewiesen werden, dass dieses an einem überlebensnotwendigen Rezeptor in der Zellwand ansetzt (NELSON et al., 2001). Weitere Phagenlysine wurden von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* (YOONG et al., 2004), *Streptococcus agalactiae* (CHENG, et al., 2005), *Streptococcus pneumoniae* (LOPEZ, 2004; VAREA et al., 2004; JADO et al., 2003; LOEFFLER et al., 2001) und *Streptococcus pyogenes* (NELSON et al., 2001; BROUDY et al., 2001) untersucht.

### 2.5.3 *B. anthracis*-spezifische Phagenlysine

Das Phagenlysin des  $\gamma$ -Phagen von *B. anthracis* wurde PlyG (**Phagenlysin Gamma**) genannt und zuerst von SCHUCH et al. (2002) beschrieben. Das PlyG-Gen hat eine Länge von 702 bp und zeigt eine Homologie zu Genen, die N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen kodieren. Diese Homologie lässt sich vor allem an der katalytischen N-terminalen Domäne, nicht jedoch an der C-terminalen Bindungsdomäne erkennen (SCHUCH et al., 2002). Genauere Untersuchungen der Bindungsdomäne (Aminosäuresequenz 156 - 233) zeigen, dass nur ein kurzer Abschnitt zwischen den Aminosäuren L190 und Q199 für die spezifische Bindung an die Zellwand ausschlaggebend ist (SAINATHRAO et al.; 2009 KIKKAWA et al., 2007). Die katalytische Domäne gleicht annähernd der des T7-Lysozyms und spaltet die Aminobindung zwischen den Lactylgruppen der N-Acetyl-D-Muraminsäure und der Aminosäure L-Alanin der Pentapeptide innerhalb des Peptidoglykans (DIAZ et al., 1990). Inzwischen wurde nachgewiesen, dass eine katalytische Reaktion nur dann stattfinden kann, wenn das Phagenlysin mit seinem C-terminalen Ende an die Zellwand bindet (KIKKAWA et al., 2008).

Die molekulare Masse des rekombinant hergestellten PlyG (rPlyG) beträgt etwa 27 kDa und zeigt Eigenschaften eines Monomers (SCHUCH et al., 2002). Dieses rPlyG lysiert spezifisch *B. anthracis*-Stämme. In der Veröffentlichung beschreiben SCHUCH et. al. (2002) die Lyse sowohl von vegetativen Zellen als auch von keimenden Sporen. Es wurden bislang nur wenige *B. cereus*-Stämme beschrieben, die ebenfalls von PlyG lysiert werden. Einer dieser Stämme ist der Stamm ATCC4342 (oder auch RSVF1). Dieser ist nah verwandt mit *B. anthracis* und wurde in den hier präsentierten Untersuchungen jeweils als Vergleichsstamm mitgeführt. In einem in-vitro-Versuch beschreiben SCHUCH et. al. (2002), dass durch Zugabe von 2  $\mu$ g Lysin zu einer Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 innerhalb von 20 s eine 17.000-fache Reduktion der Keimzahl und nach 2 min eine vollständige Lyse aller Bakterienzellen zu erreichen ist. In derselben Veröffentlichung wird auch ein in-vivo-Versuch beschrieben, bei dem Mäuse, die letal mit dem *B. cereus*-Stamm ATCC4342 infiziert worden waren, zu 77 % durch Behandlung mit rPlyG geschützt werden konnten. Eine weitere Untersuchung dieser Arbeitsgruppe mit 14 *B. anthracis*-Stämmen, 10 *B. cereus*-Stämmen und drei *B. thuringiensis*-Stämmen zeigte, dass rPlyG die gleiche

Spezifität wie der Phage selbst aufweist. Die Methoden und Ergebnisse dieser Veröffentlichung durch SCHUCH et al. (2002) dienen der Orientierung für die geplanten Versuche im Rahmen dieser Arbeit.

Als ein weiteres, gegen *B. anthracis* gerichtetes Endolysin, wurde das PlyL des  $\lambda$ -Prophagen Ba02 beschrieben (LOW et al., 2005). Dieses spaltet die Zellwandverbindungen von verschiedenen *Bacillus* spp. und besitzt somit nicht dieselbe Spezifität wie das  $\gamma$ -Phagenlysin. Das PlyL weist eine hohe Übereinstimmung in der Sequenz mit PlyG auf. Dabei stimmt die Aminosäuresequenz an der katalytischen Domäne zu 93 % (nur 10 unterschiedliche Aminosäurereste wurden gefunden) und an der Bindungsdomäne zu 60 % überein (INGLESBY et al., 2002). Ein weiteres bakteriolytisches Enzym, dessen Gen im Genom von *B. anthracis* gefunden wurde, ist das PlyPH (YOONG et al., 2006). Es ist eng verwandt mit den Phagenlysinen, konnte aber keinem Phagen sicher zugeordnet werden. PlyG unterscheidet sich von PlyPH vor allem in der N-terminalen katalytischen Region, jedoch nur wenig in der Bindungsregion. So ging die Arbeitsgruppe um YOONG davon aus, dass beide Enzyme die gleiche Erkennungs- und Bindungsstruktur der Zellwand verwenden.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien, Puffer und Kits

Die bei dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösungen und Kits sind im Anhang (siehe 9.1) alphabetisch aufgelistet.

##### 3.1.2 Bakterienstämme

###### ***Escherichia coli*-Stämme**

Zur Entwicklung eines geeigneten Expressionssystems für die rekombinante Herstellung des Phagenlysins Gamma (PlyG) wurden unterschiedliche Bakterienstämme verwendet (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Verwendete *E. coli*-Stämme.

<b><i>E. coli</i>-Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Antibiotika-Resistenz</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Herkunft</b>
Top10 F'	F' { <i>lacI<sup>q</sup></i> , Tn10 (Tet <sup>R</sup> ) } <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Tetracyclin	C3030-03	Invitrogen, Karlsruhe
LMG194	F' $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>gal</i> <i>E</i> <i>thi</i> <i>rpsL</i> $\Delta$ <i>phoA</i> ( <i>Pvu</i> II) $\Delta$ <i>ara714</i> <i>leu::Tn10</i>	Streptomycin, Tetracyclin	V450-01	Invitrogen, Karlsruhe
OrigamiB	F' <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lac</i> <i>Y1</i> <i>ahpC</i> <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB</i>	Kanamycin, Tetracyclin	70836-4	Novagene, Darmstadt

Folgende rekombinante *E. coli*-Stämme wurden im Verlauf der Arbeit angewendet:

- Top10F' pBAD/gIII A rPlyG
- Top10 F' pBAD/gIII/calmodulin
- LMG194 pBAD/gIII A rPlyG
- LMG194 pBAD/gIII/calmodulin
- OrigamiB pQE60 plyG3 pREP4 RIL

Die *E. coli*-Stämme Top10F' und LMG194 wurden bei der Verwendung des pBAD-Vektors empfohlen. Der *E. coli*-Stamm OrigamiB besitzt eine Reduktasedefizienz durch Mutationen der beiden Gene *trxB* und *gor*. Das Fehlen der Reduktasen erzeugt ein nicht reduzierendes Milieu im Zytoplasma und ermöglicht so eine korrekte Ausbildung der Schwefelbrücken des rekombinanten Proteins.

### **Bacillus-Referenzstämme**

Für die Entwicklung eines Diagnostiktests zum Nachweis von *B. anthracis* wurden folgende Stämme aus der Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim als Referenzstämme verwendet:

Tab. 2: Verwendete Referenzstämme.

Stamm-Nr.	Spezies	Plasmide	Hämolyse	Phagentest	Herkunft
ATCC4342 = B338	<i>B. cereus</i>	-	+	+	ATCC4342 (=RSVF1)
A58	<i>B. anthracis</i>	pXO1 - pXO2 -	-	+	CDC1014 (Phag)
B181	<i>B. cereus</i>	-	+	-	DSM31

### **Bacillus-Stammsammlung**

Für die Durchführung der vorliegenden Untersuchungen wurden 108 *B. anthracis*- und 200 Isolate anderer *Bacillus*-Spezies der Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim verwendet. Dieses Institut ist anerkanntes Konsiliarlabor für *B. anthracis*. Die Arbeiten mit den *B. anthracis*-Isolaten wurden am Institut in einem Labor der Schutzstufe 3 unter der Einhaltung

der entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen nach der Biostoffverordnung (BUNDESGESETZBLATT, 1999) durchgeführt. Die Stammsammlung besteht nur aus wenigen definierten Stämmen und zeigt keine repräsentative Spezies-Zusammensetzung. Die Isolate stammen vor allem aus Bodenproben, es befinden sich aber auch Typstämme, interessante Isolate aus anderen Stammsammlungen und Isolate ohne labordiagnostische Auffälligkeiten in der Stammsammlung. Tab. 3 gibt die in der Stammsammlung vertretenen *Bacillus* spp. und die jeweilige Anzahl an Isolaten an.

Die vollständige Auflistung der einzelnen *Bacillus* spp.-Isolate befindet sich im Anhang (siehe Tab. 17).

Tab. 3: Verwendete *Bacillus* spp.-Isolate (außer *B. anthracis*).

<b>Stamm</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozentualer Anteil (%)</b>
<i>B. cereus</i>	95	47,5
<i>B. subtilis</i>	19	9,5
<i>B. licheniformis</i>	10	5,0
<i>B. spaericus</i>	9	4,5
<i>B. megaterium</i>	8	4,0
<i>B. pumilus</i>	6	3,0
<i>B. coagulans</i>	6	3,0
<i>B. firmus</i>	4	2,0
<i>B. circulans</i>	4	2,0
<i>B. pathohenticus</i>	4	2,0
<i>B. alvei</i>	4	2,0
<i>B. laterosporus</i>	3	1,5
<i>B. mycoides</i>	3	1,5
<i>B. lentus</i>	3	1,5
<i>B. polymyxa</i>	1	0,5
<i>B. spezies</i> (sonstige)	11	5,5
<i>B. spezies</i> (nicht def.)	10	5,0
<b>Summe</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

### 3.1.3 Bakteriophage

Der in dieser Arbeit verwendete Bakteriophage ist durch Klonierung aus dem  $\gamma$ -Phagen W hervorgegangen. Der  $\gamma$ -Phage wurde vom Institut für Umwelt- und Tierhygiene in den 60er Jahren zusammen mit dem Wirtsstamm *B. anthracis* A58 vom CDC, USA bezogen. Der Phage wird durch Mitarbeiter des Instituts seither in der Routinediagnostik angewendet und regelmäßig vermehrt und titriert. Die Phagensuspension, die für die Durchführung des  $\gamma$ -Phagentest eingesetzt wird und auch in dieser Arbeit verwendet wurde, besitzt eine Konzentration von  $> 2 \times 10^8$  PFU/ml.

### 3.1.4 Plasmide und Vektoren

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Optimierung der Expression von rPlyG mit unterschiedlichen Vektoren und Plasmiden gearbeitet, die in Tab. 4 aufgelistet sind.

Das Plasmid pBAD/gIII wurde als Expressionsvektor im *E. coli* verwendet und sollte die korrekte Faltung des Proteins verbessern. Um dies zu erreichen, sollte das Protein in den periplasmatischen Raum sekretiert werden. Dafür verantwortlich ist die Gensequenz *gIII* am N-terminalen Ende, die für ein kleines Kapsidprotein (pIII) vom Phagen fd codiert. Zur einfachen Insertion des gewünschten Gens besitzt es einen Polylinker (multiple cloning site) und eine Ribosomenbindestelle. Das *araC*-Gen führt zur Bildung des Regulatorproteins, das den Promotor steuert. Dieser *araBAD*-Promotor ermöglicht eine gesteuerte, dosisabhängige Expression durch eine Induktion mit L-Arabinose. Dadurch kann eine Bildung von Einschlusskörperchen verhindert werden. Außerdem besitzt der Vektor ein  $\beta$ -Lactamase-Gen, welches zu einer Ampicillin-Resistenz führt. Das Plasmid pBAD/gIII/calmodulin ist 4,6 kb groß und dient als Positivkontrolle. Es geht aus dem Plasmid pBAD/gIII A hervor, in das die Gensequenz für Calmodulin durch einen Verdau mit *SacI* und *XbaI* kloniert wurde. Das Molekulargewicht zum Nachweis im SDS-Gel liegt bei 25-30 kDa.

Der verwendete Expressionsvektor pQE60 ermöglicht die Expression von Proteinen in *E. coli*, basierend auf dem T5-Bakteriophagenpromotor Transkriptions-Translationssystem. Außerdem besitzt der Vektor zwei lac-Operatorsequenzen, eine synthetische Ribosomenbindestelle (RBSII) für eine hohe Translationsrate und eine multiple cloning site (MCS) mit Stoppcodon zur Termination der Translation. Am 3'-Ende befindet sich ein mit sechs Histidinresten kodierender Bereich. Die Ausbildung des Polyhistidin-Tags am rekombinanten Protein wurde jedoch durch Einbringen eines Stoppcodons am Ende der *plyG*-kodierten Sequenz verhindert. Zusätzlich besitzt der pQE60-Vektor ein  $\beta$ -Lactamase-Gen (*bla*), welches zu einer Ampicillin-Resistenz führt. Um die Expression des Proteins steuern zu können, verwendet man das low-copy-Repressorplasmid pREP4, auf dem das *lacI*-Gen lokalisiert ist. Dieses bewirkt die Bildung von lacI-Repressorproteinen und unterdrückt somit die Transkription. Erst durch Zugabe des Induktors IPTG, welches an den lac-Repressor bindet und diesen inaktiviert, kann die RNA-Polymerase der Wirtszelle mit der Transkription beginnen. Das Plasmid besitzt ferner ein *neo*-Gen, das für die Resistenz gegenüber Kanamycin verantwortlich ist. Das RIL-Plasmid trägt die t-RNA-Gene *argU*, *ileY* und *leuW*. Die auf diesen Genen kodierten t-RNAs erkennen die Codons AGA/AAG, CUA und AUA und ermöglichen somit die Translation der Aminosäuren Arginin, Leucin und Isoleucin. Diese Codons werden von *E. coli* selbst selten genutzt, weshalb die entsprechenden t-RNAs in *E. coli* kaum vorhanden sind. Durch die zusätzliche Bereitstellung wird eine erhöhte Expression des rekombinanten Proteins ermöglicht.

Die jeweiligen Antibiotika-Resistenzen dienen der Selektion. So kann durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums ins Medium sicher gestellt werden, dass nur diejenigen Bakterien sich vermehren, die alle vorgesehenen Plasmide besitzen.

Tab. 4: Verwendete Vektoren und Plasmide.

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Antibiotika-Resistenz</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Herkunft</b>
pBAD/gIII A	Expressionsplasmid	Ampicillin	V450-01	Invitrogen, Karlsruhe
pBAD/gIII calmodulin	Positivkontrolle	Ampicillin	V450-01	Invitrogen, Karlsruhe
pQE60	Expressionsplasmid	Ampicillin	32903	Qiagen, Hilden
pREP4	Repressorplasmid	Kanamycin	34210	Qiagen, Hilden
RIL (BL21-Codon Plus (DE3)-RIL)	erweiterter Codonsatz	Chloramphenicol	230240	Stratagene, Amsterdam, NL

Die Restriktionskarten der Plasmide sind im Anhang (siehe Abb. 47, Abb. 48, Abb. 49) aufgeführt.

### 3.1.5 Antibiotika

Die nachstehende Tabelle gibt alle in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sowie deren angesetzte Stammlösungen und verwendete Konzentrationen an.

Tab. 5: Verwendete Antibiotika und ihre eingesetzten Konzentrationen.

<b>Antibiotika</b>	<b>Konzentration in der Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O ddion.	100 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml in Ethanol absolut	25 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O ddion.	50 µg/ml
Streptomycin	200 mg/ml in PBS	400 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml in Ethanol absolut	10 µg/ml

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die Klonierung

Die PCR wurde jeweils in einem 100 µl Ansatz durchgeführt. Dieser bestand aus 16 µl dNTP (jeweilige Endkonzentration 0,2 mM), je 5 µl Primer (Endkonzentration je Primer 50 pmol), 10 µl PCR-Puffer (10-fach konzentriert), 1 µl „High Fidelity Polymerase Phusion“, 1 µl DNA, 54 µl H<sub>2</sub>O ddion. und drei Tropfen Paraffin zum Beschichten. Die PCR wurde nach folgendem Programm im Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt: Denaturierung für 240 s bei 94 °C, 30 Zyklen mit 60 s bei 94 °C, 90 s bei 60 °C und 90 s bei 72 °C. Die abschließende Elongation fand für 5 min bei 72 °C statt, bevor die Probe auf 4 °C abgekühlt wurde. Anschließend wurden die PCR-Produkte über den „QIAquick PCR Purification“-Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt, bevor sie weiter bearbeitet wurden.

Durch den Einsatz des Primers pBADlys-ros wird der DNA-Abschnitt so amplifiziert, dass der myc- und (His)<sub>6</sub>-Tag am C-terminalen Ende des Inserts erhalten bleibt, wogegen der Primer pBADlys-rms durch ein zusätzliches Stopp-Codon die Expression des Tags verhindert.

Tab. 6: Verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz	Länge
pBADlys-f	5'-AAC CAT GGA AAT CCA AAA AAA ATT AGT TGA TCC-3'	33 bp
pBADlys-ros	5'-GGA AGC TTT TAA CTT CAT ACC ACC AAC C-3'	28 bp
pBADlys-rms	5'-GGA AGC TTT ATT TAA CTT CAT ACC ACC AAC C-3'	31 bp

### 3.2.2 Restriktionsspaltung von DNA

Das PCR-Produkt und die Vektor-DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und NcoI an spezifischen Sequenzen gespalten, so dass überhängende Enden entstanden. Dazu wurde mit einem 100 µl Ansatz gearbeitet, der aus gelöster DNA, dem erforderlichen Enzympuffer und 1 – 2 U des entsprechenden Restriktionsenzym(s) bestand. Das restliche Volumen wurde mit H<sub>2</sub>O ddion. aufgefüllt. Anschließend wurde dieser Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert. Da die Restriktionsenzyme HindIII und NcoI unterschiedliche Enzympuffer benötigen, mussten die beiden Verdauungsschritte nacheinander durchgeführt werden. Dazwischen wurde eine Gelfiltration über „Micro-Spin S-400 HR“-Säulen zur Reinigung durchgeführt.

### 3.2.3 Ligation

Nach der Restriktionsspaltung wurde ein präparatives Agarosegel (siehe 3.2.8) angefertigt und die Restriktionsfragmente herausgeschnitten. Nach Reinigung der DNA mit Hilfe des „Perfectprep Gel Cleanup“-Kits wurde diese für die Ligation verwendet. Dazu wurde die DNA im Verhältnis von fünf Molekülen Insertionsfragmente auf ein Plasmidmolekül gemischt, um die Verknüpfung von Plasmid und Insert zu begünstigen. Für die Reaktion wurde ein 10 µl Ansatz verwendet, der aus 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U), 1 µl Ligasepuffer (10-fach konzentriert), 5 µl Insert-DNA, 1 µl Vektor-DNA und 2 µl H<sub>2</sub>O ddion. bestand. Die Inkubation erfolgte anschließend über Nacht bei 12 °C im Trio-Thermoblock.

### 3.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung wurde nach einer veränderten Methode von SAMBROOK et al. (1989) durchgeführt. Dazu wurden 50 ml Std.-I-Bouillon mit dem *E. coli*-Stamm (siehe Tab. 1) beimpft und unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika (siehe Tab. 5) über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C und 175 rpm inkubiert. Ein Milliliter der ü. N.-Kultur wurde in 50 ml Std.-I-Bouillon überimpft und bei 37 °C inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,2 erreicht war. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1.200 x g und bei 4 °C wurde das Pellet mit 25 ml eisgekühlter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und



für 30 min auf Eis belassen. Abschließend wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl eisgekühlter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert.

### **3.2.5 Transformation**

Zur Transformation wurden 40 µl der kompetenten Zellen mit 3 µl des Ligationsprodukts in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 40 s erfolgte eine kurze Inkubation auf Eis, bevor 160 µl Std.-I-Bouillon zugegeben wurden und dieser Ansatz für 1 h bei 37 °C und 175 rpm in einem Schüttler inkubiert wurde. Anschließend wurden 2 x 40 µl und 1 x 120 µl der Suspension auf drei Std.-I-Agarplatten ausplattiert, die zuvor mit den entsprechenden Antibiotika behandelt wurden. Die Platten wurden dann bei 37 °C über Nacht bebrütet.

### **3.2.6 Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurden jeweils fünf Kolonien von den Agarplatten ausgewählt, in jeweils 5 ml Std.-I-Bouillon mit Antibiotikazusatz (siehe Tab. 5) überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Isolierung der DNA aus dieser Kultur wurde der „High Pure Plasmid Isolation“-Kit nach Herstellerangaben angewandt. Um zu überprüfen, ob das Plasmid tatsächlich das Insert aufgenommen hat, wurde erneut ein Restriktionsverdau (siehe 3.2.2) durchgeführt und anschließend ein analytisches Agarosegel (siehe 3.2.8) angefertigt.

### **3.2.7 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Zur Bestimmung der Konzentration wurde die DNA-Lösung 1:100 in TE-Puffer verdünnt und 1 ml davon in eine Glasküvette pipettiert. Diese wurde bei einer OD von 260 nm im Spektrophotometer (Ultraspec Plus, Pharmacia, Cambridge, UK) gemessen. Zur Berechnung der Konzentration wurde folgende Gleichung herangezogen:

$$OD_{260} \times 50 \times 100 \text{ (Verdünnungsfaktor)} = \text{Konzentration der DNA-Lösung [ng/µl]}$$

### 3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

#### Analytisches Gel

Um eine Auftrennung von DNA-Gemischen zu erreichen, wurden diese mit Hilfe der Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt. Es wurde dazu ein 1 %-iges horizontales Agarosegel in einer Agarosekammer (Agargel Mini Horizontal Gel Elektrophoresis Apparatus, Biometra, Göttingen) verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde Agarose in 1 x TAE-Puffer gemischt, durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf 50 °C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen und eine Taschenschablone eingesetzt. Nach vollständigem Erkalten und Gelieren des Gels wurden die Proben nach 1:10-Verdünnung mit Probenpuffer in die Taschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Größenstandard aufgetragen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes zwischen 90 und 100 V und einer Stromstärke von 70 mA wurde eine Auftrennung nach Molekülgröße erreicht. Auf einem UV-Transilluminator (Fluolink, Biometra, Göttingen) konnten die einzelnen DNA-Banden durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids dargestellt und dokumentiert werden.

#### Präparatives Gel

Die Herstellung des präparativen Gels stimmte mit der des analytischen Gels überein. Es wurde allerdings eine Taschenschablone mit größeren Taschen verwendet, da größere Volumina in die Geltaschen eingebracht werden mussten. Außerdem wurde die elektrische Spannung auf 60 V reduziert. Nach der Auftrennung wurden die Banden unter Sichtkontrolle des UV-Transilluminators herausgeschnitten und mit dem „Perfectprep Gel Cleanup“-Kit nach Herstelleranleitung aufgereinigt (siehe 3.2.3).

### 3.2.9 Herstellung rekombinanter Proteine

#### Osmotischer Schocktest

Das Ziel der Anwendung des Vektors pBAD/gIII A war eine Sekretion des rekombinanten Proteins in das Periplasma des *E. coli*-Vektorstammes. Durch einen osmotischen Schock wurde die Zellwand zum Platzen gebracht, um die Inhaltsstoffe des Periplasmas selektiv der Analyse zugänglich zu machen und um zu prüfen, ob sich das rPlyG im periplasmatischen Raum befand.

Für den osmotischen Schocktest wurden je 50 ml Std.-I-Bouillon mit dem zu testenden rekombinanten *E. coli* und dessen Positivkontrolle mit entsprechendem Antibiotikazusatz (siehe Tab. 1) über Nacht bei 37 °C und 175 rpm auf dem Schüttler bebrütet. 100 µl der Kulturen wurden in je 10 ml Std.-I-Bouillon überführt und ebenfalls bei 37 °C und 175 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 herangezogen. Die OD-Messung fand in einer 1,5 ml-Einmalküvette am Spektrophotometer (Ultraspec Plus, Pharmacia, Cambridge, UK) statt. Je 1 ml der Kulturen wurden bei 14.000 x g für 1 min abzentrifugiert und die Pellets für spätere Analysen auf Eis gestellt. Dann wurde die Expression durch Zugabe von 0,2 % L-Arabinose induziert, und die Kulturen erneut bei 37 °C und 175 rpm für 4 h inkubiert. Nachdem je 1 ml der Kulturen bei 14.000 x g für 1 min abzentrifugiert worden waren, wurden diese Pellets und die auf Eis stehenden Pellets in so viel osmotische Schocklösung 1 (siehe Tab. 14) resuspendiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 5,0 erreicht wurde. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde erneut abzentrifugiert und die Pellets in derselben Menge osmotische Schocklösung 2 (siehe Tab. 14) resuspendiert. Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation wurden die Überstände jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Pellets erneut in der gleichen Menge osmotische Schocklösung 2 resuspendiert und alle Proben auf Eis gestellt. Zur Analyse der einzelnen Fraktionen wurde ein SDS-Gel angefertigt.

### **Expressionstest**

Für die Expression wurde zunächst eine frische ü. N.-Kultur von *E. coli* OrigamiB pQE60 plyG3 pREP4 RIL in Std.-I-Bouillon angezogen. Diese war zuvor mit den Antibiotika Ampicillin, Kanamycin und Chloramphenicol in den Endkonzentrationen 100 µg/ml, 50 µg/ml und 25 µg/ml versetzt worden. Aus der ü. N.-Kultur wurde eine entsprechende Menge 1:10 in Std.-I-Bouillon verdünnt, die ebenfalls mit Antibiotika versetzt war. Nach Inkubation bei 37 °C auf einem Schüttler bei 175 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Für die Expression wurde die Suspension für weitere 4 h bei 30 °C und 175 rpm inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 4.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, und die Pellets entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

### **Aufschluss der Bakterienzellen**

Das Bakterienpellet wurde in 50 ml Starterpuffer A resuspendiert und mit Proteaseinhibitoren-Mix (siehe Anhang Tab. 14, 1:100 verdünnt eingesetzt) und PMSF mit der Endkonzentration von 1 mM versetzt. Anschließend wurden die Bakterienzellen mittels Ultraschall am Branson Sonifier 250 (Heinemann, Schwäbisch Gmünd) lysiert. Dazu wurde die Suspension auf Eis gestellt und für 8 x 10 s mit jeweils 10 s Pause bei 300 Watt beschallt. Danach wurde die Suspension bei 12.000 x *g* für 25 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand (Bakterienlysat) gefiltert und weiter aufgereinigt.

## **3.3 Proteinanalytische Methoden**

### **3.3.1 Proteinaufreinigung**

Für die Proteinaufreinigung des Bakterienlysats wurde das FPLC-Gerät „ÄKTaprime plus“ (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) verwendet. Es wurden unterschiedliche Aufreinigungsverfahren untersucht: entweder nur ein Reinigungsschritt über die Anionenaustauschsäule (AEX) „HiTrap Q HP“ bzw. die Kationenaustauschsäule (CEX) „HiTrap SP HP“, oder zwei Reinigungsschritte hintereinander, zuerst über die AEX und anschließend über die CEX. Die Ionenaustauschschritte wurden jeweils bei unterschiedlichen Bedingungen getestet.

### **Optimierungsversuche**

Für die Aufreinigung wurden verschiedene Kombinationen aus unterschiedlichen Puffersystemen, pH-Werten, NaCl-Konzentrationen und Aufreinigungsprogrammen getestet (siehe Tab. 7), um die größtmögliche Reinheit und Ausbeute an rPlyG zu erzielen. Alle Versuche wurden zunächst an 1 ml-Säulen getestet. Zur Aufreinigung größerer Volumina wurden später die entsprechenden 5 ml-Säulen verwendet.

Tab. 7: Übersicht über die verschiedenen Versuchsparameter bei der Aufreinigung von rekombinantem Protein mit unterschiedlichen Puffersystemen über die Anionenaustauschsäule (AEX) und / oder die Kationenaustauschsäule (CEX).

Versuchs- ansatz	Starter- puffer A	Elutions- puffer A	pH	Starter- puffer C	Elutions- puffer C	pH
<b>nur AEX</b>						
1	50 mM Tris	50 mM Tris, 1 M NaCl	7,5			
2	50 mM Tris, 20 mM NaCl	50 mM Tris, 1 M NaCl	8,0			
<b>nur CEX</b>						
3				20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 M NaCl	7,2
4				20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl	6,5
<b>AEX mit anschließender CEX</b>						
5	50 mM Tris, 10 mM NaCl	50 mM Tris, 1 M NaCl	8,0	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 M NaCl	7,2
6 - 9	50 mM Tris, 20 mM NaCl	50 mM Tris, 1 M NaCl	8,0	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl	6,0 / 6,5 / 7,0 / 7,2
10 / 11	50 mM Tris, 20 mM NaCl	50 mM Tris, 1 M NaCl	8,0	50 mM Histidin	50 mM Histidin, 1 M NaCl	5,5 / 6,0
12 / 13	50 mM Tris, 20 mM NaCl	50 mM Tris, 1 M NaCl	8,0	50 mM Histidin	50 mM Histidin, 0,5 M NaCl	5,5 / 6,0
14	50 mM Tris, 20 mM NaCl	50 mM Tris, 1 M NaCl	8,0	50 mM Histidin	50 mM Histidin, 0,3 M NaCl	5,5
15	50 mM HEPES, 20 mM NaCl	50 mM HEPES, 1 M NaCl	8,0	50 mM Histidin	50 mM Histidin, 1 M NaCl	6,0
16	50 mM Tris, 20 mM NaCl	50 mM Tris, 1 M NaCl	8,0	50 mM Tris, 20 mM NaCl	50 mM Tris, 1 M NaCl	7,0
17 - 19	50 mM Tris, 20 mM NaCl	50 mM Tris, 1 M NaCl	8,0	50 mM Tris	50 mM Tris, 1 M NaCl	6,0 / 6,5 / 7,0

### **Optimiertes Aufreinigungsprotokoll**

Die AEX „HiTrap Q HP“ mit einem Säulenvolumen von 5 ml wurde bei einer Durchflussrate von 3 ml/min mit 50 ml Starterpuffer A (50 mM Tris, 20 mM NaCl) mit pH 8 äquilibriert. Nach Auftragen des gefilterten Lysats wurde die Säule mit 130 ml Starterpuffer A gewaschen. An die Säule gebundenes Protein wurde anschließend im ansteigenden Salzgradienten mit 75 ml Elutionspuffer A (50 mM Tris, 1 M NaCl) bei pH 8 eluiert. Das Eluat wurde in 1,5 ml-Fractionen gesammelt, die entsprechend ihres Proteingehalts und ihrer Zusammensetzung später gepoolt wurden. Zur weiteren Aufreinigung wurde die CEX „HiTrap SP HP“ mit einem Volumen von 5 ml verwendet. Der Durchfluss der AEX wurde im Verhältnis 1:3 mit Starterpuffer C (50 mM Tris) mit einem pH von 1,8 verdünnt, sodass sich ein pH von 6 einstellte. Da es durch die Absenkung des pH-Wertes zum Teil zu leichten Ausfällungen kam, wurde die Probe vor dem Auftragen auf die CEX zentrifugiert und mit einem Membranfilter der Porengröße von 0,45 µm gefiltert. Nach Äquilibrierung der CEX mit 50 ml Starterpuffer C mit pH 6, wurde der verdünnte Durchfluss der AEX auf die Säule gegeben. Danach wurde diese mit 170 ml Starterpuffer C gewaschen und gebundenes Protein anschließend im ansteigenden Salzgradienten mit 100 ml Elutionspuffer C (50 mM Tris, 1M NaCl) mit pH 6 eluiert. Bei der Elution wurden erneut einzelne Fractionen von 1 ml gesammelt. Alle Puffer wurden vor der Anwendung über einen 0,45 µm Membranfilter gefiltert und anschließend entgast.

Zur Auswertung der Reinigungsläufe wurden die einzelnen Eluatfractionen in einer 15 %-igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert (siehe 3.3.4) und die Proteinkonzentrationen mit Hilfe des Coo Protein Assays (siehe 3.3.3) bestimmt.

### **3.3.2 Methoden zum Umpuffern von Proteinlösungen**

#### **Dialyse**

Durch die Verwendung eines semipermeablen Dialyseschlauches aus Celluloseacetat wurde ein Pufferwechsel der Probe ohne Proteinverlust durchgeführt. Dieser war nötig, da bei den meisten Aufreinigungsversuchen für die AEX ein anderer Puffer verwendet wurde als beim zweiten Reinigungsschritt für

die CEX. Zur Dialyse wurde der Durchfluss der AEX in einen Dialyseschlauch mit durchschnittlicher Porengröße von 6 – 8 kDa gefüllt und in ein Becherglas mit 1 l der Dialyseflüssigkeit gebracht. Jede Dialyse wurde in drei aufeinander folgenden Durchgängen für jeweils mindestens 1 h bei 4 °C gegen je 1 l frische Dialyseflüssigkeit durchgeführt. Dabei wurde die Flüssigkeit auf einem Magnetrührer ständig in Bewegung gehalten, um die Effektivität zu erhöhen. Die Dialyseflüssigkeit entsprach jeweils dem Starterpuffer C.

### **PD-10-Säulen**

Für kleinere Volumina bis zu 2,5 ml je Säule wurden PD-10-Säulen zum Umpuffern der Proteinlösungen verwendet. Dieser Schritt wurde vor allem angewandt, um das aufgereinigte Protein in 5 mM HEPES-Puffer zu überführen, in dem das Protein anschließend gelagert wurde (siehe 3.7.1). Dazu wurde das Eluat der CEX über die Säule gegeben, die zuvor mit 15 ml 5 mM HEPES-Puffer pH 7,5 äquilibriert wurde. Die Elution fand ebenfalls mit HEPES-Puffer statt. Das Eluat wurde in 500 µl Fraktionen gesammelt und nach der Proteinbestimmung bei –80 °C tiefgefroren. Die Säule wurde abschließend mit 15 ml H<sub>2</sub>O ddion. gewaschen.

### **3.3.3 Methoden zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Bei beiden Methoden wurde für jede Bestimmung eine Standardkurve mit BSA erstellt.

#### **Bestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)**

Die Anwendung der BCA beruht auf einer Biuret-Reaktion. Die Proteine bilden mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex, so dass diese zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduziert werden. Durch die Bindung der Cu<sup>+</sup>-Ionen an die Säure kommt es zu einer Verfärbung von grün nach violett. Die Färbung wird umso intensiver, je mehr Protein vorhanden ist. Die Reagenzien A und B wurden vorab nach Anweisung des Herstellers (1 Teil Reagenz B auf 50 Teile Reagenz A) angewandt und die Absorption des Reaktionsgemisches in einer Mikrotiterplatte bei 540 nm im „Mikronaut Skan Plate Reader“ (Thermo Labsystems, Helsinki, Finnland) ermittelt.

### **Methode nach Bradford**

Diese Methode beruht auf einer Komplexbildung von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie<sup>®</sup>. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag von braun nach blau. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde das „Coo Protein Assay“ nach Angaben des Herstellers angewandt und die Absorption bei 620 nm im „Mikronaut Skan Plate Reader“ ermittelt.

### **3.3.4 SDS-PAGE**

Zur analytischen Auftrennung der Proteine wurde die vertikale SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) angewandt. Dazu wurden die Proben zunächst mit einem doppelt konzentrierten Probenpuffer mit oder ohne Zusatz von DTT im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde in dem vertikalen Elektrophoresesystem „Mighty Small™ SE 245 Dual Gel Caster“ (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA) hergestellt und bestand aus Sammel- und Trenngel. Die Proben wurden in die Taschen des 3,8 %-igen Sammelgels pipettiert. Durch die große Polyacrylamidporenweite des Sammelgels werden die Proteine zu einer scharfen Bande fokussiert und treffen so gleichzeitig auf das untere 15 %-ige Trenngel auf. In diesem wurden sie im Verlauf der Elektrophorese bei 200 V nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Zusätzlich wurde als Größenstandard der „peqGOLD Protein-Marker IV prestained“ mitgeführt.

Anschließend wurden die Proteine im Gel mit dem Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue R-350“ gefärbt. Dazu wurde das Gel zunächst 20 min in Fixierlösung, dann 5 min in Entfärbelösung eingelegt. Anschließend wurde es in der auf 60 °C erwärmten 0,1 %-igen Coomassie-Lösung für 10 min gefärbt. Zuletzt wurde das Gel erneut in Entfärbelösung gebracht, und auf einem Schüttler belassen, bis der Hintergrund entfärbt war und die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Zur Auswertung und Dokumentation wurde auf einem Durchlichtprojektor ein Foto des Gels angefertigt.



## **3.4 Endotoxinbestimmung und –entfernung**

### **3.4.1 Endotoxinbestimmung**

Für die Bestimmung des Endotoxingehaltes wurde der „LAL Endochrome-K“-Testkit nach Anleitung des Herstellers angewandt. Als Proben wurde das rPlyG enthaltende Eluat in einer Verdünnungsreihe 1:10, 1:100 und 1:1000 in LAL-Reagenzwasser verdünnt. Zusätzlich wurden die für die Reinigung des rPlyG verwendeten Puffer untersucht, um einen Endotoxineintrag in das aufgereinigte rPlyG ausschließen zu können. Zur Messung wurde ein „KQCL-Reader“ (Biowhittaker Inc., Walkersville, MD, USA) verwendet und die Konzentrationen mit Hilfe der Standardkurve von der Software „WinKQCL“ (Biowhittaker Inc., Walkersville, MD, USA) ermittelt.

### **3.4.2 Entfernung des Endotoxins**

Für die Entfernung des Endotoxins aus der Proteinlösung wurde eine „EndoTrap blue“-Säule verwendet. Das vorgegebene Protokoll musste leicht abgewandelt werden, da das rPlyG sich erst zeitverzögert von der Säule eluieren ließ. Zur Durchführung wurden die mit der Säule gelieferten Puffer verwendet.

Nach vollständigem Abfluss des Lagerpuffers (Regenerationspuffer + 20 % Ethanol) wurde die Säule zuerst mit 6 ml Regenerationspuffer und anschließend mit 6 ml Äquilibrationspuffer gespült. Nach vollständigem Abfließen wurde die Probe auf die Säule gegeben. Nach Durchfluss von 1 ml Totvolumen wurde das Eluat in Fraktionen mit je 1 ml gesammelt. Nach Aufgeben des gesamten Probenvolumens wurden 3 ml Äquilibrationspuffer aufgetragen und weiterhin gesammelt, um das restliche rPlyG zurückzugewinnen. Zur Regeneration der Säule wurde mit weiteren 6 ml Äquilibrationspuffer gespült, bevor sie mit 1 ml Lagerpuffer bedeckt bei 4 °C gelagert wurde. Von den einzelnen Fraktionen wurde die Proteinkonzentration bestimmt und einzelne proteinhaltige Fraktionen gepoolt, bevor sie bei –80 °C gelagert wurden.

## 3.5 Diagnostische Methoden

### 3.5.1 Varianten des $\gamma$ -Phagentests

Zur taxonomischen Identifizierung von *B. anthracis* wurde der  $\gamma$ -Phagentest in vier unterschiedlichen Varianten angewandt. Dazu wurde die Eigenschaft des  $\gamma$ -Phagen von *B. anthracis* genutzt, eine spezifische Lyse von Bakterienzellen der Spezies *B. anthracis* hervorzurufen. Die Phagensuspension hatte in allen Tests eine Konzentration von  $> 2 \times 10^8$  PFU/ml. Stets wurden der *B. anthracis*-Stamm A58 als Positivkontrolle und der *B. cereus*-Stamm B181 als Negativkontrolle parallel mitgetestet.

#### Laboreigener $\gamma$ -Phagentest

Mit einer 1  $\mu$ l-Impföse wurden Bakterien des fraglichen Isolats von einer frisch auf einer Agarplatte gewachsenen Kolonie abgenommen. Dieses Material wurde auf einer Kreisfläche von 2 cm Durchmesser auf einer Blutagarplatte verteilt. Die Kreisflächen wurden zuvor mit einer Schablone auf der Rückseite der Platte markiert. Anschließend wurde mit einer 10  $\mu$ l Öse ein Tropfen Phagensuspension am Rand des Kreises aufgetragen und die Platte dann bei 37 °C bebrütet. Das Ergebnis war in der Regel nach 6 – 8 h deutlich zu erkennen. Zur Absicherung des Ergebnisses wurde am darauffolgenden Tag, nach insgesamt 20 - 24 h Bebrütung bei 37 °C, eine weitere Beurteilung durchgeführt.

#### $\gamma$ -Phagentest nach ABSHIRE et al. (2005)

Von einer frisch bebrüteten Agarplatte wurde mit einer 1  $\mu$ l-Impföse etwas Bakterienmaterial einer Kolonie abgenommen. Dieses Material wurde mit der Öse auf einer Blutagarplatte in einem Strich vom Rand bis zum Zentrum ausgestrichen. Anschließend wurde mit einer 10  $\mu$ l-Impföse der Impfstrich über einen Quadranten der Platte verteilt und weitere Verdünnungsstriche über die restlichen drei Quadranten der Platte ausgeführt. In die Mitte des ersten und zweiten Quadranten wurden 5  $\mu$ l einer Phagensuspension mit einer Pipette aufgetropft und anschließend bei 37 °C bebrütet. Nach 4 – 8 h, in einigen Fällen auch erst am nächsten Morgen konnte das Ergebnis abgelesen werden. Der Ausstrich über den

3. und 4. Quadranten der Platte diente zur Überprüfung der Reinkultur und der Gewinnung von Einzelkolonien für eventuelle weitere Untersuchungsansätze.

### **$\gamma$ -Phagentest mit flüssigem Probenmaterial**

Mit einer 1  $\mu$ l-Impföse wurde ein Teil einer frischen Bakterienkolonie abgenommen und in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O ddion. resuspendiert. Diese Suspension wurde auf eine Blutagarplatte übertragen und mit einem Spatel zunächst in die eine Richtung über die Hälfte der Platte ausgestrichen und anschließend mit einem neuen Spatel in die andere Richtung, so dass eine Verdünnung des Ausstriches erreicht wurde. An den Stellen, an denen sich die Ausstriche nicht überschneiden, wurden 5  $\mu$ l Phagensuspension mit einer Pipette aufgetragen und die Platte anschließend bei 37 °C bebrütet. Das Ergebnis war meist schon nach 6 – 8 h deutlich zu erkennen. Zusätzlich wurde in fraglichen Fällen eine abschließende Beurteilung am darauffolgenden Tag (nach 20 - 24 h Bebrütung bei 37 °C) durchgeführt.

Bei allen drei Methoden wurden diejenigen Proben als positiv bewertet, die in einem sonst dichten Bakterienrasen einen deutlichen Plaque mit scharfer Abgrenzung an derjenigen Stelle erkennen ließen, an der die Phagensuspension aufgetropft worden war.

### **$\gamma$ -Phagentest in Flüssigkultur**

Dieser Test wurde nur zur Überprüfung der Wirksamkeit des  $\gamma$ -Phagen gegenüber bekapselten Bakterienzellen angewandt (siehe 3.6.4) und nicht wie die drei vorangehend beschriebenen Methoden als Diagnostiktest eingesetzt. Zur Durchführung wurde das zu testende Bakterienisolat über Nacht in FKS mit Zusatz von 0,7 % NaHCO<sub>3</sub> bei 37 °C und in einer Atmosphäre mit 20 % CO<sub>2</sub> auf einem Schüttler bebrütet. Daraus wurden 100  $\mu$ l in 5 ml FKS überimpft und 0,5 ml einer Phagensuspension zugegeben. Nach 6 h schüttelnder Inkubation bei 37 °C war bei erfolgter Lyse eine klare Lösung zu erkennen, während das Medium ohne Lyse infolge des Bakterienwachstums getrübt war.

### 3.5.2 Sporenfärbung

Die Anfärbung der Sporen und der vegetativen Zellen wurde mit der Sporenfärbung nach Wirtz durchgeführt. Dazu wurde unter einer Sicherheitswerkbank zunächst etwas Bakterienmaterial in einen Tropfen  $H_2O$  ddion. auf einem Objektträger verrieben. Nachdem das Material luftgetrocknet war, wurde der Objektträger in eine Petrischale mit 10 %-iger Formaldehydlösung eingelegt und für 1 h desinfiziert. Anschließend wurde der Objektträger kurz mit  $H_2O$  ddion. gespült und erneut luftgetrocknet, bevor dieser mit 5 %-iger wässriger Malachitgrünlösung beschichtet und die Lösung drei Mal über einem Bunsenbrenner aufgeköcht wurde. Nach 30 s Einwirkzeit wurde mit  $H_2O$  ddion. gespült und anschließend der Ausstrich für 1 min mit 3 %-iger wässriger Safraninlösung bedeckt. Nach erneutem Spülen mit  $H_2O$  ddion. und anschließendem Trocknen, konnten die grün angefärbten Sporen und die rot angefärbten vegetativen Zellen unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung beurteilt werden.

### 3.5.3 Nachweis der Kapselbildung

*B. anthracis* besitzt im Gegensatz zu den anderen *Bacillus*-Arten die Fähigkeit, eine Kapsel auszubilden. In vitro geschieht dies nur unter bestimmten Bebrütungsbedingungen: Zugabe von  $NaHCO_3$  ins Medium und erhöhter  $CO_2$ -Gehalt in der Umgebung. Durch die Ausbildung der Kapsel zeigen die Kolonien auf einer Agarplatte eine mukoide Konsistenz. Je nach Art der Anzucht auf festem oder in flüssigem Medium gibt es unterschiedliche Verarbeitungsmethoden, um die Kapselbildung durch Tuschkontrastierung und Mikroskopie zu überprüfen.

#### **Kapselbildung bei Anzucht auf festem Nährmedium**

Um festzustellen, ob ein Stamm die Fähigkeit besitzt, eine Kapsel zu bilden, musste dieser zunächst unter besonderen Bedingungen angezüchtet werden. Dazu beimpfte man eine TS-Agarplatte mit 0,7 %  $NaHCO_3$  und bebrütete diese bei 37 °C und in einer Atmosphäre mit 20 %  $CO_2$ . Zur Darstellung der Kapsel wurde eine Tuschkontrastierung durchgeführt. Dazu wurde Bakterienmaterial mit einer vollen 1  $\mu$ l-Impföse in 200  $\mu$ l einer 10 %-igen Formaldehydlösung in PBS resuspendiert und für 1 h bei RT inkubiert, um die Bakterien abzutöten. Dann

wurde ein Tropfen schwarze Tusche mit einer 10 µl-Impföse auf einen Objektträger gegeben. Mit einer weiteren Öse wurde ein Tropfen der Bakteriensuspension aufgenommen und anschließend kurz in den Tuschetropfen getaucht. Dann wurde die Bakteriensuspension mit dem Tuschetropfen auf einem neuen Objektträger vermischt, und ein Deckglas aufgelegt. Eine sofortige Betrachtung unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung zeigte einen deutlich hell leuchtenden Kranz um die einzelnen Bakterienzellen herum, wenn diese eine Kapsel besaßen.

### **Kapselbildung bei Anzucht in Flüssigkultur**

Zur Induktion der Kapselbildung in der Flüssigkultur wurde FKS mit 0,7 %  $\text{NaHCO}_3$  verwendet. Diese Kultur wurde mit offenem Deckel bei 37 °C und in einer Atmosphäre mit 20 %  $\text{CO}_2$  über Nacht bebrütet. Um die Kapsel mittels Tuschekontrastierung aus einer Nährbouillon darzustellen, wurde 1 ml der Bouillon in ein 1,5 ml Zentrifugengefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 14.000 x g wurde das Pellet in 200 µl einer 10 %-igen Formaldehydlösung in PBS resuspendiert und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Kapselkontrastierung wie bei der Anzucht auf festem Nährmedium durchgeführt.

### **3.5.4 LightCycler-PCR**

#### **DNA-Präparation**

Bevor eine diagnostische PCR durchgeführt werden konnte, musste die DNA präpariert werden. Dazu wurde eine Kochlyse mit 2 ml einer 6 h-Bakterienkultur in TS-Bouillon durchgeführt. Die Kultur wurde bei 14.000 x g für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen für 20 min bei 100 °C in einem Heizblock gekocht, so dass die Zellen zerstört und die DNA freigesetzt wurde. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14.000 x g wurde der Überstand über einen 0,2 µm-Spritzenfilter sterilfiltriert und als Probe in die PCR eingesetzt.

### **Protokoll der LightCycler-PCR**

Zur Durchführung der Real-Time-PCR unter Verwendung des LightCycler-Geräts (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurden unterschiedliche Primer und dazugehörige Sonden verwendet (siehe Tab. 8). Welche Primer- und Sondenkombination verwendet wurde, war davon abhängig, ob Plasmid-DNA von Toxin bzw. Kapsel oder chromosomale DNA nachgewiesen werden sollte. Das Protokoll war bei allen drei Nachweismethoden identisch. Dazu wurde der „LightCycler FastStart DNA Master HybProbe“-Kit verwendet. Der 20 µl PCR-Ansatz enthielt 2,4 µl MgCl<sub>2</sub> (4 mM), 0,5 µl je Primer (jeweils 0,5 µmol), 0,5 µl je Sonde (jeweils 0,2 µmol), 2 µl „FastStart DNA Master HybProbe“ (1/10 Volumen), 5 µl DNA und 8,6 µl PCR-reines H<sub>2</sub>O. Der „FastStart DNA Master HybProbe“ ist ein Mastermix und besteht aus Taq-DNA-Polymerase, 10 x Reaktionspuffer, dNTPs und MgCl<sub>2</sub>. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt: Präinkubation (95 °C, 10 min), gefolgt von 45 Zyklen jeweils bestehend aus Denaturierung (95 °C, 10 s), Annealing (60 °C, 20 s) und Amplifikation (72 °C, 30 s). Die abschließende Abkühlungsphase wurde bei 40 °C für 30 s durchgeführt.

Tab. 8: Verwendete Primer und Sonden in der diagnostischen PCR.

Nachweis von	Primer	Sonden	Sequenz	Länge
Toxinplasmid pXO1 (PA-Gen)	BAPA-S		5'-CGG ATC AAG TAT ATG GGA ATA TAG CAA-3'	27 bp
	BAPA-R		5'-CCG GTT TAG TCG TTT CTA ATG GAT-3'	24 bp
		BAPA-FL	5'-TgC ggT AAC ACT TCA CTC CAg TTC gA--FL	26 bp
		BAPA-LC Red640	5'-LC Red640-CCT gTA TCC ACC CTC ACT CTT CCA TTT TC--PH	29 bp
Kapselplasmid pXO2 (CapC-Gen)	CapS		5'-ACG TAT GGT GTT TCA AGA TTC ATG-3'	24 bp
	Cap A**		5'GAT TGC AAA TGT TGC ACC ACT TA-3'	23 bp
		CapC- FL+	5'-TAT TGT TAT CCT GTT ATG CCA TTT GAG ATT TTT- X	33 bp
		CapC-LC Red640	5'-LC Red640-AAT TCC GTG GTA TTG GAG TTA TTG TTC C--PH	28 bp
chromosomaler DNA (Sasp-Gen)	ANT-F <sup>+</sup>		5'-GCT AGT TAT GGT ACA GAG TTT GCG AC-3'	26 bp
	ANT-A <sup>mt+</sup>		5'-CCA TAA CTG ACA TTT GTG CTT TGA AT-3'	26 bp
		ANT-FL	5'-CAA gCA AAC gCA CAA TCA gAA gCT AAg--FL	27 bp
		ANT-LC Red640	5'-LC Red640-gCg CAA gCT TCT ggT gCT AgC--PH	21 bp

### 3.5.5 Bestimmung der Keimzahl

#### Kochsches Oberflächenverfahren

Mit dem Kochschen Oberflächenverfahren wurde die Keimzahl des *B. cereus*-Stammes ATCC4342 vor und nach der Inkubation unter der Einwirkung von rPlyG bestimmt. Dieses Verfahren wurde durchgeführt, um eine Einheit für das rPlyG zu definieren und um die mit der turbidimetrischen Methode ermittelte OD in Relation zu einer Keimzahl zu setzen. Dazu wurde die fragliche Bakteriensuspension in Dezimalschritten in steriler, physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden 2 x 100 µl im Doppelansatz auf je eine Std.-I-Agarplatte mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Nach einer Bebrütung bei 37 °C über Nacht wurden die jeweiligen Platten ausgezählt, bei denen zwischen 10 und 300 Kolonien gewachsen waren. Aus der ermittelten Anzahl der Kolonien wurde dann die Keimzahl der Suspension in KBE/ml unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnet.

#### Turbidimetrische Methode

Bei der turbidimetrischen Methode handelt es sich um eine Messung der OD<sub>600</sub> bzw. OD<sub>620</sub> einer Bakteriensuspension. Je höher die Bakteriendichte einer Bakteriensuspension, desto trüber ist diese Suspension und desto höher ist deren OD-Wert. Somit ermöglicht die Messung der OD einer Bakteriensuspension Rückschlüsse auf deren Keimzahlgehalt. Diese Methode ermöglicht zunächst jedoch nur den Nachweis einer relativen Keimzahländerung bei mehreren Messungen. Für eine quantitative Bestimmung der Keimzahl muss eine Relation zwischen OD-Wert und Keimzahl über das Kochsche Oberflächenverfahren ermittelt werden (siehe Abb. 11).



## 3.6 Anwendung des rPlyG

### 3.6.1 rPlyG-Lysetest mittels photometrischer Trübungsmessung von Flüssigkulturen

Für die Entwicklung eines diagnostischen Tests wurden alle Optimierungsarbeiten zunächst mit drei Referenzstämmen durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten die  $\gamma$ -Phagen- und rPlyG-sensitiven Stämme *B. cereus* ATCC4342 und *B. anthracis* A58 und als Negativkontrolle der *B. cereus*-Stamm B181. Optimierungen der Testbedingungen bezogen sich auf das Reaktionsmedium, den pH-Wert, die Temperatur, die Wachstumsphase, die Bakteriendichte und die rPlyG-Konzentration.

#### Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest - Variante 1

Dieser Test wurde zunächst mit einer Bakterienkultur des zu testenden Isolats durchgeführt, die bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 herangewachsen war. Später wurde zur Vereinfachung mit einer ü. N.-Kultur in TS-Bouillon des jeweiligen Isolates gearbeitet. Zwei Mal 10 ml der Bakterienkultur wurden bei  $4.500 \times g$  abzentrifugiert und in derselben Menge PBS resuspendiert. Dann wurde 1 ml in eine 1,5 ml-Einmalküvette überführt und die  $OD_{600}$  zum Zeitpunkt 0 im „Spektrophotometer Ultraspec Plus“ ermittelt. In den einen Ansatz der verbleibenden Bakteriensuspensionen wurde die rPlyG-Lösung (Endkonzentration  $8 \mu\text{g/ml}$ ) zupipettiert und in den zweiten Ansatz dasselbe Volumen PBS. Dann wurden nach 5, 10, 15, 30, 40 und 60 min aus beiden Ansätzen jeweils 1 ml entnommen und die  $OD_{600}$  im Photometer ermittelt. Aus der Abnahme des  $OD_{600}$ -Wertes ließ sich die korrelierende Abnahme der Keimzahl im Verlauf der Zeit ermitteln.

#### Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest - Variante 2

Um mit kleineren Volumina und einer größeren Probenanzahl arbeiten zu können wurde der Test an die Durchführung in Mikrotiterplatten angepasst. Dazu wurde 1 ml der ü. N.-Kultur in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei  $14.000 \times g$  abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und anschließend jeweils 200  $\mu\text{l}$  in vier Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. In zwei der Vertiefungen wurde die rPlyG-Lösung (Endkonzentration  $8 \mu\text{g/ml}$ ) gegeben, während in die

anderen zwei Vertiefungen dasselbe Volumen durch PBS ergänzt wurde. Zusätzlich wurde in zwei weitere Vertiefungen 200 µl PBS pipettiert, welche bei der Messung als Nullwert dienten. Die Platte wurde sofort nach der Lysinzugabe im „Mikronaut Skan Plate Reader“ (Thermo Labsystems) bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Anschließend wurden nach definierten, vorprogrammierten Zeiten (5, 10, 20, 30, 40 und 60 min) weitere Messungen durchgeführt, um die Änderungen der OD<sub>620</sub> zu verfolgen. Vor jeder Messung wurde die Platte leicht geschüttelt. Bei der Prüfung von *B. anthracis*-Isolaten wurden diese Arbeitsschritte unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt und die Mikrotiterplatte vor der ersten Messung mit einer Polypropylenfolie abgeklebt. Dies erklärt, warum bei der Untersuchung von *B. anthracis*-Isolaten keine Messung zum Zeitpunkt 0 durchgeführt werden konnte. Der aus der Differenz der OD<sub>620</sub>-Werte mit und ohne rPlyG-Zugabe errechnete Ergebniswert wird nach dem definierten Grenzwert von 0,1 beurteilt.

### 3.6.2 rPlyG-Aktivitätstest

Aus den Vorversuchen zur Entwicklung des rPlyG-Lysetests ergab sich schließlich folgendes Protokoll für die Überprüfung der Aktivität des rekombinant hergestellten PlyG. Alle drei Referenzstämme wurden frisch auf Std.-I-Agar ausgestrichen, je eine Impföse des Rasens in 50 ml TS-Bouillon überimpft und kurz gevortext, um das Bakterienmaterial zu resuspendieren. Dann wurden diese über Nacht bei 37 °C und 175 rpm inkubiert. Aus diesen Suspensionen wurden jeweils 5 ml in 15 ml Zentrifugengefäße überführt und bei 4500 x g für 10 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 ml PBS vollständig resuspendiert und anschließend durch weiteres Verdünnen mit PBS unter Messung der OD<sub>600</sub> in einer 1,5 ml-Einmalküvette auf einen Wert von 0,9 – 1,0 eingestellt. Aus diesen Suspensionen wurden jeweils in vier Vertiefungen einer Mikrotiterplatte 300 µl pipettiert. In je zwei Vertiefungen wurde die rPlyG-Lösung (Endkonzentration 4 µg/ml) zugegeben und in die jeweils anderen zwei Vertiefungen dieselbe Menge PBS als Referenzwert. Zusätzlich wurde in zwei Vertiefungen 300 µl PBS pipettiert, die bei der Messung als Nullwert dienten. Sofort nach der Lysinzugabe wurde die Mikrotiterplatte im „Mikronaut Skan Plate Reader“ bei 620 nm gemessen. Weitere OD<sub>620</sub>-Messungen wurden 5, 10, 20, 30 und 40 min nach rPlyG-Zugabe

durchgeführt, wobei die Platte vor jeder Messung vom Plattenphotometer automatisch geschüttelt wurde.

### 3.6.3 Entwicklung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests

#### Kolorimetrischer rPlyG-Lysetest (vorläufiges Protokoll)

Aufbauend auf die Erfahrungen im Rahmen einer von der Autorin mitbetreuten Diplomarbeit von LANG (2006) wurde ein erstes Protokoll zur Durchführung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests erstellt. Ab diesem Zeitpunkt der Untersuchungen wurden auch die *B. anthracis*-Isolate in die Untersuchung mit einbezogen und alle Messungen wurden am „Mikronaut Skan Plate Reader“ im Sicherheitslabor des Instituts vorgenommen. Da dieses Gerät einen Filter mit 540 nm enthält, wurde nun auch die Wellenlänge, bei der die weiteren Messungen durchgeführt wurden, auf 540 nm umgestellt. Für die Durchführung wurde das zu testende Bakterienisolat auf Std.-I-Agar ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Etwa 1,5 cm<sup>2</sup> des Bakterienrasens wurden mit einer 10 µl-Impföse abgenommen und in 3 ml PBS in einem 15 ml-Zentrifugengefäß überführt. Dann wurde die Bakteriensuspension resuspendiert und auf zwei 2 ml-Zentrifugengefäße mit jeweils 1,5 ml aufgeteilt. Ein Röhrchen diente als Positivansatz und wurde mit der rPlyG-Lösung (Endkonzentration 6 µg/ml) beimpft. In das zweite Röhrchen, welches den Negativansatz enthielt, wurde dasselbe Volumen PBS zugegeben. Zusätzlich wurde ein Röhrchen mit 1,5 ml PBS mit der rPlyG-Lösung (Endkonzentration 6 µg/ml) zur Ermittlung des Nullwertes mitgetestet. Die Röhrchen wurden bei RT für 45 min inkubiert und in dieser Zeit mehrmals geschüttelt. Nach der Inkubation wurden alle Ansätze mit einem Spritzenfilter (0,45 µm) sterilfiltriert und jeweils 100 µl des Filtrats in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert. In jede Vertiefung wurden jeweils 200 µl des frisch angesetzten BCA-Reagenz (siehe 3.3.3) zupipettiert. Nach der Inkubation für 5 min bei RT wurde die OD<sub>540</sub> im Plattenphotometer ermittelt. Nach Abzug des Nullwertes wurde die Differenz aus dem OD<sub>540</sub>-Wert mit Lysinzugabe (Positivansatz) und dem OD<sub>540</sub>-Wert ohne Lysinzugabe (Negativansatz) errechnet und diese für die Beurteilung der rPlyG-Aktivität herangezogen. Dieser Ergebniswert wird an Hand des definierten Grenzwertes von 0,05 beurteilt.

Die zur Berechnung verwendete Gleichung lautet:

$$\text{Ergebniswert } \Delta \text{ OD}_{540} = (\text{OD}_{540} \text{ des Positivansatzes} - \text{OD}_{540} \text{ des Nullwertes}) - (\text{OD}_{540} \text{ des Negativansatzes} - \text{OD}_{540} \text{ des Nullwertes})$$

### **Kolorimetrischer rPlyG-Lysetest (endgültiges Protokoll)**

Um den Test für den Nachweis von *B. anthracis* und das Arbeiten in einem S3-Labor anzupassen waren einige Änderungen des Protokolls nötig. Folgende Änderungen wurden vorgenommen, um die Spezifität und Sensitivität zu erhöhen: Zusatz von Lysozym im Agar, Bebrütungsdauer, Volumenreduktion, zusätzlicher Waschschrift mit PBS, Zentrifugation statt Sterilfiltration, veränderte Inkubationszeit und -temperatur des BCA-Reagenz und Abkleben der Mikrotiterplatte zur Messung.

Der zu testende Keim wird auf einer Std.-I-Agar-Platte (mit Zusatz von 300.000 U/l Lysozym) ausgestrichen und für 6 h (evtl. zusätzlich ü. N.) bei 37 °C bebrütet. Mit einer 10 µl-Impföse wird etwa 1 cm<sup>2</sup> Bakterienmaterial abgenommen und in 1 ml PBS in einem 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen resuspendiert. Nach Abzentrifugieren bei 14.000 x g für 10 min wird das Pellet erneut in 1 ml PBS resuspendiert und anschließend auf zwei Zentrifugenröhrchen mit je 500 µl aufgeteilt. Zu einem der beiden Gefäße wird die rPlyG-Lösung (Endkonzentration 6 µg/ml) gegeben und gut gemischt, in das andere dasselbe Volumen an PBS, um eine einheitliche Bakterienkonzentration zu erhalten. Zusätzlich wird ein Röhrchen mit 500 µl PBS und gleicher Menge rPlyG als Nullwert mitgeführt. Nach 45-minütiger Inkubation bei RT werden alle Zentrifugenröhrchen bei 14.000 x g abzentrifugiert und jeweils 100 µl des Überstandes in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. In jede Vertiefung werden 200 µl BCA-Reagenz dazupipettiert, welches nach Herstellerangaben aus Reagenz A und Reagenz B (siehe 3.3.3) angesetzt wird. Die Platte wird anschließend mit einer Polypropylenfolie abgeklebt. Nach Inkubation bei 30 °C für 30 min wird die OD<sub>540</sub> im Plattenphotometer gemessen. Nach Abzug des Nullwertes kann die Differenz aus dem OD<sub>540</sub>-Wert mit rPlyG-Zugabe und dem OD<sub>540</sub>-Wert ohne rPlyG-Zugabe errechnet werden. Die ermittelte Differenz wird an Hand des definierten Grenzwertes von 0,07 für die Beurteilung des Testergebnisses herangezogen.

Die zur Berechnung verwendete Gleichung lautet:

$$\text{Ergebniswert } \Delta \text{ OD}_{540} = (\text{OD}_{540} \text{ des Positivansatzes} - \text{OD}_{540} \text{ des Nullwertes}) - (\text{OD}_{540} \text{ des Negativansatzes} - \text{OD}_{540} \text{ des Nullwertes})$$

Die Abb. 5 zeigt die Verfärbung des BCA-Reagenz in den ersten beiden Vertiefungen links nach Inkubation mit rPlyG, wogegen die rechten Vertiefungen ohne rPlyG hell bleiben. Ebenfalls keine Verfärbung zeigen beide Vertiefungen der Negativkontrolle B181. Bei eindeutig positiver Reaktion ist diese Auswertung auch mit bloßem Auge möglich.

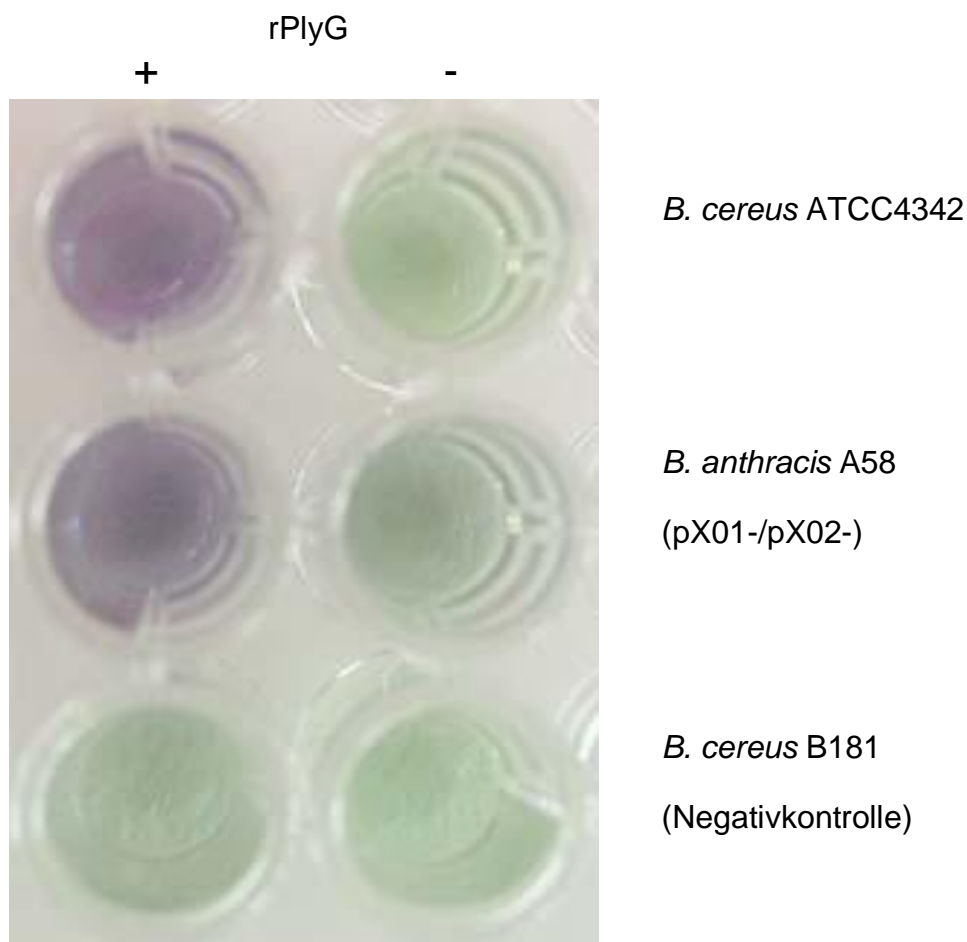


Abb. 5: Ausschnitt einer Mikrotiterplatte nach Durchführung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests mit den drei Referenzstämmen.

### 3.6.4 Wirkung des rPlyG auf bekapselte Isolate

Um die Wirksamkeit des rPlyG auf bekapselte Isolate zu überprüfen, wurden einige *B. anthracis*-Isolate, die das pXO1-Plasmid besitzen, der *B. anthracis*-Stamm A58 ohne pXO1-Plasmid und als Negativkontrolle der *B. cereus*-Stamm B181 unter gleichen Bedingungen auf TS-Agar angezüchtet. Dabei wurde das Protokoll zur Kapselbildung bei Anzucht auf festem Nährmedium (siehe 3.5.3) angewandt. Nach der Anzucht wurde die Ausbildung der Kapsel durch Tuschkontrastierung überprüft und das Bakterienmaterial von dieser Platte direkt für die Durchführung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests verwendet.

Für die Untersuchung von Bakterien in Flüssigkultur wurden die Bakterien im Doppelansatz in 5 ml FKS ohne bzw. mit 0,7 % NaHCO<sub>3</sub> in einer Atmosphäre mit 20 % CO<sub>2</sub> über Nacht bebrütet. Nach Überprüfung der Kapselbildung mittels Kapselfärbung wurde 1 ml der Bouillon bei 14.000 x g abzentrifugiert und anschließend in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Lysinwirkung nach dem endgültigen Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests überprüft (siehe 3.6.3).

### 3.6.5 Einsatz des rPlyG zur DNA-Präparation aus Bakterien

#### DNA-Präparation aus vegetativen Bakterienzellen

Ein *B. anthracis*-Isolat wurde auf Std.-I-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Mit einer 1 µl Impföse wurde großzügig Material des Bakterienrasens abgenommen und in 200 µl Puffer, der in einem 1,5 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt wurde, resuspendiert. Zum Vergleich wurden vier verschiedene Reaktionsmedien getestet: H<sub>2</sub>O ddion., PBS, TE-Puffer und 10-fach konzentrierter Taq-Reaktionspuffer. Jeder Puffer wurde in 3-fachem Ansatz mit Bakterien versetzt und die anschließende Präparation mit drei verschiedenen Methoden durchgeführt und verglichen. Beim ersten Versuchsansatz wurde die Bakteriensuspension lediglich für 20 min mit der rPlyG-Lösung (Endkonzentration 4 µg/ml) bei 37 °C inkubiert. Im zweiten Versuchsansatz wurde mit der Bakteriensuspension nach der Inkubation mit rPlyG zusätzlich einer Kochlyse durchgeführt. Im dritten Versuchsansatz wurde nur die im Labor standardisierte

Methode der Kochlyse angewandt. Für die Kochlyse wurde die Suspension für 5 min bei 100 °C inkubiert.

Nach der Durchführung der Präparation wurden alle Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 14.000 x g abzentrifugiert und der Überstand anschließend mit dem Spritzenfilter „Acrodisc“ mit 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert. Die Qualität der im Filtrat enthaltenen DNA wurde dann mittels LightCycler-PCR (siehe 3.5.4) und Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.8) beurteilt. In einem weiteren Versuchsansatz wurde außerdem die Wirkung unterschiedlicher Lysinkonzentrationen miteinander verglichen.

### **DNA-Präparation aus Sporen**

Für die Präparation wurden Sporensuspensionen eines *B. anthracis*-Isolates mit den Konzentrationen  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^4$  und  $2 \times 10^2$  KBE/ml verwendet. Davon wurden jeweils 1 ml bei 14.000 x g für 5 min abzentrifugiert und die Pellets in je 100 µl Germinationspuffer (PBS mit 100 mM L-Alanin und 1 mM Inosin) resuspendiert. Nach Zugabe der rPlyG-Lösung (Endkonzentration 10 µg/ml) wurde die Sporensuspension für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde wie bei den vegetativen Zellen sterilfiltriert und anschließend in der LightCycler-PCR (siehe 3.5.4) und auf einem Agarosegel (siehe 3.2.8) analysiert. In weiteren Versuchen wurden einerseits die Lysinkonzentration und die Inkubationszeit erhöht und andererseits die Sporensuspension zunächst für 15 min bzw. 30 min bei 37 °C im Germinationspuffer inkubiert, bevor das rPlyG zugegeben wurde.

## **3.7 Untersuchung der Langzeitlagerung des rPlyG**

### **3.7.1 Anwendung unterschiedlicher Lagerpuffer**

Zur Überprüfung der rPlyG-Stabilität wurde eine Produktionscharge des rPlyG in sechs verschiedenen Puffern aufgenommen und in 100 µl Aliquots tiefgefroren. Nach bestimmten Lagerzeiten wurde jeweils ein Aliquot aufgetaut und die Aktivität des rPlyG im rPlyG-Aktivitätstest (siehe 3.6.2) bei einer rPlyG-Endkonzentration von 8 µg/ml überprüft.

Verwendete Lagerpuffer:

1. 5 mM HEPES-Puffer, pH 7,5, Lagerung bei -80 °C
2. 5 mM HEPES-Puffer, pH 7,5, schockgefroren in flüssigem Stickstoff, Lagerung bei -80 °C
3. 5 mM HEPES-Puffer mit 20 mg/ml BSA, pH 7,5, Lagerung bei -80 °C
4. 5 mM HEPES-Puffer mit 50 % Glycerol, pH 7,5, Lagerung bei -20 °C
5. Lagerpuffer (5 mM HEPES-Puffer mit 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 50 µM DTT) mit 50 % Glycerol, pH 7,5, Lagerung bei -20 °C
6. Lagerpuffer (5 mM HEPES-Puffer mit 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 50 µM DTT) mit 20 mg/ml BSA und 50 % Glycerol, pH 7,5, Lagerung bei -20 °C

### **3.7.2 Lagerung nach Lyophilisation**

Eine weitere Charge wurde in 500 µl Aliquots bei -80 °C tiefgefroren und anschließend vom Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität Hohenheim lyophilisiert. Der rPlyG-Aktivitätstest (siehe 3.6.2) wurde vor bzw. direkt nach der Lyophilisation und nach 3, 5 und 8 Monaten Lagerung bei 4 °C durchgeführt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellung des rekombinanten PlyG

#### 4.1.1 Klonierung des rPlyG in einen *E. coli*-Stamm

Zunächst wurde das *plyG*-Gen mit dem bereits vorhandenen Plasmid pQE30-[ATG]PlyG3 (LEMNITZER, 2005) als Template amplifiziert und in das Plasmid pBAD/gIII A kloniert. Dazu wurden zwei verschiedene Primerkombinationen verwendet: Primerpaar A (pBADlys-f, pBADlys-ros) und Primerpaar B (pBADlys-f, pBADlys-rms). Die mittels PCR entstandenen DNA-Fragmente wurden nach der Aufreinigung zusammen mit dem neuen Vektor pBAD/gIII A einer Restriktionsspaltung mit den Endonucleasen HindIII und NcoI unterzogen. Zur Gewinnung des Vektors und der Inserts wurde ein präparatives Gel angefertigt (siehe 3.2.8). Nach der Ligation wurden diese Vektoren und der als Positivkontrolle dienende Vektor pBAD/gIII/calmodulin in kompetente Zellen des *E. coli* Top10F' transformiert und auf Selektivagar ausgestrichen. Einzelne der entstandenen Kolonien wurden ausgewählt und in Nährbouillon mit Antibiotikazusatz über Nacht bebrütet, um die Plasmid-DNA zu gewinnen (siehe 3.2.6).

Zur Kontrolle wurde eine erneute Restriktionsspaltung durchgeführt und die Proben auf ein analytisches Gel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Inserts in den jeweiligen Vektor eingebaut worden waren. Abb. 6 zeigt, dass die Ligation bei allen ausgewählten Kolonien erfolgreich war, denn nach einer erneuten Spaltung sind im Agarosegel jeweils bei einer Größe von etwa 700 bp Banden zu erkennen, die den Inserts mit einer bekannten Größe von 702 bp (SCHUCH et al., 2002) entsprechen.

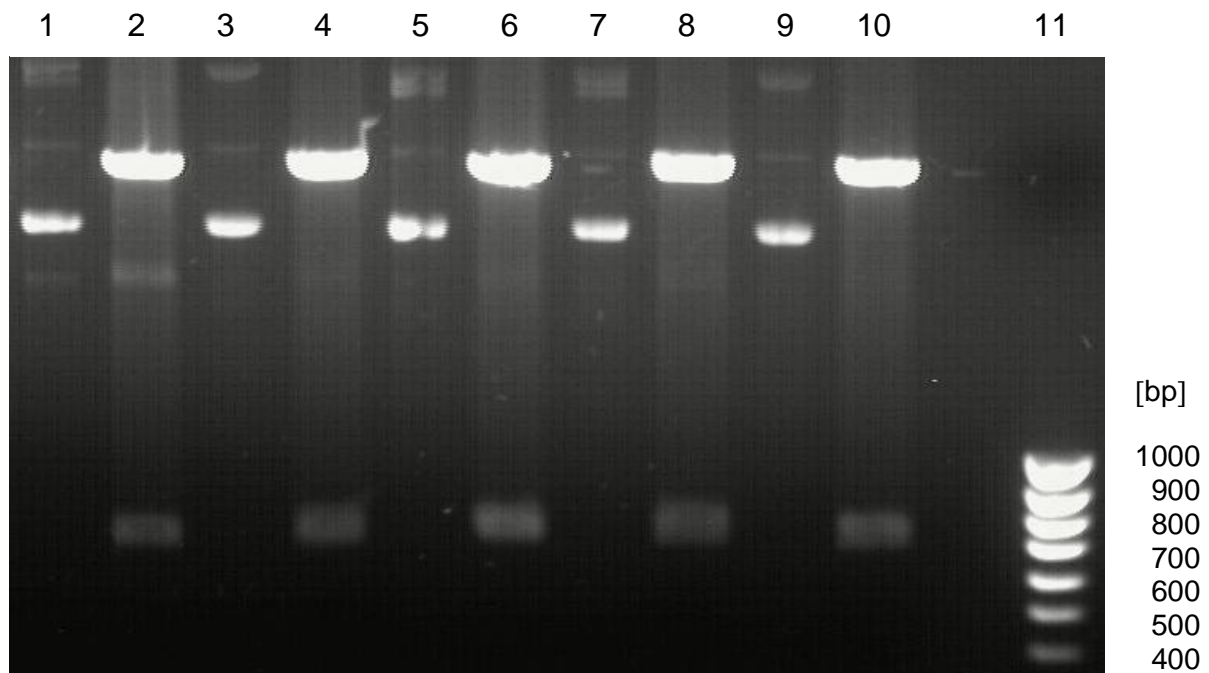


Abb. 6: 1 %-iges Agarosegel mit Plasmid-DNA nach erneuter Restriktionsspaltung zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation.

Bahnen 1, 3, 5, 7, 9:	DNA vor Restriktionsspaltung
Bahnen 2, 4, 6, 8, 10:	DNA nach Restriktionsspaltung
Bahn 11:	Marker, Fermentas Gene Ruler, 100 bp

#### 4.1.2 Expressionstest

Durch einen Expressionstest wurde abgesichert, dass der hergestellte rekombinante *E. coli*-Klon das rPlyG produzierte. Proben der Kulturen wurden dazu vor und nach der Induktion entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 3.3.4). Die Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. In Abb. 7 sind zwischen den Kontrollbanden von 25 und 35 kDa bei den Bahnen 3 und 5 jeweils zusätzliche Banden sichtbar, die die Expression des rPlyG mit einer molekularen Masse von 27 kDa bestätigen. Die Bahn 7 (Positivkontrolle) zeigt das exprimierte Protein Calmodulin bei etwa 25 kDa, was der vorgegebenen molekularen Masse von 25 - 30 kDa (INVITROGEN) entspricht.

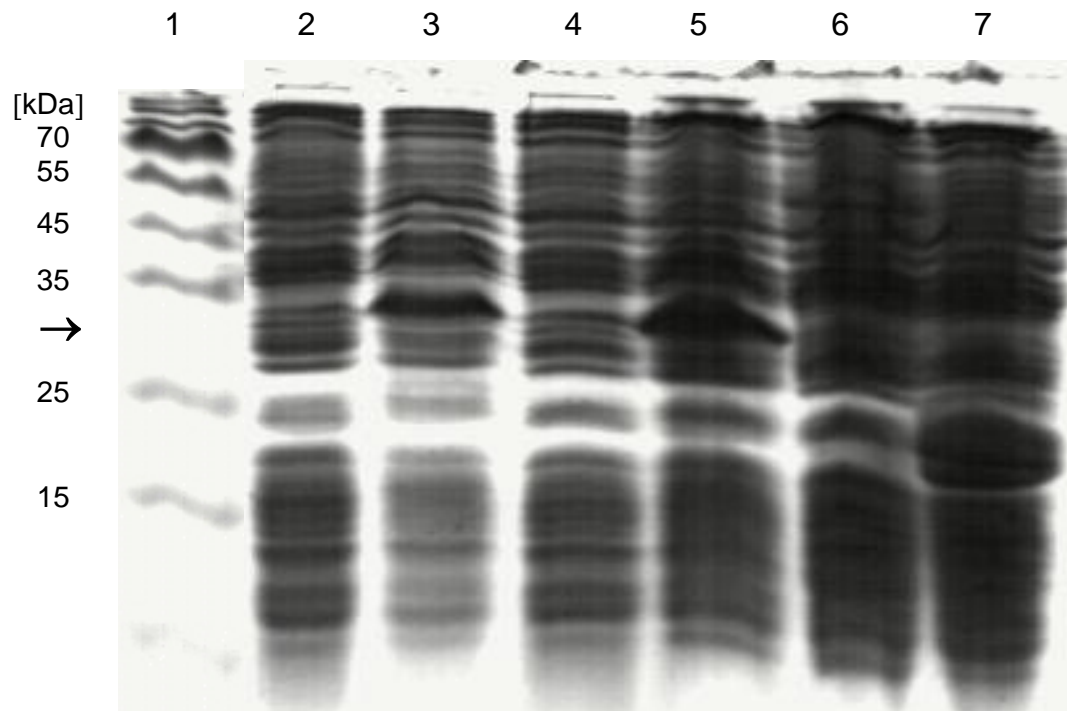


Abb. 7: Analyse der Bakterienlysate von *E. coli* Top10F'-Stämmen jeweils vor und nach Induktion mittels Coomassie-gefärbtem SDS-PAGE-Gel (Pfeil zeigt die zusätzliche Bande des rPlyG).

- Bahn 1: peqGOLD Protein Marker IV (prestained)  
 Bahnen 2, 4: Zellkultur von *E. coli* Top10F' pBAD/gIII rPlyG vor Induktion  
 Bahnen 3, 5: Zellkultur von *E. coli* Top10F' pBAD/gIII rPlyG nach 4 h Induktion mit L-Arabinose  
 Bahn 6: Negativkontrolle, *E. coli* Top10F' ohne Vektor  
 Bahn 7: Positivkontrolle, *E. coli* Top10F' pBAD/gIII calmodulin

Mit Hilfe des osmotischen Schocks sollte die Ausbeute bei der Gewinnung von rPlyG erhöht werden. Dabei sollte der Vektor pBAD/gIII A dafür sorgen, dass es zu einer Sekretion des rekombinanten Proteins in das Periplasma des *E. coli*-Vektorstamms kommt. Diese Sekretion wird durch die gIII-Signalsequenz ausgelöst. Da im Periplasma im Vergleich zum Zytoplasma kein reduzierendes Milieu herrschte, sollten die Ausbildung von Schwefelbrücken und damit eine korrekte Faltung gewährleistet sein. Durch einen osmotischen Schock wurde die Zellwand zum Platzen gebracht, um die Inhaltsstoffe des Periplasmas selektiv der Analyse zugänglich zu machen und um zu prüfen, ob sich das rPlyG im periplasmatischen Raum befand.

Nach der Durchführung des osmotischen Schocktests (siehe 3.2.9) wurden die Bakterienfraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. In der Analyse war deutlich zu

erkennen, dass eine Expression des rPlyG mit einer molaren Masse von 27 kDa stattgefunden hat. Dies ist an der breiten Bande in Bahn 3 der Abb. 8 zu erkennen. Allerdings befand sich das Protein im Zellpellet, was bedeutet, dass keine Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum der Zelle stattgefunden hatte. Im Vergleich dazu erkennt man an der Positivkontrolle in Bahn 7, dass das Calmodulin mit einer zu erwartenden molaren Masse von 25 – 30 kDa ins Periplasma sekretiert wurde, da es nach dem osmotischen Schock im Überstand nachzuweisen war. Dies bestätigte gleichzeitig die korrekte Durchführung des Tests.

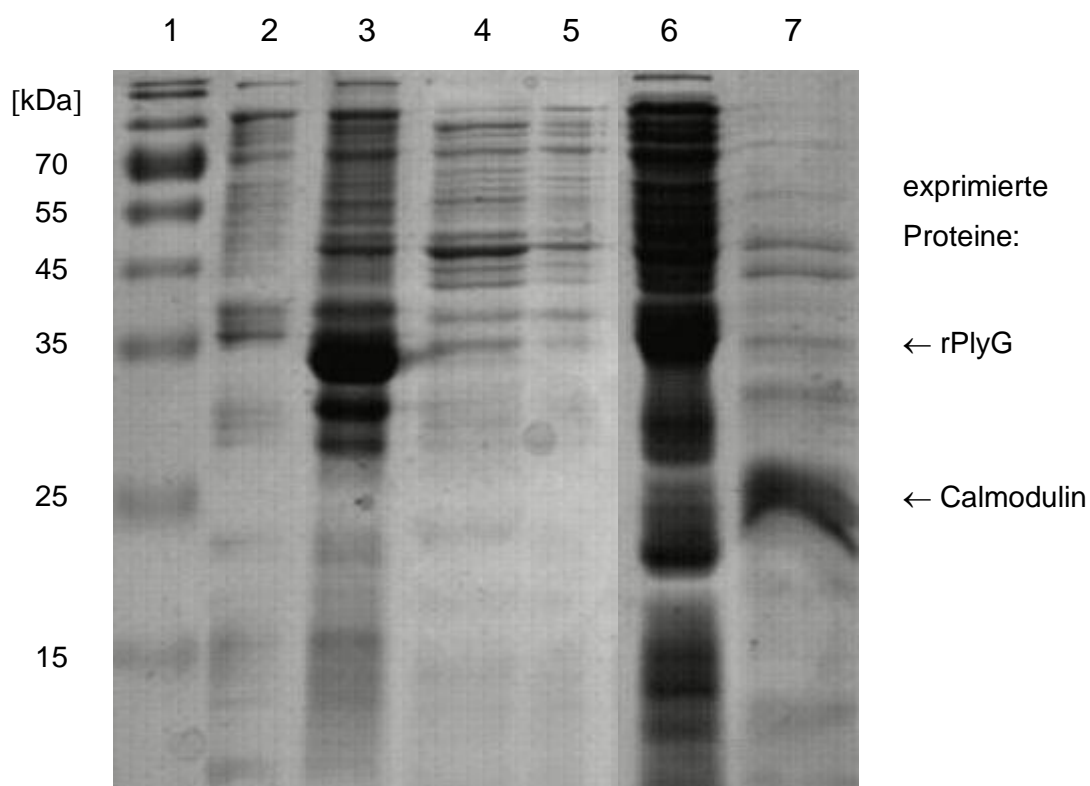


Abb. 8: Analyse der im osmotischen Schocktest hergestellten Bakterienfraktionen des *E. coli*-Stammes Top10F' mittels Coomassie-gefärbtem SDS-PAGE-Gel.

- Bahn 1: peqGOLD Protein Marker IV (prestained)
- Bahn 2: Zellpellet der Probe vor Induktion
- Bahn 3: Zellpellet der Probe nach Induktion und osmotischem Schock
- Bahn 4: Zellüberstand der Probe vor Induktion
- Bahn 5: Zellüberstand der Probe nach Induktion und osmotischem Schock
- Bahn 6: Zellpellet der Positivkontrolle nach Induktion und osmotischem Schock
- Bahn 7: Zellüberstand der Positivkontrolle nach Induktion und osmotischem Schock

Anschließend wurde das Plasmid pBAD/gIII rPlyG in den Arabinose-sensitiven *E. coli*-Stamm LMG194 kloniert und der Test erneut durchgeführt. Hier war nach 4 h Induktion kaum eine Expression zu erkennen, so dass der Versuch mit verlängerter Induktionszeit von 6 h wiederholt wurde. Doch auch nach 6 h Inkubation konnte nur eine schwache Expression nachgewiesen werden. Das Protein befand sich ebenfalls im Zytoplasma, nicht im Periplasma.

Nach diesen Ergebnissen wurden die Versuche zur Expression von rPlyG im Periplasma eingestellt und alle weiteren Arbeiten mit dem in der Diplomarbeit von LEMNITZER (2005) hergestellten gentechnisch veränderten Organismus *E. coli* OrigamiB pQE60 plyG3 pREP4 RIL durchgeführt. Dieser Stamm besitzt eine Reduktasedefizienz und ermöglicht so auch im Zytoplasma eine korrekte Ausbildung der Schwefelbrücken im rekombinanten Protein. Für alle weiteren Schritte wurden die optimierten Expressionsbedingungen der Untersuchungen von LEMNITZER (2005) übernommen. Abb. 9 zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-PAGE-Gel, in dem die gesteigerte Expression nach Induktion (Bahn 3) zu erkennen ist. In Bahn 2 ist zu erkennen, dass auch vor der Induktion eine geringe Menge rPlyG exprimiert wurde. Dies lässt darauf schließen, dass die Repressorfunktion die Expression nicht vollständig unterdrückt. Dies zeigte allerdings keinen negativen Einfluss auf die eigentliche Expression, die mittels Induktion erheblich gesteigert werden konnte.

#### 4.1.3 Aufreinigung mittels FPLC

Für die Aufreinigung des Bakterienlysats an der Anionenaustauschsäule (AEX) wurden pH-Werte der Puffer unter dem isoelektrischen Punkt des rPlyG von 8,51 gewählt. Dadurch war das Protein negativ geladen und band somit nicht an die Matrix der AEX, sondern konnte im Durchfluss aufgefangen werden. Andere Proteine, die positiv geladen waren, banden an der Säule und konnten so vom rPlyG getrennt werden. Die Verwendung von 50 mM Tris-Puffer mit 20 mM NaCl bei pH 8 brachte die besten Trennerfolge und führte zum geringsten Verlust an rPlyG (siehe Abb. 9). Alle anderen Ansätze hatten das Problem, dass zum Teil auch das rPlyG an die Säule band und somit im Eluat nachzuweisen war.

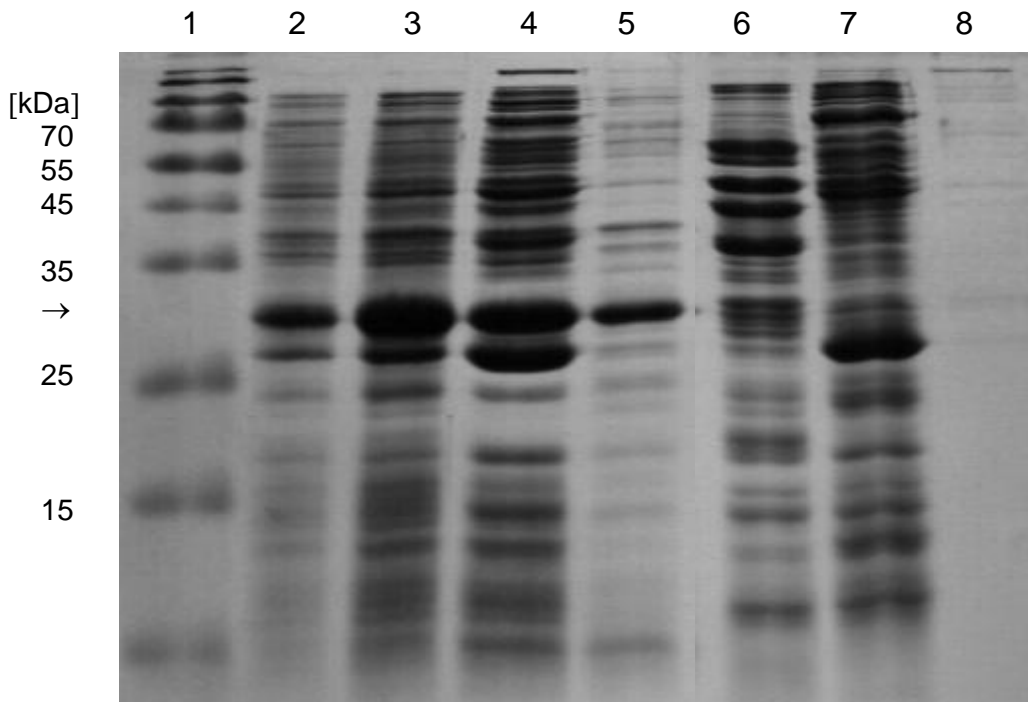


Abb. 9: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel zur Analyse einer Bakteriensuspension von *E. coli* OrigamiB pQE60 plyG3 pREP4 RIL und dessen Lysat sowie das mittels FPLC über die 1 ml-Anionenaustauschsäule mit 50 mM Tris-Puffer, 20 mM NaCl, pH 8 aufgereinigte Lysat. Der Pfeil markiert die Lage des rPlyG.

- |                 |  |
|-----------------|--|
| Bahn 1:         | peqGOLD Protein Marker IV (prestained)                 |
| Bahn 2:         | Bakteriensuspension vor der Induktion                  |
| Bahn 3:         | Bakteriensuspension nach 4 h Induktion                 |
| Bahn 4:         | Bakterienlysat nach Aufschluss durch Ultraschallwellen |
| Bahn 5:         | Durchfluss der AEX                                     |
| Bahnen 6, 7, 8: | Eluatpeaks der AEX                                     |

Für den zweiten Reinigungsschritt an der Kationenaustauschsäule (CEX) wurde ebenfalls ein pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes gewählt, um nun eine Bindung des rPlyG an die Säulenmatrix zu erreichen. Für die Elution des Proteins wurde ein Salzgradient in unterschiedlichen Konzentrationen und Steilheiten getestet. Am effektivsten für diesen Reinigungsschritt erwies sich ein 50 mM Tris-Puffer bei pH 6. Der Elutionspuffer mit 1 M NaCl führte im flach ansteigenden Gradienten ab einer Konzentration von etwa 150 mM NaCl zur Elution des an die Säule gebundenen Proteins. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 10 ersichtlich.

Die ersten Optimierungsversuche wurden mit zwei unterschiedlichen Puffern für AEX und CEX durchgeführt. Dies führte jedoch zu Problemen bei der Dialyse, da hier große Mengen an Protein ausfielen und Proteinverluste von bis zu 80 %

auftraten. Auch ein stufenweises Dialysieren mit langsam absinkendem pH-Wert brachte keine Verbesserung. Deshalb wurden Aufreinigungsverfahren getestet, bei denen die AEX und die CEX in demselben Puffersystem arbeiteten. Doch auch hier kam es zu Ausfällungen bei der Absenkung des pH-Wertes vor dem zweiten Reinigungsschritt. Deshalb wurde nach erfolgloser Testung verschiedener Puffersysteme die pH-Senkung durch einen Verdünnungsschritt herbeigeführt. Durch die Verdünnung von 1:3 der Probe mit einem Puffer mit niedrigem pH-Wert von 1,8, wurde der pH-Wert der Probe sehr schonend gesenkt und Ausfällungen größtenteils verhindert. Gleichzeitig war dieser Verdünnungsschritt unbedingt notwendig, um den Salzgehalt des Starterpuffers der AEX zu reduzieren, da sonst die Bindung des rPlyG an die CEX behindert worden wäre.

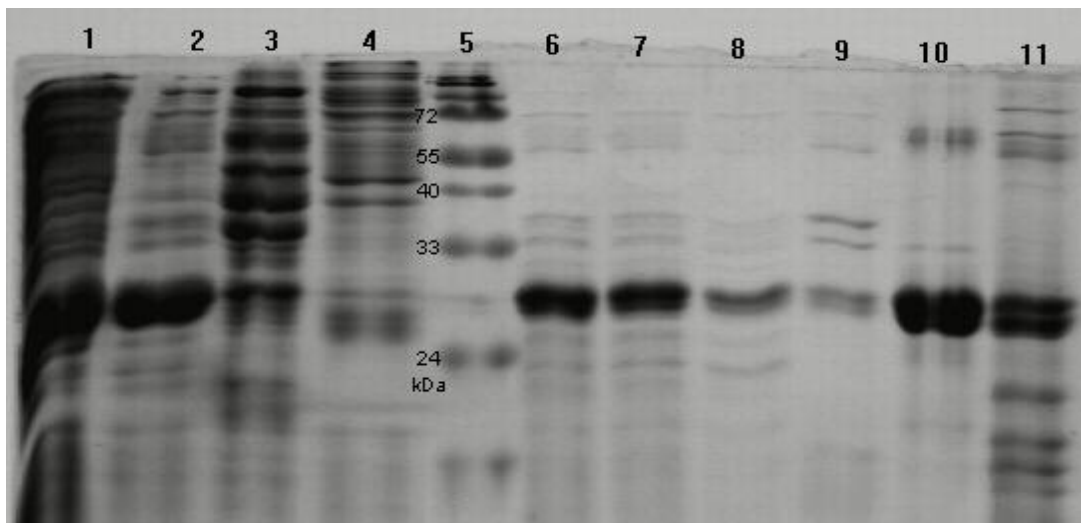


Abb. 10: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel zur Analyse des Bakterienlysats von *E. coli* OrigamiB pQE60 plyG3 pREP4 RIL nach Aufreinigung mittels FPLC über die 5 ml-Anionenaustauschsäule mit 50 mM Tris-Puffer, 20 mM NaCl, pH 8 und die 5 ml-Kationenaustauschsäule mit 50 mM Tris-Puffer, pH 6.

- Bahn 1: Bakterienlysats nach Zellaufschluss
- Bahn 2: Durchflussfraktionen der AEX
- Bahn 3: Erster Eluatpeak der AEX
- Bahn 4: Zweiter Eluatpeak der AEX
- Bahn 5: peqGOLD Protein Marker IV (prestained)
- Bahn 6: Durchflussfraktion der AEX nach Einstellung auf pH 6 und Zentrifugation
- Bahn 7: Durchflussfraktionen der AEX nach Filtration
- Bahn 8: Durchflussfraktion der CEX (Hauptpeak)
- Bahn 9: Durchflussfraktion der CEX (Nebenpeak)
- Bahn 10: erster Eluatpeak der CEX
- Bahn 11: zweiter Eluatpeak der CEX

#### 4.1.4 Entfernung von Endotoxin

Die Bestimmung des Endotoxingehalts von mehreren Chargen rPlyG-enthaltenden Eluaten der Kationenaustauschsäule ergab Werte von  $> 10$  EU/ $\mu$ g Protein. Während für diagnostische Anwendungen der Endotoxingehalt ohne Bedeutung ist, wäre der Einsatz des Materials an eukaryontischen Zellen sowohl in vitro als auch in vivo ausgeschlossen. Das rPlyG sollte jedoch nicht nur für diagnostische Zwecke in dieser Arbeit sondern auch in einer weiteren Dissertationsarbeit als Therapeutikum getestet werden. Daher war ein weiterer Reinigungsschritt erforderlich. Durch die Reinigung über die „EndoTrap blue“-Säule konnte eine Reduktion des Endotoxingehalts auf  $< 5$  EU/ml (0,05 EU/ $\mu$ g Protein) erreicht werden. Dies entspricht einer Reduktion von mehr als 99 % mit einer Wiederfindungsrate des Proteins von etwa 95 %.

## 4.2 Vorversuche zur Entwicklung eines diagnostischen rPlyG-Lysetests

### 4.2.1 Ermittlung der OD<sub>600</sub>-Abnahme zum Nachweis der Lyse

Erste Versuche die Wirksamkeit des rPlyG nachzuweisen, wurden über die Messung der OD<sub>600</sub>-Reduktion durchgeführt. Die Messung der OD bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600$  nm korreliert in der Regel mit der Keimzahl der Bakteriensuspension. Somit kann aus der Abnahme des OD<sub>600</sub>-Wertes auf eine Abnahme der Keimzahl geschlossen werden. Dieser Zusammenhang sollte überprüft werden, indem die Keimzahl einer Bakteriensuspension des Stammes *B. cereus* ATCC4342 mit unterschiedlichen OD<sub>600</sub>-Werten über das Kochsche Oberflächenverfahren bestimmt wurde. Diese Keimzahlbestimmung wurde mehrmals wiederholt. Die Korrelation zwischen der Keimzahl und der OD<sub>600</sub> wurde für eine Suspension von *B. cereus* ATCC4342 in Std.-I-Bouillon in der Abb. 11 graphisch dargestellt. Bei der Betrachtung der Ergebnisse wurde vor allem im Bereich der hohen OD<sub>600</sub>-Werte eine deutliche Streuung um die errechnete Korrelationskurve erkennbar. So wurden bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,7 Keimzahlen zwischen  $7,7 \times 10^6$  und  $6 \times 10^7$  ermittelt. Dies führte zu der Erkenntnis, dass über



die alleinige Messung der  $OD_{600}$  keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die Abnahme der Zellzahl möglich sind.

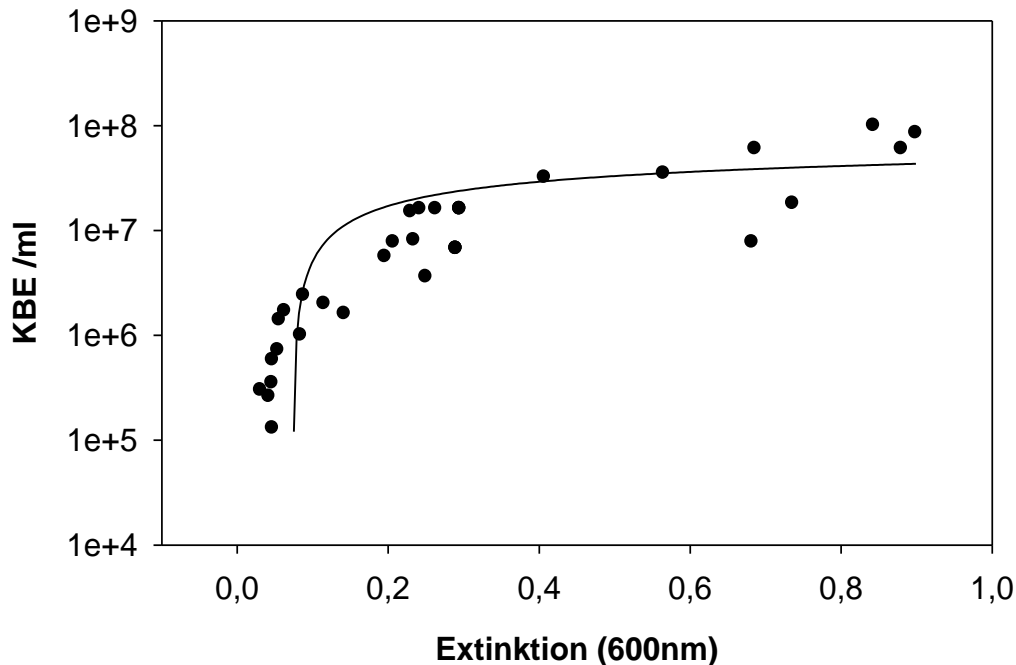


Abb. 11: Korrelation zwischen der Keimzahl (KBE/ml) und der  $OD_{600}$  einer Suspension von *B. cereus* ATCC4342 in Std.-I-Bouillon.

#### 4.2.2 Optimierung der Lysebedingungen

Die Entwicklung eines diagnostischen Tests erforderte, dass zuerst die optimalen Reaktionsbedingungen für die Wirksamkeit des rPlyG ermittelt wurden. Anschließend wurde der Test weiter optimiert und schließlich mit über 300 verschiedenen *Bacillus* spp.-Isolaten getestet. Alle Optimierungsarbeiten wurden zunächst mit den drei Referenzstämmen durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten die  $\gamma$ -Phagen- und rPlyG-sensitiven Stämme *B. cereus* ATCC4342 und *B. anthracis* A58. Der *B. cereus*-Stamm B181 diente als Negativkontrolle und zeigte somit weder gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen noch gegenüber dem rPlyG Sensitivität. Die Optimierungen der Testbedingungen bezogen sich auf die Art des Reaktionsmediums, den pH-Wert, die Temperatur, die Wachstumsphase, die Bakteriendichte und die rPlyG-Konzentration. Alle Optimierungsversuche außer der Temperaturbestimmung wurden nach dem unter 3.6.1 (Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest – Variante 2) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Für die Bestimmung der optimalen Wirktemperatur wurde das unter 3.6.1 (Turbidi-

metrischer rPlyG-Lysetest – Variante 1) beschriebene Protokoll angewandt, da das in Variante 2 für die OD-Messung verwendete Plattenphotometer keine Temperaturveränderung ermöglichte.

#### 4.2.2.1 Reaktionsmedium

Um zu ermitteln, in welchen Medien das rPlyG die höchste Aktivität zeigte, wurden die Bakterien in verschiedenen Medien resuspendiert und parallel im turbidimetrischen rPlyG-Lysetest (Variante 2) getestet. Dabei zeigte sich, dass in Nährmedien wie Std.-I-, BHI- und TS-Bouillon nur eine schlechte, in PBS dagegen eine sehr gute Lysewirkung nachweisbar war. Andere Puffer wie HEPES-Puffer und Tris-EDTA zeigten dagegen eine leicht reduzierte Lysewirkung. Durch Zusätze von Calcium, Magnesium, EDTA oder L-Alanin und Inosin konnte keine Veränderung der Lysewirkung beobachtet werden. HEPES-Puffer erwies sich als ungeeignet, da die Negativkontrolle (*B. cereus* B181) mit und ohne Zugabe von rPlyG eine Abnahme der OD<sub>620</sub> zeigte, was in allen anderen Medien nicht der Fall war. Ein Testansatz in Humanserum zeigte ebenfalls eine leichte Hemmung der rPlyG-Aktivität. In Abb. 12 sind die unterschiedlichen OD<sub>620</sub>-Abnahmen der Bakteriensuspensionen in drei verschiedenen Medien dargestellt. Aus diesen Testergebnissen ergab sich, dass alle weiteren rPlyG-Lysetests in PBS durchgeführt wurden.

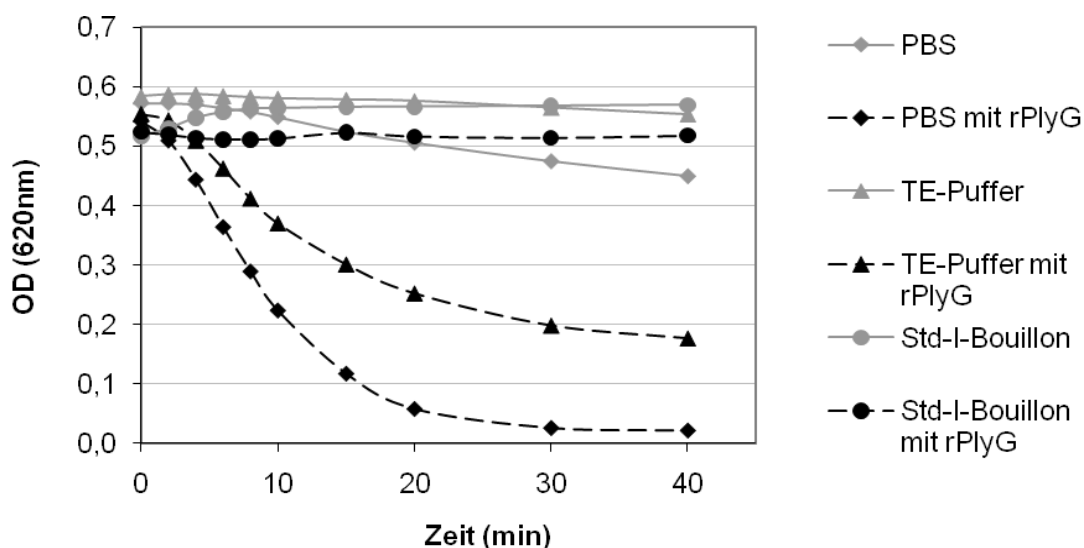


Abb. 12: Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 in unterschiedlichen Reaktionsmedien.

#### 4.2.2.2 pH-Wert

Die Aktivität des rPlyG zeigte sich sehr stabil gegenüber pH-Wert-Veränderungen. Versuche in PBS mit pH-Werten zwischen 2 und 12 wurden durchgeführt. Daraus ergab sich, dass die optimalen Bedingungen zwischen pH 7 und pH 9 lagen und die Aktivität darüber und darunter leicht vermindert war. Dies ist in Abb. 13 zu erkennen. Somit wurden die folgenden Untersuchungen bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt, da dies dem gängigen pH-Wert von PBS entspricht.

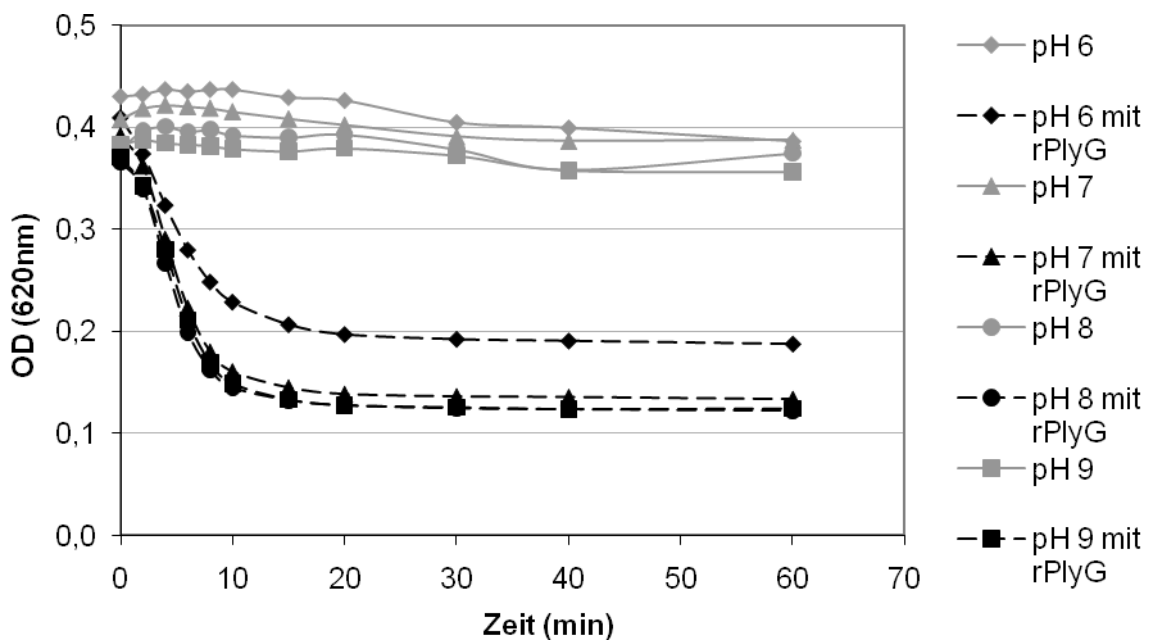


Abb. 13: Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von *B. anthracis* A58 in PBS bei unterschiedlichen pH-Werten.

#### 4.2.2.3 Temperatur

Zur Ermittlung der optimalen Temperatur musste die Variante 1 des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests nach Abschnitt 3.6.1 durchgeführt werden, da das in Variante 2 verwendete Plattenphotometer keine Möglichkeit der Temperaturkontrolle besaß. Es wurden Temperaturen von 4, 25, 30, 37 und 45 °C getestet. Da diese Tests in den Sommermonaten durchgeführt wurden, entsprachen 25 °C der Raumtemperatur. Zur Konstanthaltung der höheren Temperaturen während der Inkubation mit rPlyG wurde der Heizblock TB1 (Biometra, Göttingen) verwendet. Für den Test bei 4 °C wurden die Proben im Kühlschrank inkubiert.

Die Ergebnisse in Abb. 14 zeigen die größte  $OD_{600}$ -Abnahme des rPlyG zwischen 25 °C und 37 °C. Allerdings war ab 30 °C ebenso eine deutliche  $OD_{600}$ -Abnahme der Ansätze ohne Zugabe von rPlyG zu erkennen. Um diese unkalkulierbaren Veränderungen zu umgehen, wurde für die weiteren Lysetests eine Inkubationstemperatur von 25 °C (RT) festgelegt. Auch bei 4 °C und 45 °C war noch eine deutliche, jedoch etwas verminderte Aktivität des rPlyG nachweisbar.

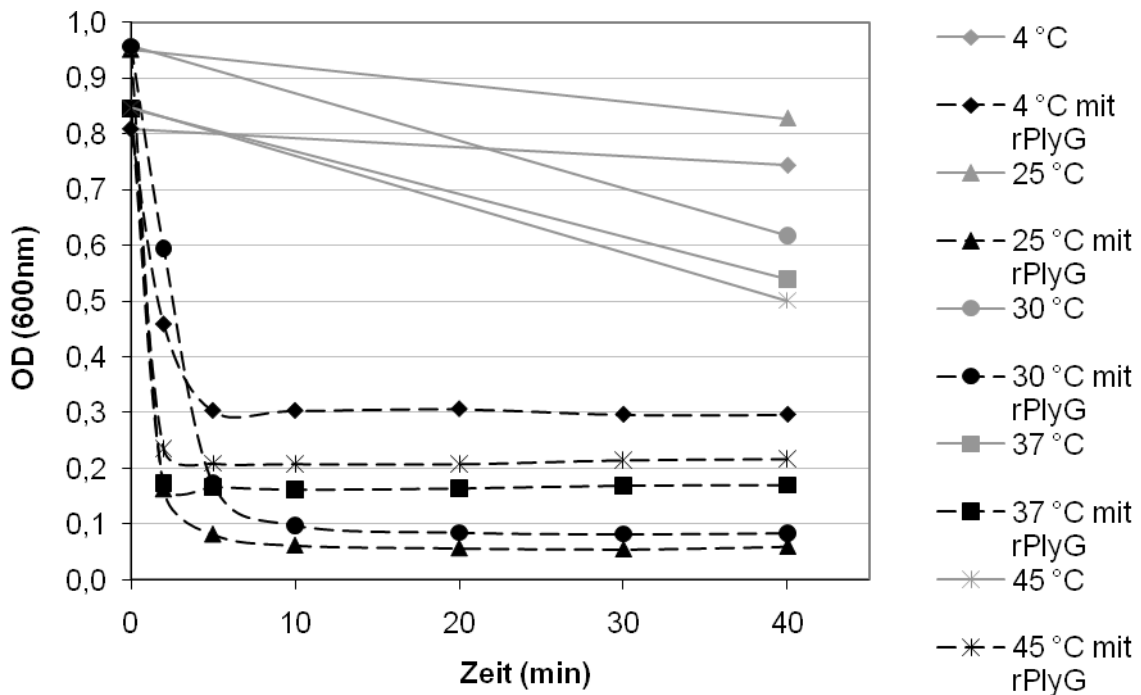


Abb. 14: Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 1) mit einer Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 in PBS bei unterschiedlichen Temperaturen.

#### 4.2.2.4 Wachstumsphase

Die Versuche zur Entwicklung des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests wurden mit ü. N.-Kulturen der Bakterien durchgeführt. Dies zeigte bei Tests mit *Bacillus* spp.-Isolaten im Vergleich zu Kulturen in früheren Wachstumsphasen keine anderen Ergebnisse (siehe Abb. 15) und war für die Durchführung des Tests am besten in die Arbeitsabläufe zu integrieren. Für diese Untersuchung wurde eine Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 unterschiedlich lange bei 37 °C inkubiert, so dass sich die Bakterien in unterschiedlichen Wachstumsphasen befanden. Diese wurden über die  $OD_{600}$  ermittelt. Anschließend wurden alle in PBS bis zu einer einheitlichen  $OD_{600}$  von etwa 0,5 verdünnt und im turbidimetrischen rPlyG-Lysetest untersucht.

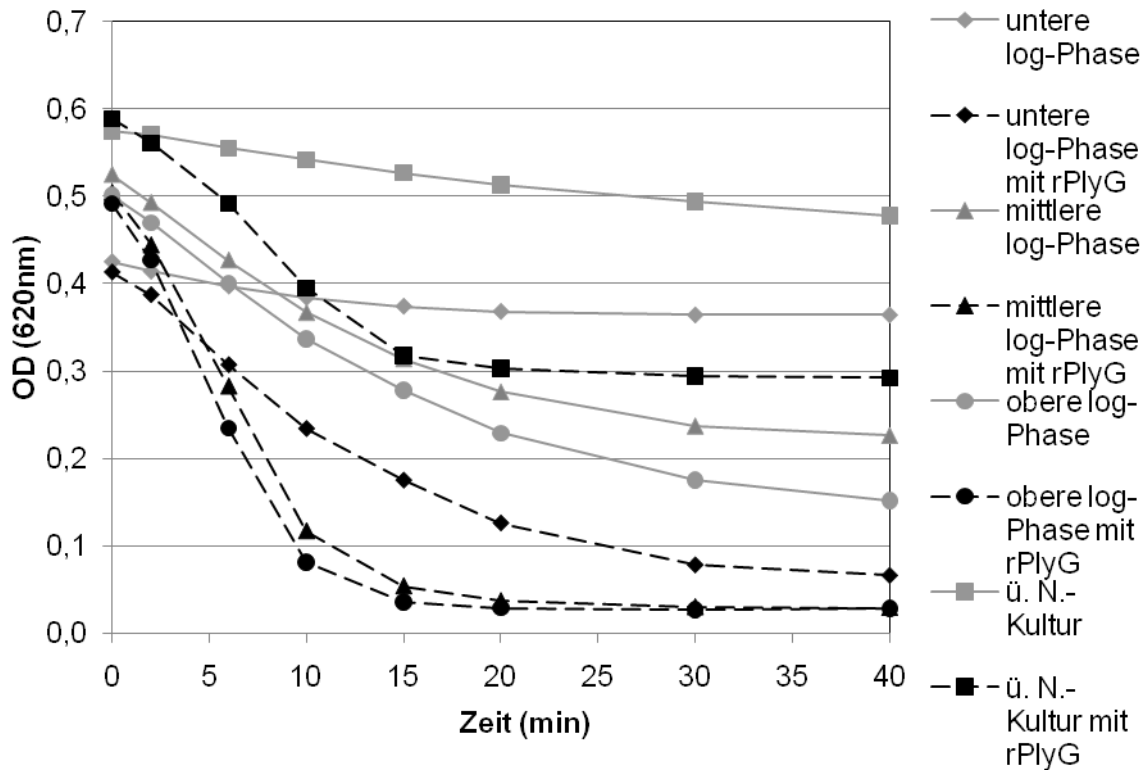


Abb. 15: Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 in PBS in unterschiedlichen Wachstumsphasen (untere Phase:  $OD_{600}=0,4$ ; mittlere Phase:  $OD_{600}=0,88$ ; obere Phase:  $OD_{600}=1,1$ ; ü. N.-Kultur:  $OD_{600}=1,24$ ).

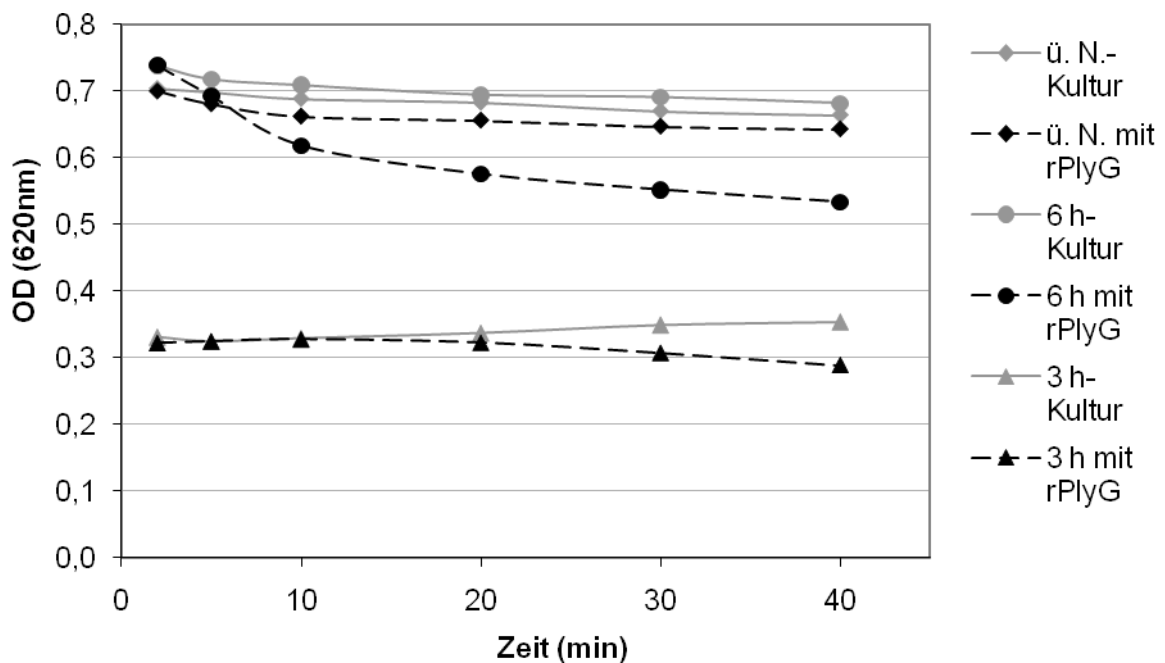


Abb. 16: Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von *B. anthracis* A11 in PBS in unterschiedlichen Wachstumsphasen.

Erst bei der Testung der *B. anthracis*-Isolate aus der Stammsammlung wurde deutlich, dass einige Isolate in einer 6 h-Kultur besser von rPlyG lysiert wurden als in einer ü. N.-Kultur. Für diese Untersuchungen wurden mehrere Isolate im Vergleich nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (3 h, 6 h, ü. N.) im turbidimetrischen rPlyG-Lysetest (Variante 2) untersucht. In Abb. 16 ist zu erkennen, dass das *B. anthracis*-Isolat A11 nur bei der Durchführung des rPlyG-Lysetests mit einer 6 h-Kultur eine deutliche OD<sub>620</sub>-Abnahme zeigte. Bei der ü. N.-Kultur konnte durch Mikroskopie Versporung nachgewiesen werden. Sporen zeigten jedoch keine Sensitivität gegenüber rPlyG (siehe 4.10). Bei einer 3 h-Kultur ist der Ausgangs-OD-Wert zu niedrig, als dass eine Abnahme eindeutig nachweisbar war (siehe 4.2.2.5). Diese Erkenntnisse wurden jedoch erst bei der Etablierung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests umgesetzt.

#### 4.2.2.5 Bakteriendichte

Die Bakteriensuspensionen zeigten je nach Bakteriendichte eine unterschiedlich starke OD<sub>620</sub>-Abnahme. Dies war gleichzeitig abhängig von der eingesetzten rPlyG-Konzentration. Somit musste die Bakteriendichte zusätzlich auf die rPlyG-Konzentration abgestimmt werden. Für die Einstellung von Bakteriensuspensionen auf eine definierte Bakteriendichte wurde eine ü. N.-Kultur in unterschiedlichen Mengen PBS resuspendiert, und auf die gewünschte OD<sub>600</sub> mit Hilfe von Einmalküvetten im „Spektrophotometer Ultraspec Plus“ eingestellt. Mit diesen unterschiedlich dichten Ausgangssuspensionen wurde dann der turbidimetrische rPlyG-Lysetest (Variante 2) im Plattenphotometer bei OD<sub>620</sub> durchgeführt.

Wie die Versuchsergebnisse zeigten, durfte die Bakteriendichte nicht zu niedrig sein, da sonst keine eindeutige OD<sub>620</sub>-Differenz nach der Messung zu ermitteln war. Gleichzeitig konnte es bei einer zu hohen Bakteriendichte sein, dass nicht genügend rPlyG zur Verfügung stand, so dass nur ein geringer Anteil der Bakterien lysiert werden konnte und dadurch die relative OD<sub>620</sub>-Abnahme ebenfalls zu gering ausfiel. Die besten Ergebnisse zeigten sich bei einer rPlyG-Endkonzentration von 4 µg/ml in einem OD<sub>620</sub> Bereich von 0,5 – 0,8 (siehe Abb. 17), was etwa einer Zellzahl von 10<sup>7</sup> -10<sup>8</sup> KBE/ml entsprach (vgl. Abb. 11). In diesem OD<sub>620</sub>-Bereich wurde bei alle weiteren Untersuchungen gearbeitet.

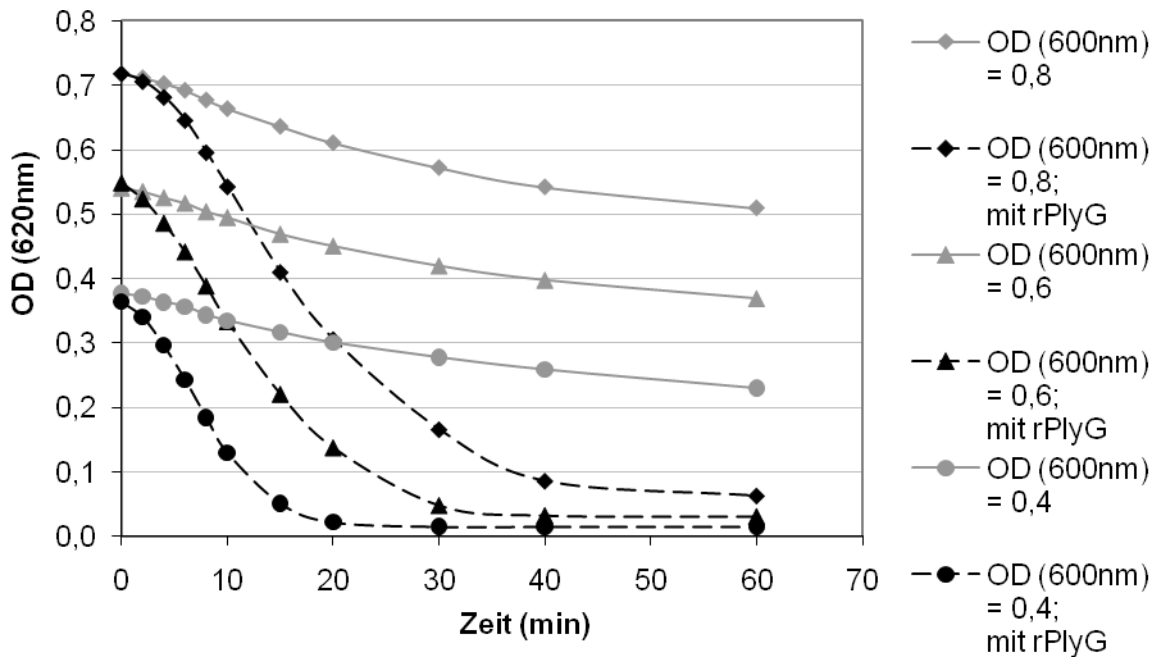


Abb. 17: Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 in PBS mit unterschiedlicher Ausgangsdichte der Kultur.

#### 4.2.2.6 rPlyG-Konzentration

Die optimale Konzentration des rPlyG ist vor allem abhängig von der Bakteriendichte. Je höher die Dichte, desto mehr rPlyG ist nötig, um eine nachweisbare Lyse der Bakterienzellen zu erreichen. Unter der Anwendung der bereits ermittelten Parameter wurde der turbidimetrische rPlyG-Lysetest mit einer ü. N.-Kultur mit einer  $OD_{620}$  zwischen 0,5 und 0,8 durchgeführt. Im Vergleich wurden unterschiedliche rPlyG-Konzentrationen eingesetzt, um die optimale Konzentration zu ermitteln. Wie Abb. 18 zeigt, nahm bei einer mittleren  $OD_{620}$  von etwa 0,6 in der Ausgangssuspension die rPlyG-Aktivität bei einer Endkonzentration von 4  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber 2  $\mu\text{g/ml}$  deutlich zu, konnte allerdings bei größeren rPlyG-Endkonzentration nicht weiter gesteigert werden. Somit wurde für zukünftige Untersuchungen eine rPlyG-Endkonzentration von 4  $\mu\text{g/ml}$  verwendet.

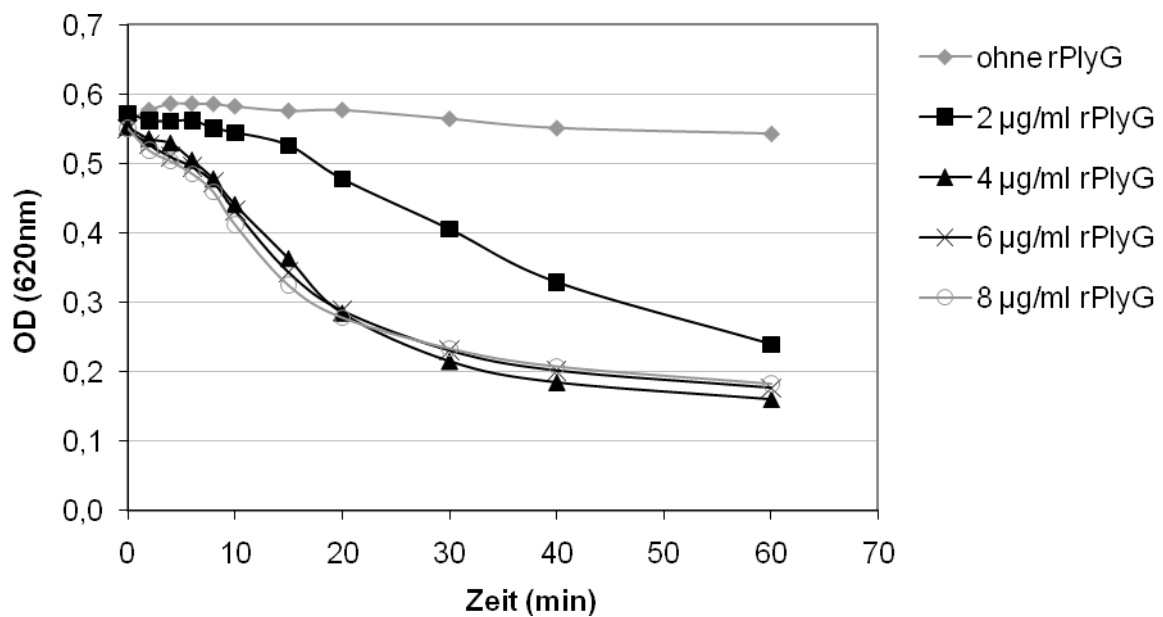


Abb. 18: Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von *B. anthracis* A58 in PBS mit unterschiedlichen Konzentrationen von rPlyG.

#### 4.2.3 Zusätzliche Anwendung einer Polypropylenfolie

Die Untersuchungen der *B. anthracis*-Isolate fanden in einem Sicherheitslabor unter einer Sterilbank statt. Die Messungen in einem Plattenphotometer fanden jedoch außerhalb der Sterilbank statt. Um die Gefahr einer Aerosolbildung zu verhindern, wurde die Mikrotiterplatte mit einer Polypropylenfolie abgeklebt. Somit war es notwendig zu überprüfen, ob die Folie den Testablauf beeinflusste. Dazu wurde eine Suspension des *B. anthracis*-Stamm A58 auf beide Hälften der Platte pipettiert und die eine Hälfte der Platte nach Zugabe von rPlyG mit Folie abgeklebt. Nach Ablauf des Tests zeigten die Ergebnisse nach Abzug des jeweiligen Nullwertes keine Abweichungen wie Abb. 19 bestätigt. Somit wurde bei alle weiteren Untersuchungen mit *B. anthracis*-Isolaten, die Mikrotiterplatte mit einer Polypropylenfolie abgeklebt.



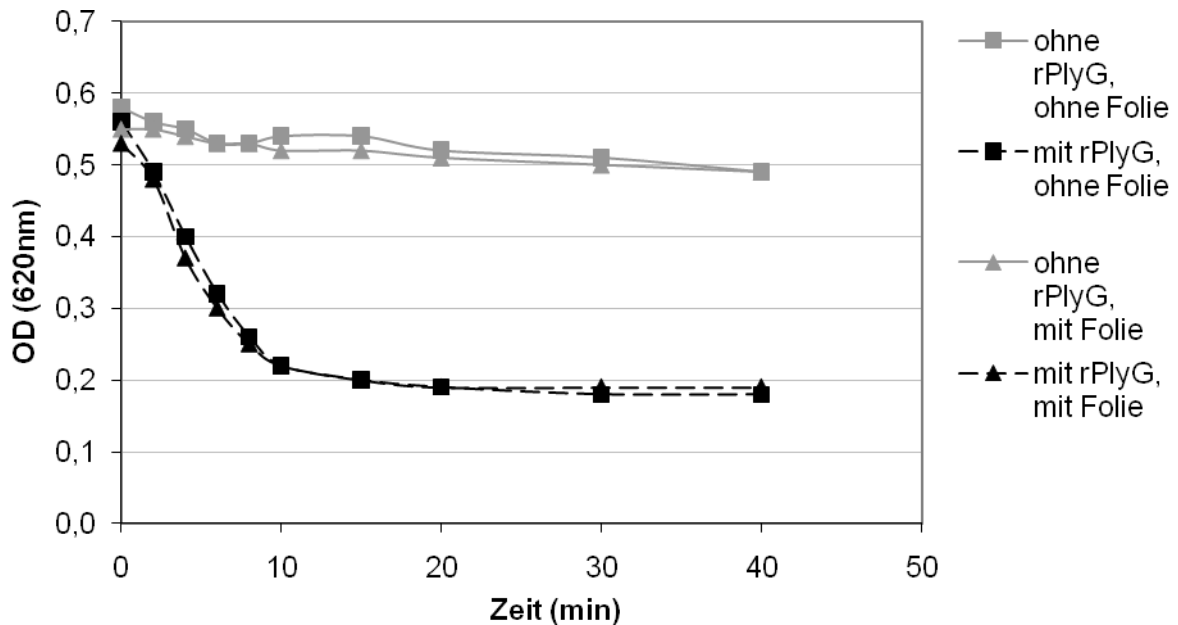


Abb. 19: Turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von *B. anthracis* A58 in PBS mit und ohne Folienabdeckung der Mikrotiterplatte.

### 4.3 Prüfung der *Bacillus*-Isolate im turbidimetrischen rPlyG-Lysetest (Variante 2)

Nach der Optimierung des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests (Variante 2) durch Ermittlung der  $OD_{620}$ -Abnahme wurde die gesamte Stammsammlung aus 108 *B. anthracis*-Isolaten und 200 anderen *Bacillus* spp.-Isolaten diesem Test (siehe 3.6.1) unterzogen. Auf Grund der Erfahrungen in den vorangegangenen Versuchen wurde ein Grenzwert der  $OD_{620}$ -Abnahme von 0,1 festgelegt. Dies bedeutet, dass alle Isolate, die nach 40 min Inkubation mit rPlyG eine Reduktion der  $OD_{620}$  von  $\geq 0,1$  zeigten, als sensitiv gegenüber rPlyG gewertet wurden. Dadurch sollte die Spezifität und Sensitivität des rPlyG ermittelt werden.

#### 4.3.1 Ergebnisse der *Bacillus* spp. (nicht *B. anthracis*)-Isolate

Bei der Prüfung der 200 *Bacillus* spp.-Isolate, die nicht der Spezies *B. anthracis* angehörten, zeigte sich, dass 22,5 %, also 45 der 200 Isolate von rPlyG lysiert wurden. Davon waren 35 Isolate (17,5 %) auch in Wiederholungen eindeutig zu lysieren. Die restlichen 10 Isolate (5 %) erzielten in Wiederholungen

widersprüchliche Ergebnisse oder Werte im Bereich des Grenzwerts. Dieses Verhältnis ist in Abb. 20 dargestellt.

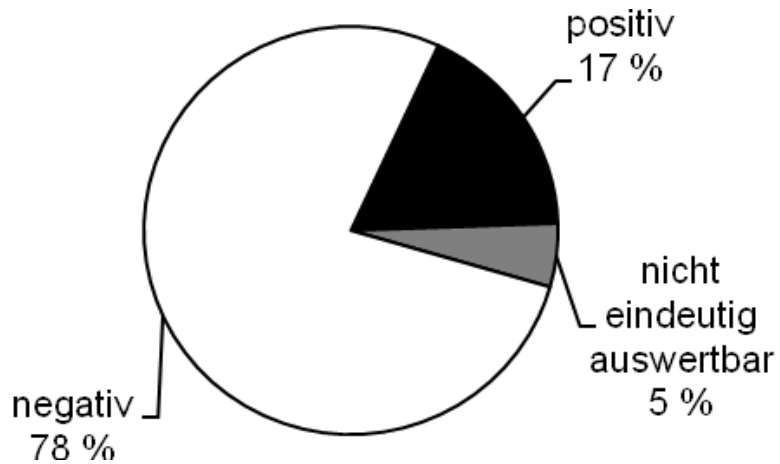


Abb. 20: Ergebnisse der 200 *Bacillus* spp. (nicht *B. anthracis*)-Isolate im turbidimetrischen rPlyG-Lysetest (Variante 2).

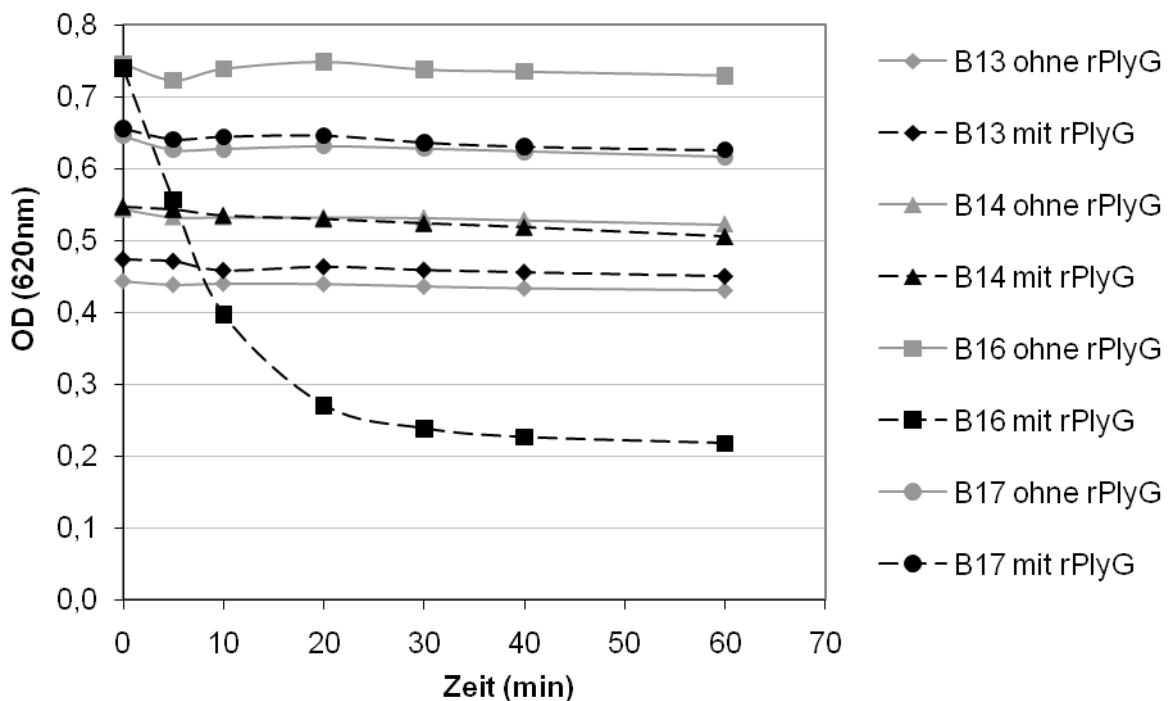


Abb. 21: Ergebnisse des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests (Variante 2) von 2 *B. subtilis*- (B13, B14), ein *B. cereus*- (B16) und einem *B. megaterium*-Isolat (B17).

Abb. 21 zeigt exemplarisch vier verschiedene Isolate von *Bacillus* spp., die im turbidimetrischen rPlyG-Lysetest (Variante 2) getestet wurden. Dafür wurden die Bakteriensuspensionen aus einer ü. N.-Kultur in den Test eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten bei dem *B. cereus*-Isolat B16 eine deutliche Abnahme der OD<sub>620</sub> nach Zugabe von rPlyG und somit eine deutliche Sensitivität für diesen. Die drei anderen Isolate dagegen wurden eindeutig nicht von rPlyG lysiert, da es zu keiner OD<sub>620</sub>-Abnahme kam.

#### 4.3.2 Ergebnisse der *B. anthracis*-Isolate

Nachdem die *B. anthracis*-Isolate getestet worden waren, stellte sich heraus, dass die OD<sub>620</sub>-Differenz bei vielen Isolaten unter bzw. bei einem Wert von 0,1 lag und somit kaum von den negativ getesteten anderen *Bacillus* spp.-Isolaten zu unterscheiden waren. Daraus ließ sich schließen, dass eine Beurteilung der Sensitivität und Spezifität des rPlyG und somit die Anwendung in der Diagnostik mit dem bisher entwickelten Test-Protokoll nicht möglich war. Bei einem Grenzwert der OD<sub>620</sub>-Abnahme von 0,1 nach 40 min, waren nur 72 (67 %) der 108 Isolate positiv, 12 (11 %) waren negativ und die restlichen 24 Isolate (22 %) nicht eindeutig zu beurteilen, weil ihre Messwerte im Bereich des Grenzwerts lagen oder die Isolate bei Wiederholungen widersprüchliche Ergebnisse zeigten (siehe Abb. 22).

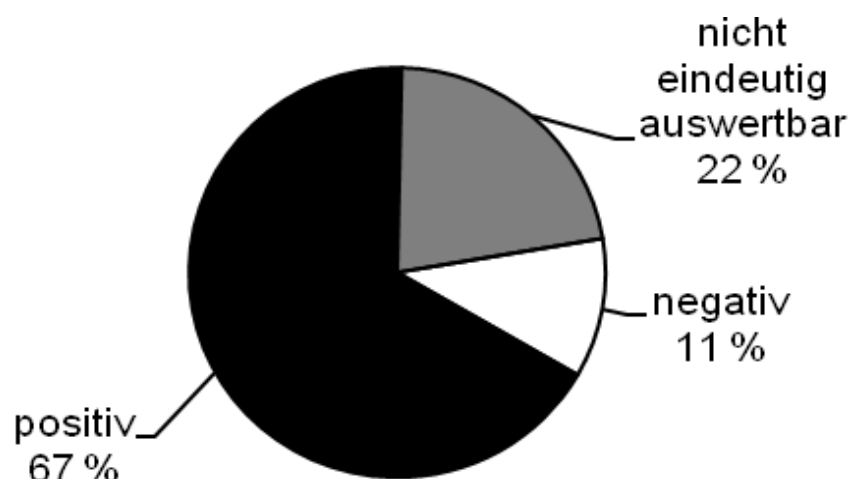


Abb. 22: Ergebnisse der 108 *B. anthracis*-Isolate im turbidimetrischen rPlyG-Lysetest (Variante 2).

In Abb. 23 ist deutlich zu erkennen, dass die *B. anthracis*-Isolate A113 und A118 von rPlyG lysiert wurden, A120 dagegen nicht. Das Isolat A119 erreicht die OD<sub>620</sub>-Differenz von 0,1 nach 40 min nicht ganz, lag aber in einem Wiederholungsversuch knapp über 0,1 und gehört somit zu den 24 nicht eindeutig auswertbaren Isolaten.

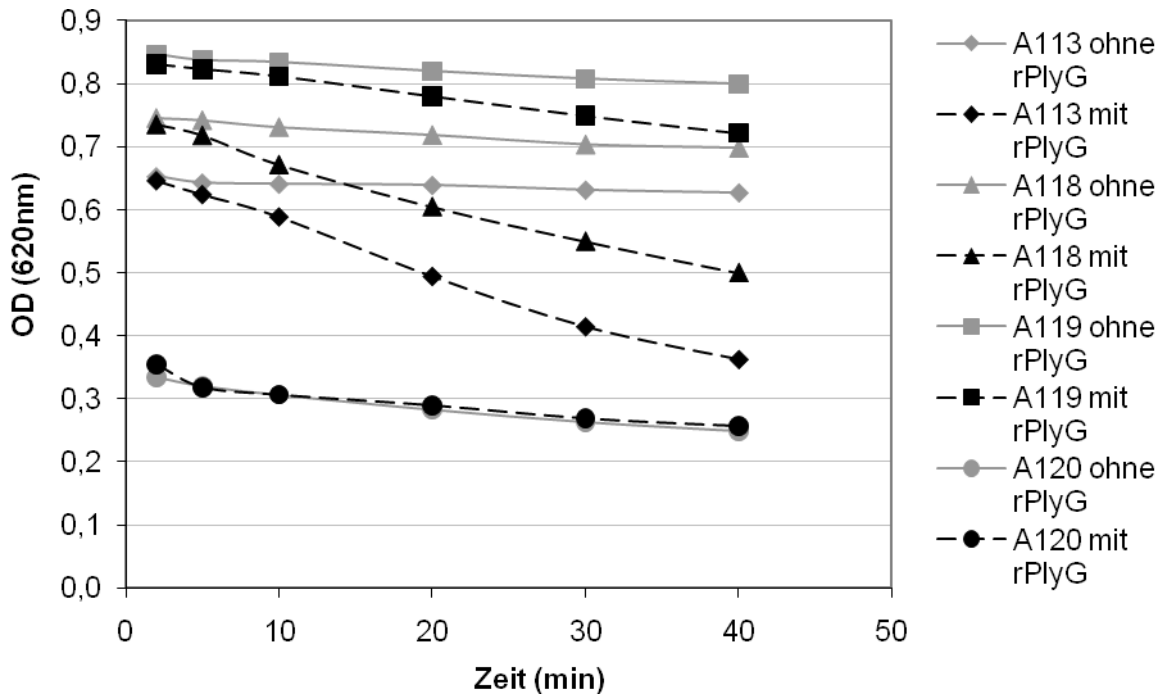


Abb. 23: Ergebnisse des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests (Variante 2) mit 4 unterschiedlichen *B. anthracis*-Isolaten.

Auch mit Variationen der Testbedingungen, wie der Erhöhung der Lysinkonzentration, der Verwendung von Bakterien in einer früheren Wachstumsphase und der Veränderung der Inkubationstemperatur konnte nur bei einzelnen Isolaten eine höhere Sensitivität gegenüber rPlyG erzielt werden.

## 4.4 Entwicklung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests

### 4.4.1 Optimierung einzelner Untersuchungsparameter

Der kolorimetrische rPlyG-Lysetest wurde zunächst in einer ersten Version in der durch die Autorin dieser Arbeit mitbetreuten Diplomarbeit von LANG (2006) ausgearbeitet. Da sich diese Arbeiten ausschließlich auf *Bacillus* spp. (nicht *B. anthracis*)-Isolate bezogen, zeigten erste Tests mit *B. anthracis*-Isolaten deutlich, dass noch weitere Optimierungen des Tests nötig waren. Zur Optimierung wurde Lysozym in den Agar zugesetzt, ein zusätzlicher Waschschrift eingeführt und die Inkubationszeit und -temperatur des BCA-Reagenz angepasst. Die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die Ergebnisse des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests sind nachfolgend näher erläutert.

#### Lysozymzusatz im Agar

Es ist bekannt, dass Lysozym die Kettenbildung der Bakterien unter Laborbedingungen hemmt. Somit sollte der Zusatz von Lysozym im Std.-I-Agar die Angreifbarkeit der Zellen gegenüber dem rPlyG in der Bakteriensuspension verbessern. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden vier *B. anthracis*-Isolate (A93, A108, A110 und A58) parallel auf Agar ohne Zusatz, mit 300.000 U/l und mit 600.000 U/l Lysozym-Zusatz angezüchtet. Nach einer ü. N.-Bebrütung wurde der kolorimetrische rPlyG-Lysetest nach vorläufigem Protokoll durchgeführt. Diese vier Isolate wurden stellvertretend für alle *B. anthracis*-Isolate getestet.

Der Zusatz von Lysozym im Std.-I-Agar bei der Anzucht führte zu einer gesteigerten Sensitivität des Tests. Wie Abb. 24 zeigt, konnte bei Zusatz von 300.000 U/l Agar bei allen Isolaten eine größere OD<sub>540</sub>-Differenz und somit eine stärkere Lyse erzielt werden als ohne Lysozym-Zusatz. Beim Zusatz von 600.000 U/l Lysozym in den Agar ergab sich bei den Isolaten A110 und A58 eine weitere Steigerung der OD<sub>540</sub>-Differenz. Bei den Isolaten A93 und A108, die insgesamt eine schwächere Lyse zeigten, wurde jedoch eine geringere Differenz ermittelt als mit 300.000 U/l Lysozym. Somit wurde für alle weiteren Untersuchungen eine Anzucht auf Std.-I-Agar mit Zusatz von 300.000 U/l Lysozym vorgenommen.

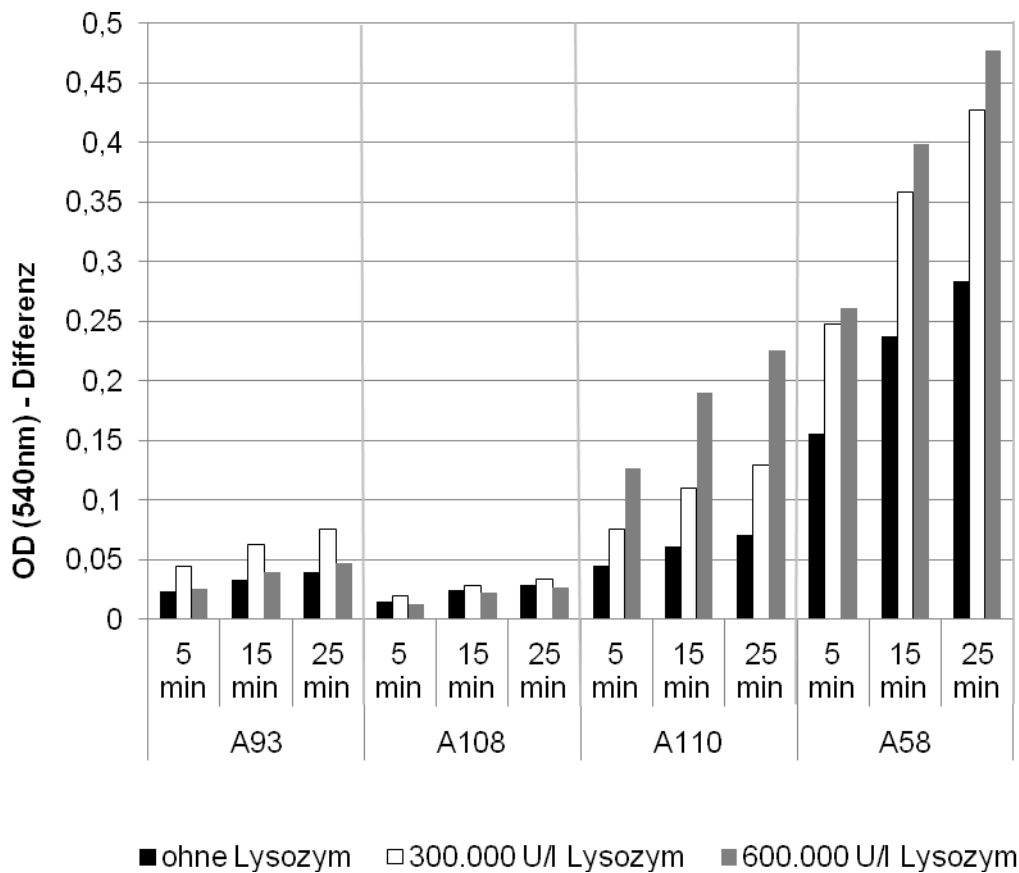


Abb. 24: Ergebnisse des vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests mit 4 *B. anthracis*-Isolaten (A93, A108, A110, A58) nach Inkubationszeiten von 5, 15 und 25 min. Außerdem ist die unterschiedliche OD-Reduktion bei Anzucht auf Std.-I-Agar ohne Zusatz bzw. mit 300.000 U/l und 600.000 U/l Lysozym-Zusatz dargestellt.

### Zusätzlicher Waschschrift

Vorversuche (siehe 4.2.2.1 und Abb. 12) zeigten, dass die Wirkung des rPlyG von bestimmten Medien gehemmt wird. Deshalb sollte ein zusätzlicher Waschschrift der Bakteriensuspension mit PBS sicherstellen, dass sich keine Reste des Mediums mehr im Versuchsansatz befanden. Um den positiven Effekt auf das Testergebnis nachzuweisen wurde der Referenzstamm *B. cereus* ATCC 4342 im turbidimetrischen Lysetest (Variante 2) untersucht (siehe Abb. 25). Außerdem wurde das vorläufige Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests mit den *B. anthracis*-Isolaten A38, A39, A58 und der Negativkontrolle *B. cereus* B181 durchgeführt. Die Tests wurden laut Protokoll durchgeführt und parallel dazu wurde ein Testansatz durch einen Waschschrift ergänzt. Dazu wurden die hergestellten Bakteriensuspensionen zusätzlich bei 14.000 x g abzentrifugiert und die Pellets anschließend im selben Volumen PBS wieder aufgenommen.

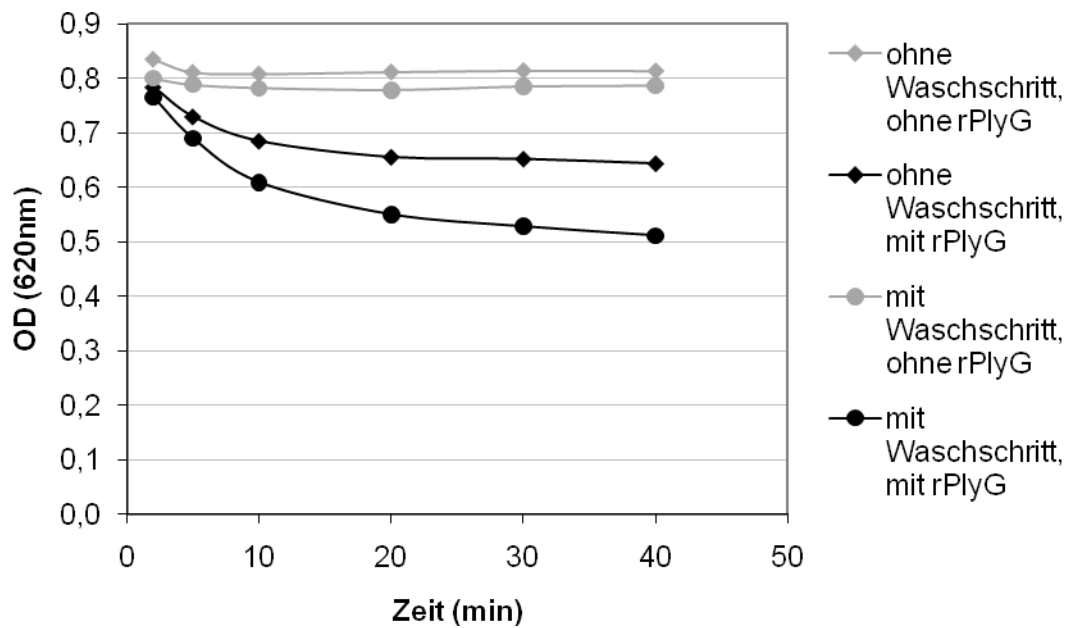


Abb. 25: Ergebnisse des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests (Variante 2) mit einer Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 mit und ohne zusätzlichen Waschschrift mit PBS.

Abb. 25 zeigt die erhöhte  $OD_{620}$ -Abnahme nach Durchführung des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests (Variante 1) mit einem zusätzlichen Waschschrift mit PBS im Vergleich zum ursprünglichen Protokoll. In Abb. 26 sind die Ergebnisse des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests dargestellt. Dieses Schaubild bestätigt mit Isolat A39 einerseits die Ergebnisse des turbidimetrischen Tests, andererseits zeigt es auch, dass es nicht immer zu einer Zunahme der  $OD_{540}$ -Differenz kam. Beim Stamm A58 kam es sogar zu einer etwas geringeren Abnahme als ohne Waschschrift. Trotzdem wurde für die Anpassung des Protokolls zukünftig ein weiterer Waschschrift aufgenommen, da bei allen Messungen aufgefallen ist, dass die Ausgangs-OD mit und ohne rPlyG deutlich niedriger lag als ohne Waschschrift und somit eine eventuelle Beeinflussung der OD durch Fremdproteine verhindert werden konnte. Für die Optimierung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests wurde deshalb der zusätzliche Waschschrift im Protokoll ergänzt.

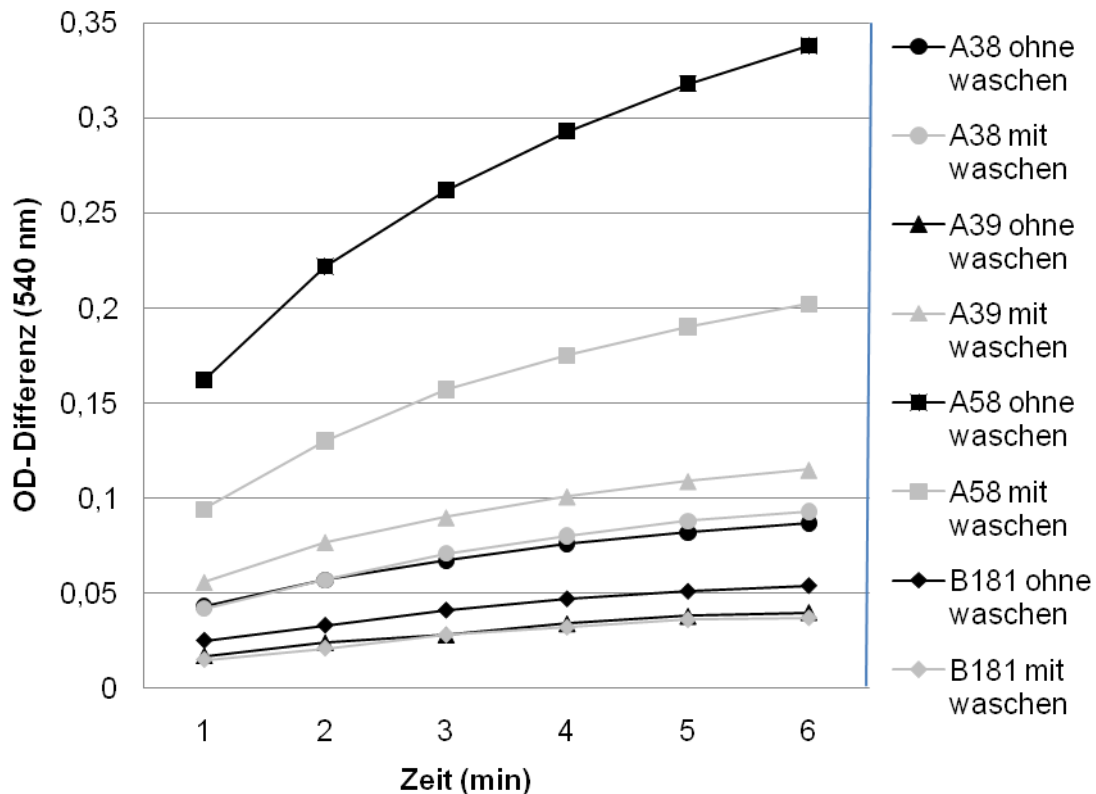


Abb. 26: Ergebnisse des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests mit 3 *B. anthracis*-Isolaten (A38, A39, A58) und der Negativkontrolle *B. cereus* B181.

### Verlängerte Inkubationszeit für das BCA-Reagenz

Durch die Verlängerung der Inkubationszeit für das BCA-Reagenz sollte die Sensitivität der Messung gesteigert werden. Für die Ermittlung der optimalen Inkubationszeit wurde der kolorimetrische rPlyG-Lysetest nach vorläufigem Protokoll mit den Isolaten A39, A93, A58 und B181 durchgeführt, wobei die Messungen nicht nur nach 5 min, sondern im Abstand von 10 min über eine Zeitspanne von einer Stunde wiederholt wurden. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min kam es zu einer stärkeren Verfärbung des Versuchsansatzes ohne Erhöhung des Hintergrundes und somit bei positiver Probe zu einem deutlicheren Farbunterschied zwischen den Ansätzen ohne bzw. mit rPlyG. Dies spiegelt sich deutlich in der Zunahme der OD<sub>540</sub>-Differenz wider. Wie Abb. 27 zeigt, wurde auch nach 60 min Inkubation noch keine maximale OD<sub>540</sub>-Differenz erreicht. Um den Zeitaufwand für den Test möglichst gering zu halten, wurde schließlich eine Inkubationszeit von 30 min festgelegt.



### Veränderte Inkubationstemperatur für das BCA-Reagenz

Parallel zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit wurde auch die Inkubationstemperatur im Protokoll des vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests variiert. Aus Wiederholungsversuchen bei RT, 30 °C und 37 °C ergab sich die beste Auswertbarkeit des Tests bei 30 °C. Bei dieser Temperatur waren die OD<sub>540</sub>-Differenzen zwischen dem Ansatz mit rPlyG und dem Ansatz ohne rPlyG am größten. Dies wird in Abb. 27 deutlich. Somit wurde das Protokoll auf eine Inkubationstemperatur von 30 °C angepasst. Grundsätzlich ist der Test auch bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C auswertbar.

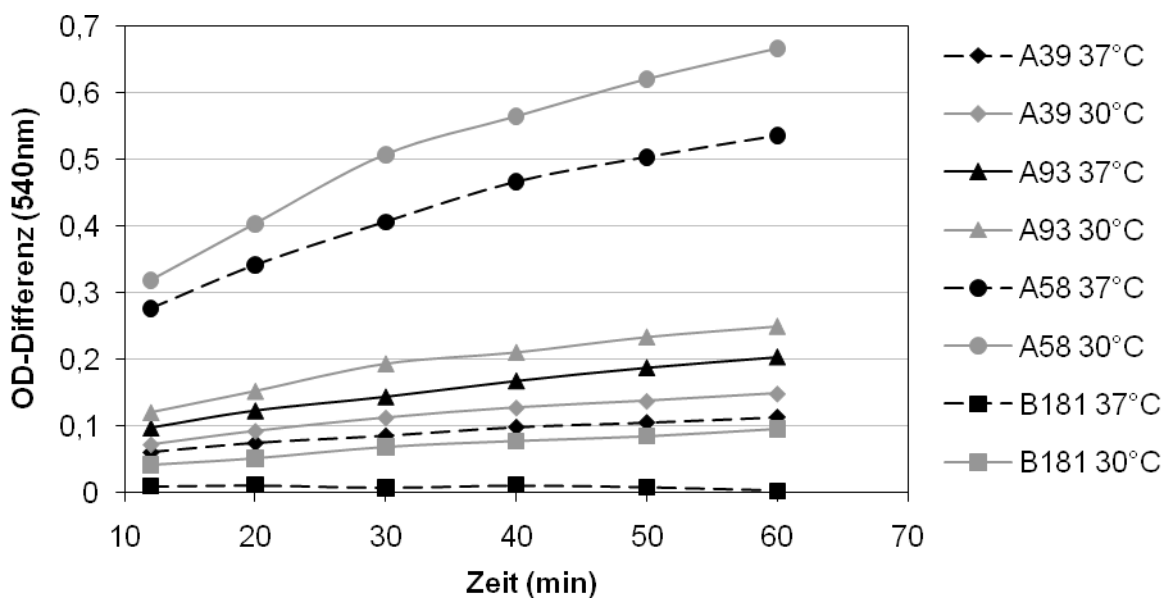


Abb. 27: Ergebnisse des vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und -temperaturen mit 3 verschiedenen *B. anthracis*-Isolaten (A39, A93, A58) und der Negativkontrolle *B. cereus* B181.

#### 4.4.2 Endgültiges Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests

Die Arbeitsanleitung des endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests wurde unter 3.6.3 ausführlich beschrieben.

#### 4.4.3 Definition des Grenzwertes

Der Grenzwert wurde so definiert, dass möglichst alle ermittelten Ergebniswerte (OD<sub>540</sub>-Differenzen) der zu testenden *B. anthracis*-Isolate oberhalb dieses Wertes lagen und somit eine maximale Sensitivität des Tests erreicht wurde. Gleichzeitig

sollten so viele Isolate anderer *Bacillus* spp. wie möglich Ergebniswerte unterhalb des Grenzwertes aufweisen, um auch eine möglichst hohe Spezifität des Tests zu erhalten. Somit ist der Grenzwert ein gezielt ausgewählter Wert, der diese Kriterien erfüllt. Werte oberhalb dieses Grenzwertes sind als positiv, unterhalb als negativ zu beurteilen.

Als Ergebniswert eines Isolats im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest wurde die Differenz zwischen dem OD<sub>540</sub>-Messwert des Ansatzes mit rPlyG und dem OD<sub>540</sub>-Messwert des Ansatzes ohne rPlyG verwendet. Zur Definition des Grenzwertes wurden zunächst die Ergebnisse der in 12 Untersuchungen nach vorläufigem Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests mitgeführten Referenzstämme herangezogen (siehe Abb. 28) und der Grenzwert mit 0,05 definiert. Später wurden die Ergebnisse aller Isolate aus der Stammsammlung und die Veränderungen des endgültigen Protokolls berücksichtigt, wodurch der Grenzwert auf 0,07 angepasst werden musste (siehe Abb. 33 und Abb. 35).

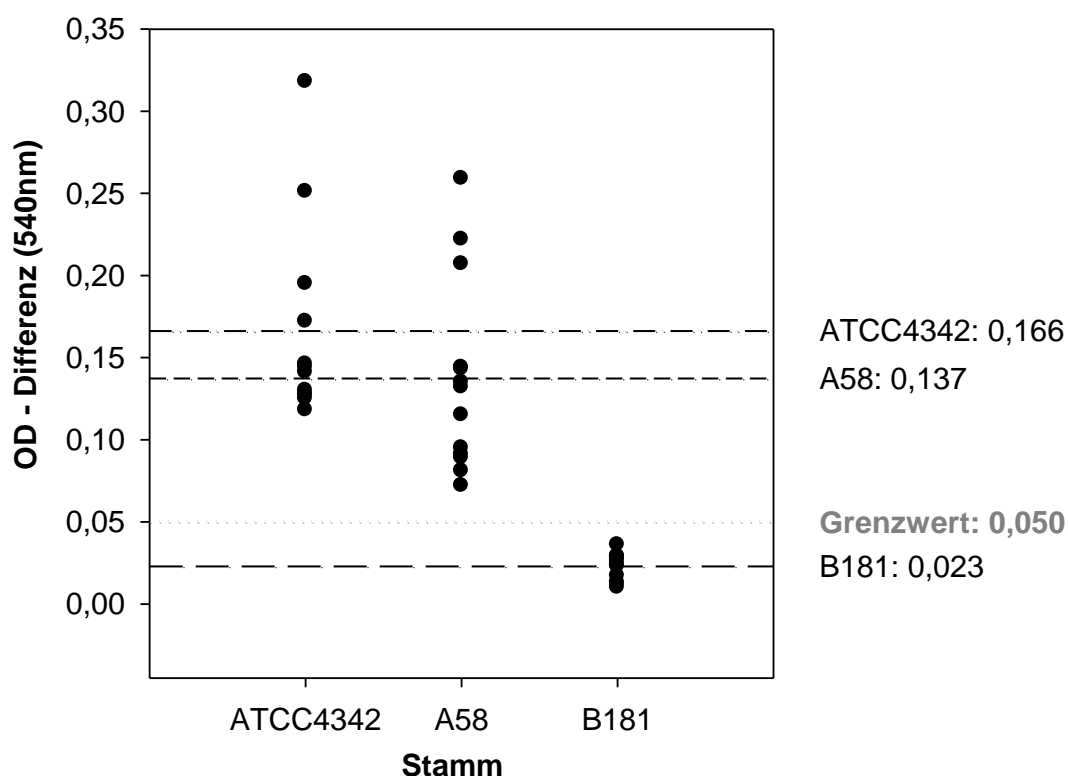


Abb. 28: Ergebnisse der 3 Referenzstämme (*B. cereus* ATCC4342, *B. anthracis* A58, *B. cereus* B181) getestet in jeweils 12 Wiederholungen mittels vorläufigem kolorimetrischen rPlyG-Lysetest. Jeder schwarze Punkt steht für einen Ergebniswert (LANG, 2006), die schwarzen gestrichelten Linien repräsentieren die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte. Außerdem dargestellt der aus diesen Ergebnissen definierte Grenzwert von 0,05 (grau, gepunktet).

## 4.5 Prüfung der *Bacillus* spp.-Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest

### 4.5.1 Ergebnisse der *B. anthracis*-Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest

Mit dem endgültigen Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests wurden die 108 *B. anthracis*-Isolate der Stammsammlung getestet. Bei 101 Isolaten konnte dabei eine eindeutige Lyse mit deutlich über dem Grenzwert von 0,07 liegenden OD<sub>540</sub>-Differenzen nachgewiesen werden. Diese Differenzen waren in der Regel deutlich größer als bei den (falsch) positiv getesteten Isolaten anderer *Bacillus* spp.-Isolate (vgl. Abb. 35 und Abb. 29). Für sieben *B. anthracis*-Isolate (A33, A34, A68, A84, A127, A135, A136) konnte zunächst keine Lyse nachgewiesen werden. Diese Isolate wurden im Weiteren gesondert untersucht.

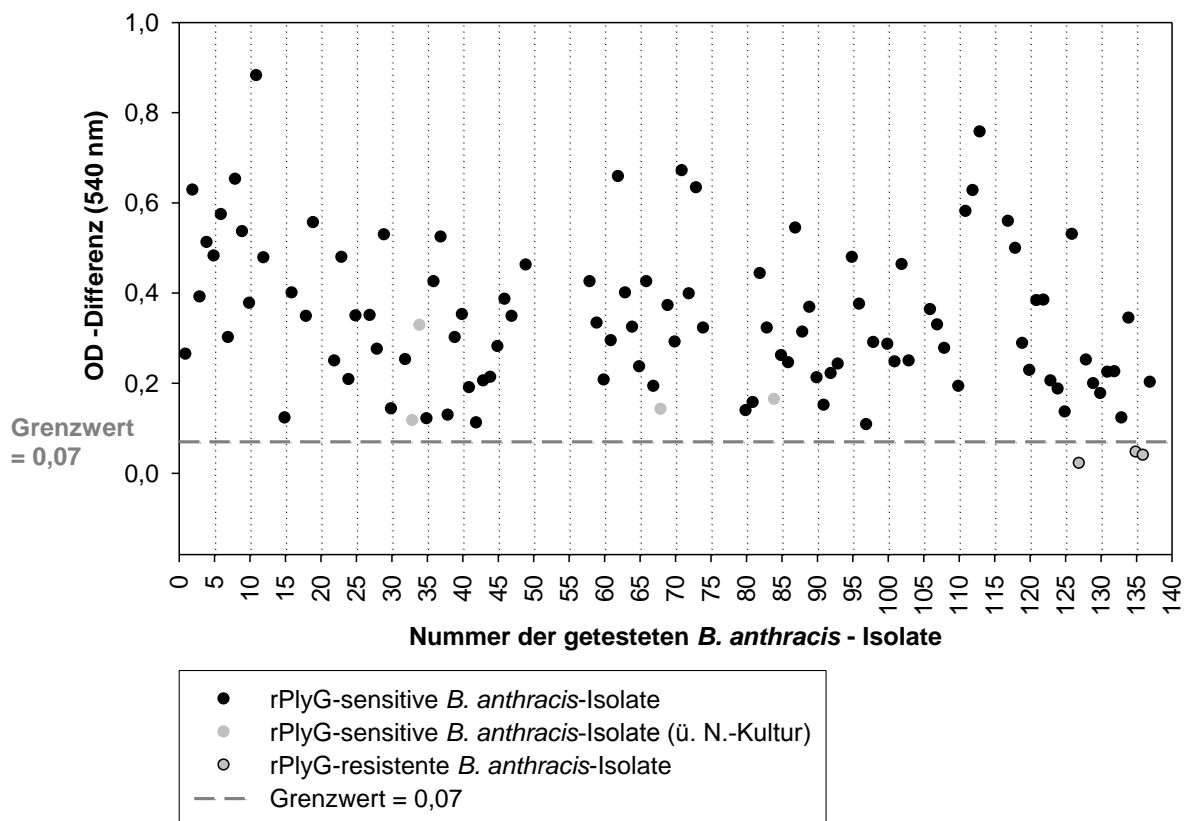


Abb. 29: OD<sub>540</sub>-Differenzen der 108 *B. anthracis*-Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest (endgültiges Protokoll).

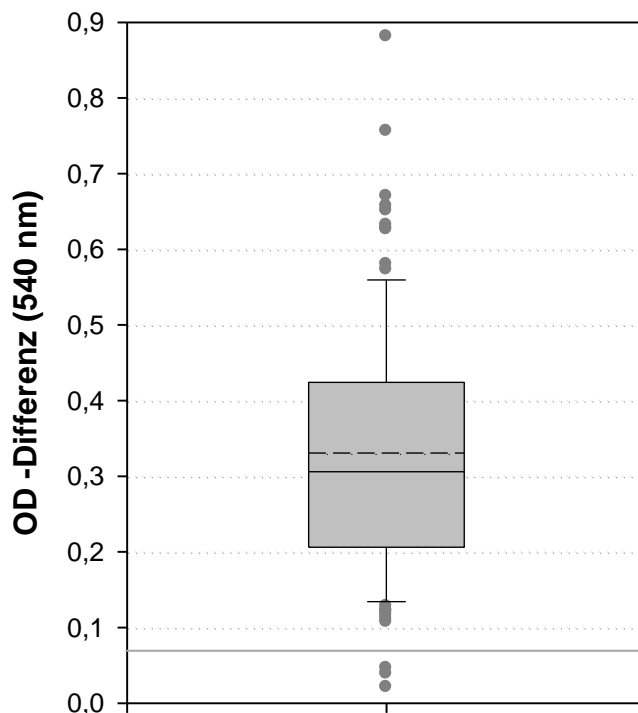


Abb. 30 Statistische Auswertung der OD<sub>540</sub>-Differenzen für alle 108 *B. anthracis*-Isolate mittels Boxplot: Median – schwarze Linie, arithmetischer Mittelwert – schwarze, gestrichelte Linie, außerdem oberes und unteres Quartil, Whisker und Ausreißer. Grenzwert von 0,07 (graue Linie).

Abb. 30 zeigt die statistische Auswertung aller Ergebnisse der 108 *B. anthracis*-Isolate nach endgültigem Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests. Dabei sind der Median (schwarze Linie) mit 0,31 und das arithmetische Mittel (gestrichelte Linie) mit 0,33 angegeben. Innerhalb der Box liegen 50 % aller Ergebniswerte. Die Whisker geben den 1,5-fachen Quartilsabstand an. Die Abbildung zeigt, dass die Mehrzahl der Isolate einen Ergebniswert deutlich oberhalb des Grenzwerts 0,07 aufweisen. Die drei Werte unterhalb von 0,07 sind als echte falsch negative Ergebnisse zu werten.

### Weitere Untersuchungen der sieben positiven bzw. fraglichen Isolate

Auffallend war, dass die Isolate A33, A34, A68 und A84 innerhalb von 6 h nur ein sehr schwaches Wachstum auf der Std.-I-Agar-Platte zeigten. Deshalb wurden alle sieben Isolate zusätzlich über Nacht bebrütet und der kolorimetrische rPlyG-Lysetest nach endgültigem Protokoll erneut durchgeführt. Aus der ü. N.-Kultur lieferte der Test bei diesen vier Isolaten ein eindeutig positives Ergebnis. Die

Isolate A127, A135 und A136 zeigten dagegen auch mit der über Nacht bebrüteten Kultur keine Lyse. In Abb. 31 ist die eindeutige Zunahme der OD<sub>540</sub>-Differenz und somit ein positives Testergebnis der vier Isolate aus einer ü. N.-Kultur deutlich zu erkennen.

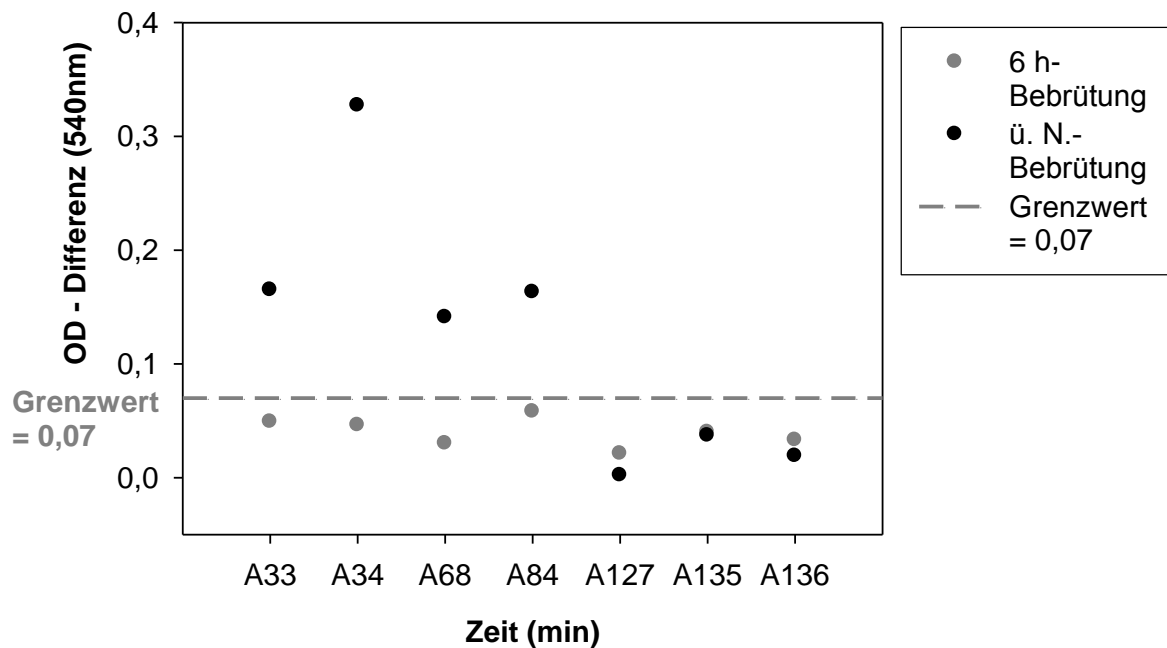


Abb. 31: Vergleich der Ergebnisse des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests (endgültiges Protokoll) von 7 zuvor negativ oder fraglich getesteten *B. anthracis*-Isolaten. Testansatz mit Kolonien nach Anzucht über 6 h (grau) bzw. über Nacht (schwarz).

Ein auf Grund dieser Ergebnisse mehrfach durchgeführter  $\gamma$ -Phagentest nach den unterschiedlichen Testvarianten (siehe 3.5.1) zeigte, dass die Isolate A135 und A136 auch im klassischen diagnostischen  $\gamma$ -Phagentest negativ zu bewerten waren. Besonders auffallend waren diese Ergebnisse, weil diese beiden Isolate zusammen mit dem Isolat A89 aus derselben Bodenprobe stammten und genotypisch identisch waren. Das Isolat A89 war allerdings sowohl durch den  $\gamma$ -Phagen als auch durch rPlyG eindeutig zu lysieren. Die *B. anthracis*-Isolate A33, A34, A68 und A84 waren gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen ebenfalls sensitiv.

Für das Isolat A127 zeigte der klassische  $\gamma$ -Phagentest in mehreren Wiederholungen der einzelnen Testvarianten keine eindeutigen Lyseergebnisse. Bei einer Auswertung im stündlichen Abstand war nach wenigen Stunden eine

deutliche Plaquebildung zu erkennen, die sich aber schon nach kurzer Zeit durch Überwachsen des Plaques wieder verlor. Möglicherweise stellt dieses Isolat eine Mischkultur dar, die sich bakteriologisch jedoch nicht trennen lässt. Für dieses Isolat konnte durch Erhöhung der rPlyG-Endkonzentration auf 12 µg/ml und regulärer Bebrütungsdauer von 6 h ein eindeutig positives Ergebnis im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest erreicht werden. Dagegen zeigten die Isolate A135 und A136 auch bei Erhöhung der rPlyG-Endkonzentration keine Lyse.

Alle drei Isolate (A127, A135 und A136) wurden zur näheren Beurteilung hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften makroskopisch und mikroskopisch (Kettenlänge, Vernetzung, Kapsel- und Sporenbildung) nach unterschiedlicher Bebrütungsdauer genauer untersucht. Die Kolonien der Isolate A135 und A136 unterschieden sich bereits morphologisch auf einer Blutagarplatte von typischen *B. anthracis*-Isolaten. Sie zeigten glänzende und größere Kolonien als sonst üblich. Mikroskopisch konnten jedoch keine Besonderheiten festgestellt werden. Die Überprüfung des Isolats A127 ergab keinerlei Auffälligkeiten.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse**

Bei der abschließenden Beurteilung zeigt sich somit, dass 101 der 108 *B. anthracis*-Isolate mit dem endgültigen Protokoll des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten kolorimetrischen rPlyG-Lysetests eindeutig erkannt wurden. Dies entspricht somit einer Sensitivität von 93,5 %. Zusätzlich konnten vier weitere Isolate nach geringer Abweichung vom Protokoll durch eine Anzüchtung über Nacht positiv getestet werden, was die Sensitivität des Tests auf 97 % erhöht. Drei Isolate (3 %) zeigten ein eindeutig falsch negatives Ergebnis. Zwei der drei Isolate wurden auch vom  $\gamma$ -Phagen nicht lysiert, ein Isolat zeigte kein eindeutiges Ergebnis. Abb. 32 zeigt diese prozentuale Verteilung und die daraus resultierende Sensitivität.

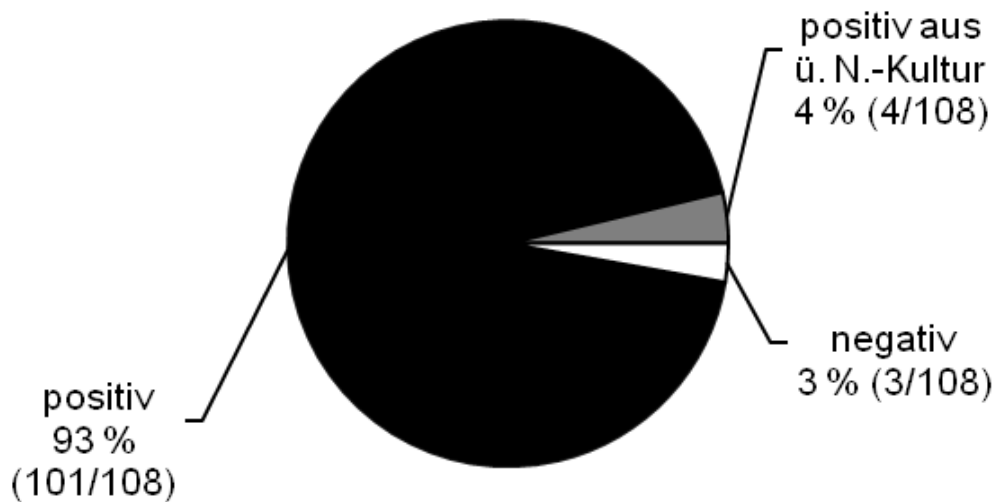


Abb. 32: Zusammenfassung der Ergebnisse aller 108 *B. anthracis*-Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetests (endgültiges Protokoll) mit einem Grenzwert von 0,07.

#### 4.5.2 Ergebnisse von Isolaten anderer *Bacillus* spp. im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest

Zur Prüfung der Spezifität und Sensitivität des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests wurden zunächst nach dem vorläufigen Protokoll (siehe 3.6.3) die 200 anderen *Bacillus* spp.-Isolate getestet. Dabei wurden 39 der 200 Isolate (19,5 %) positiv getestet. Für die Beurteilung wurde der zunächst definierte Grenzwert von 0,05 verwendet (siehe Abb. 33). Die Spezifität des Tests konnte folglich im Vergleich zum turbidimetrischen rPlyG-Lysetest, Variante 2 (siehe 3.6.1) mit noch 45 positiven und fraglichen Isolaten (22,5 %) von 77,5 % auf 80,5 % verbessert werden.

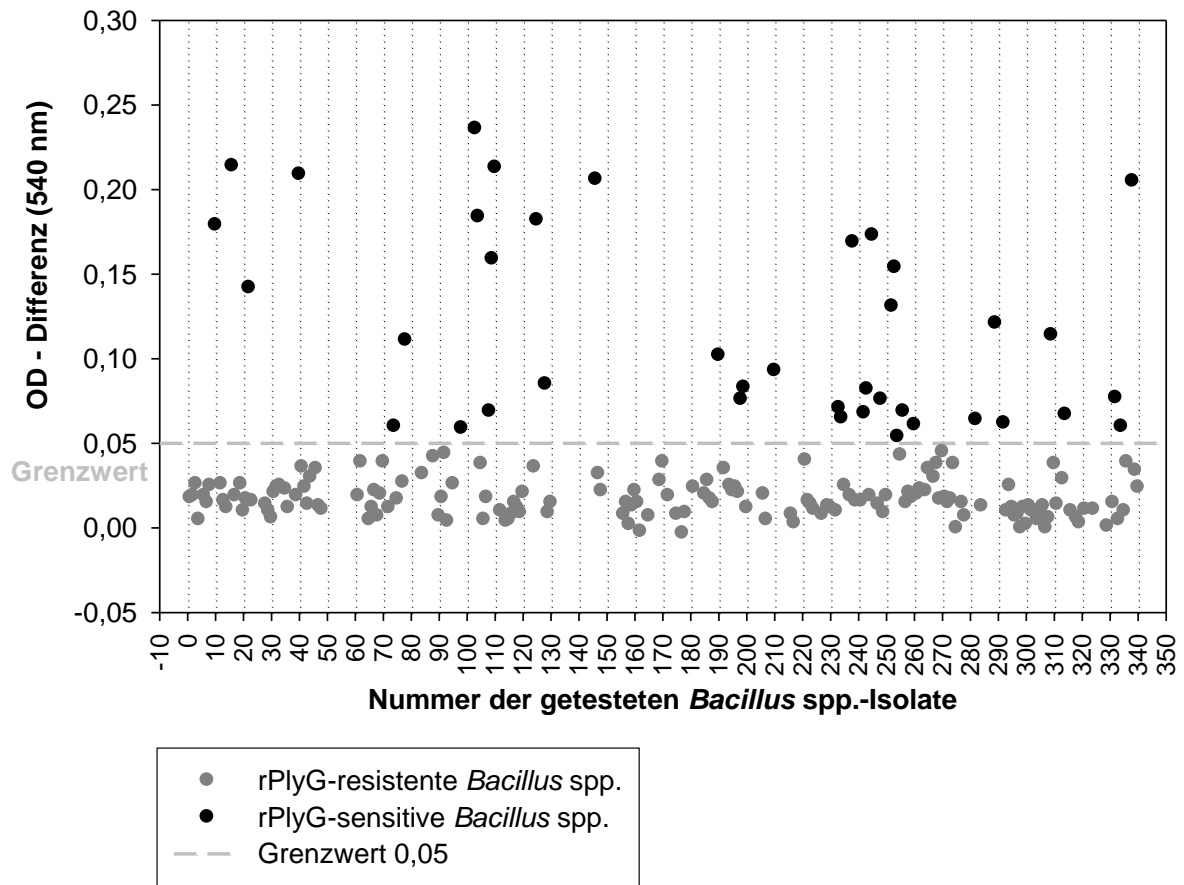


Abb. 33: OD<sub>540</sub>-Differenzen der 200 anderen *Bacillus* spp.-Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetests (vorläufiges Protokoll).

Abb. 34 zeigt die statistische Auswertung aller Ergebnisse der 200 *Bacillus* spp.-Isolate nach vorläufigem Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests. Dabei sind der Median (schwarze Linie) mit 0,019 und das arithmetische Mittel (gestrichelte Linie) mit 0,037 angegeben. Innerhalb der Box liegen 50 % aller Ergebniswerte. Die Whisker geben den 1,5-fachen Quartilsabstand an. Es wird deutlich, dass die Mehrzahl der Isolate einen Ergebniswert deutlich unter dem Grenzwert 0,05 aufweisen. Alle Werte oberhalb 0,05 sind als echte falsch positive Ergebnisse zu Werten.



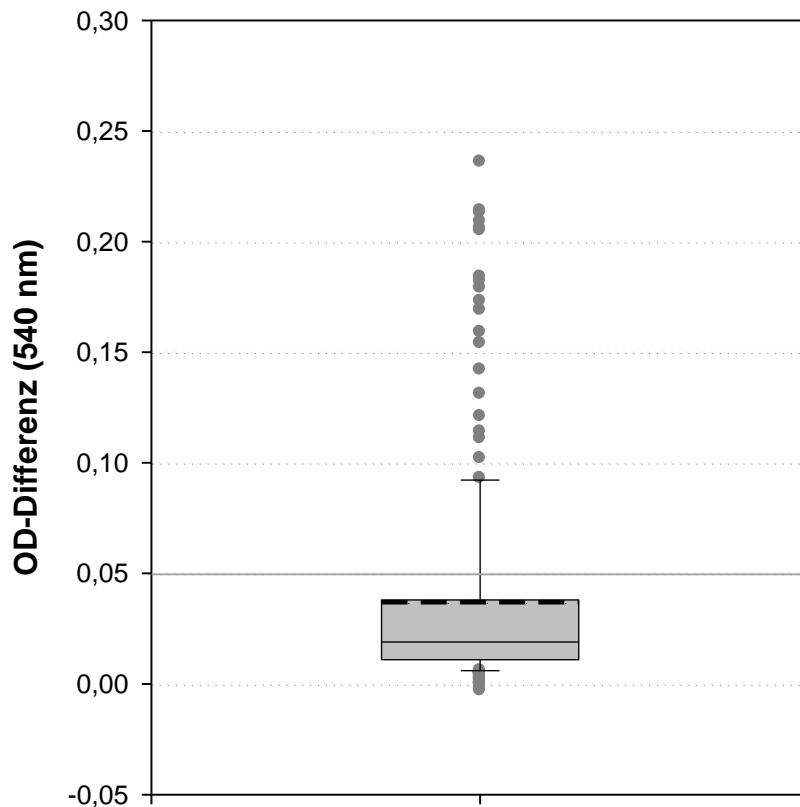


Abb. 34: Statistische Auswertung der  $OD_{540}$ -Differenzen für alle anderen 200 *Bacillus* spp.-Isolate mittels Boxplot: Median – schwarze Linie, arithmetischer Mittelwert – schwarze, gestrichelte Linie, außerdem oberes und unteres Quartil, Whisker und Ausreißer. Grenzwert von 0,05 (graue Linie).

Die in Abb. 33 gezeigten Ergebnisse wurden nach der Testung mit dem vorläufigen Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests (siehe 3.6.3) ermittelt und somit mit dem zunächst definierten Grenzwert 0,05 beurteilt. Nach der Testoptimierung wurde eine Auswahl von 60 der 200 anderen *Bacillus* spp.-Isolate zusätzlich nach dem endgültigen Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests (siehe 3.6.3) getestet. Dazu gehörten vor allem die 39 positiven bzw. nicht eindeutig auswertbaren Isolate sowie 21 zufällig ausgewählte *Bacillus* spp.-Isolate. Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse nach dem alten und nach dem neuen Protokoll größtenteils identisch waren. Bei 28 Isolat mit eindeutig positiven Ergebniswerten nach vorläufigem Protokoll waren die Ergebniswerte nach dem endgültigen Protokoll ebenfalls positiv. Alle negativen Isolate bis auf eine Ausnahme (B35) blieben negativ. Drei (B128, B256, B332) der sieben zuvor fraglich getesteten Isolate waren weiterhin nicht eindeutig zu bewerten. Jedoch

konnten vier (B74, B190, B198, B254) der sieben zuvor fraglich getesteten Isolate und vier (B242, B282, B289, B334) der zunächst positiv getesteten Isolate als eindeutig negativ gewertet werden (siehe Abb. 35). Somit wurden mit dem endgültigen Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests noch 32 *Bacillus* spp.-Isolate von rPlyG lysiert. Dadurch konnte die Spezifität des Tests weiter verbessert werden. Auffällig ist außerdem, dass die Ergebniswerte der falsch positiven meist deutlich niedriger waren als diejenigen der richtig positiven *B. anthracis*-Isolate (vgl. Abb. 29).

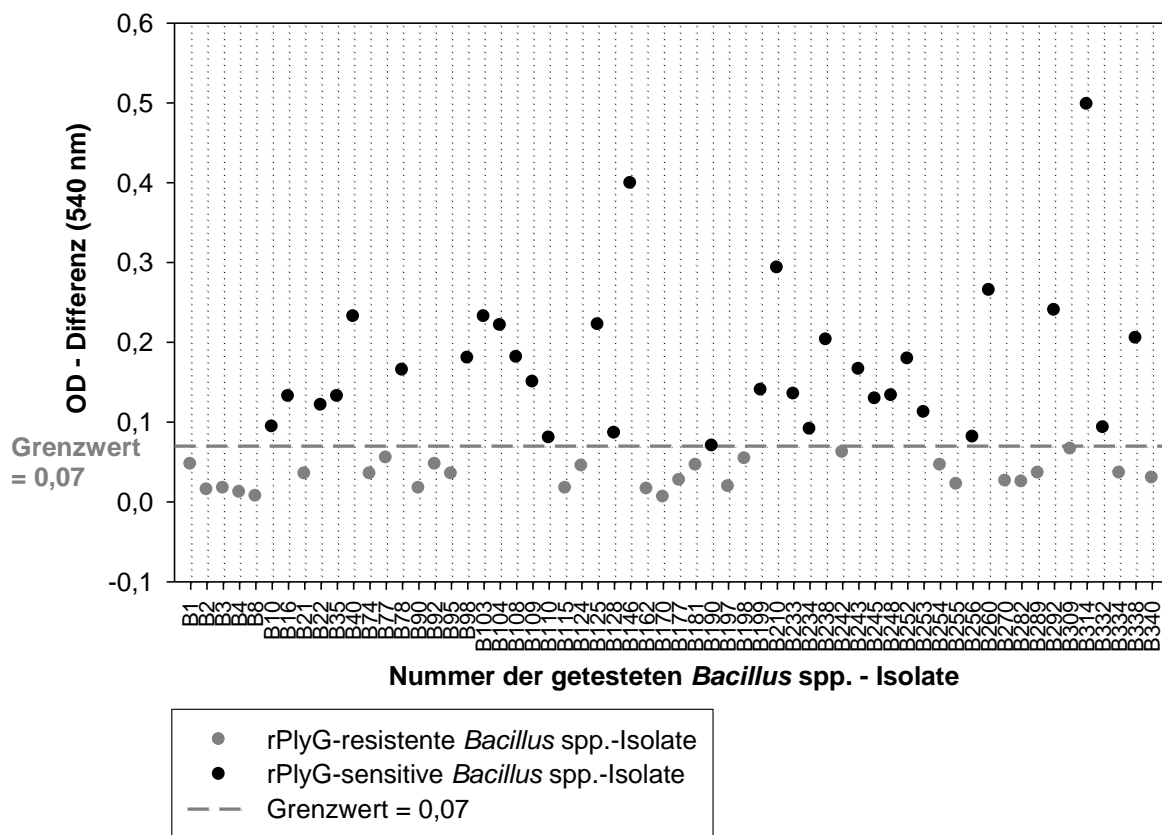


Abb. 35: OD<sub>540</sub>-Differenzen von 60 *Bacillus* spp.-Isolaten im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest (endgültiges Protokoll).

Die Ergebnisse der jeweiligen rPlyG-Lysetests geben außerdem Aufschluss über die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Spezies im Bezug auf ihre rPlyG-Sensitivität. Nach der Auswertung der Ergebnisse mit dem vorläufigen Protokoll der rPlyG-Lysetests gehörten 69,2 % der rPlyG-sensitiven Isolate zur Spezies *B. cereus*. Insgesamt wurden 28,4 % (27 Isolate) der 95 *B. cereus*-Isolate von rPlyG lysiert. Darüber hinaus wurden alle drei in der Stammsammlung enthaltenen

Isolate von *B. laterosporus* von rPlyG lysiert. Hingegen wurde kein Isolat der Spezies *B. subtilis* lysiert, obwohl dieser mit 19 Isolaten als zweithäufigster Vertreter aller *Bacillus* spp.-Isolate (außer *B. anthracis*) in der Stammsammlung enthalten ist. Eine Übersicht über das Verhältnis rPlyG-resistenter und -sensitiver *Bacillus* spp.-Isolate nach vorläufigem Protokoll des rPlyG-Lysetests zeigt Abb. 36.

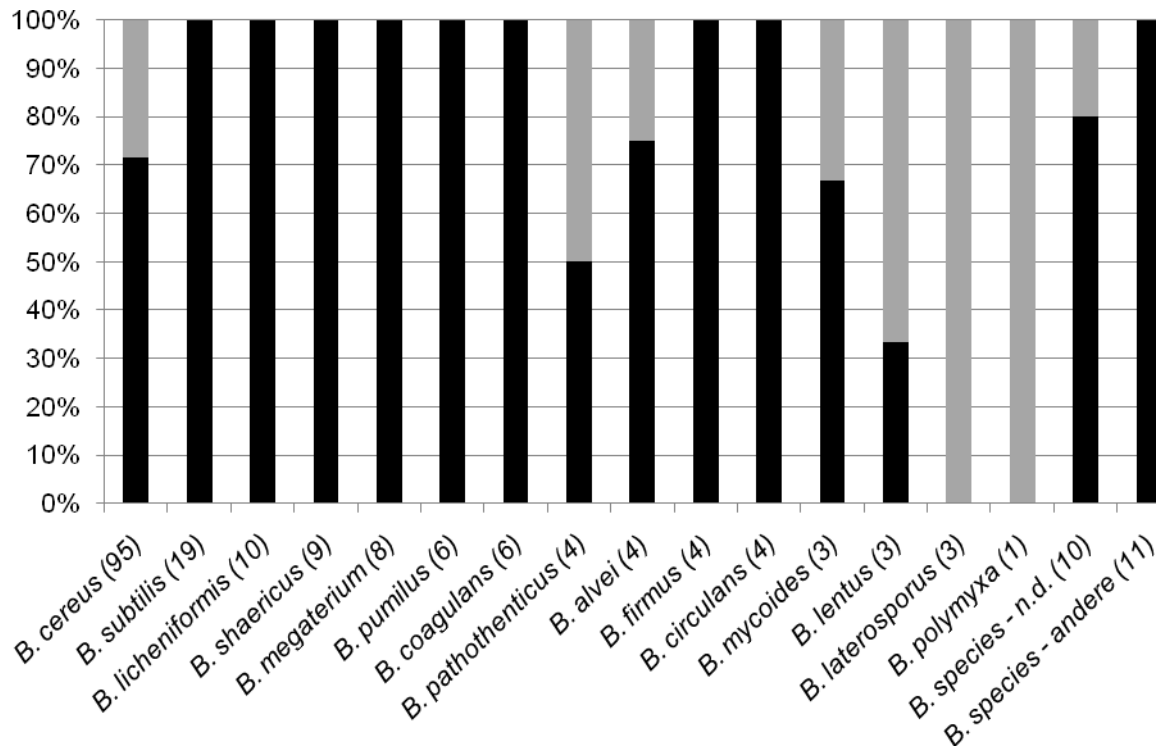


Abb. 36: Häufigkeitsverteilung von rPlyG-resistent (schwarz) und -sensitiv (grau) getesteten 200 Isolaten anderer *Bacillus* spp. nach vorläufigem Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests. Die Zahl hinter der Speziesbezeichnung gibt die Anzahl der getesteten Isolate an.

Im Vergleich dazu zeigt Abb. 37 die Häufigkeitsverteilung der 60 nach endgültigem Protokoll untersuchten anderen *Bacillus* spp.-Isolate. Hierbei bestätigt sich die hohe Anzahl an rPlyG-sensitiven *B. cereus*-Isolaten mit 65,6 % (21 Isolate) aller 32 sensitiv getesteten Isolate. Dies entspricht 61,8 % von 34 getesteten *B. cereus*-Isolaten. Ebenso wurden weiterhin alle drei Isolate der Spezies *B. laterosporus* von rPlyG lysiert.

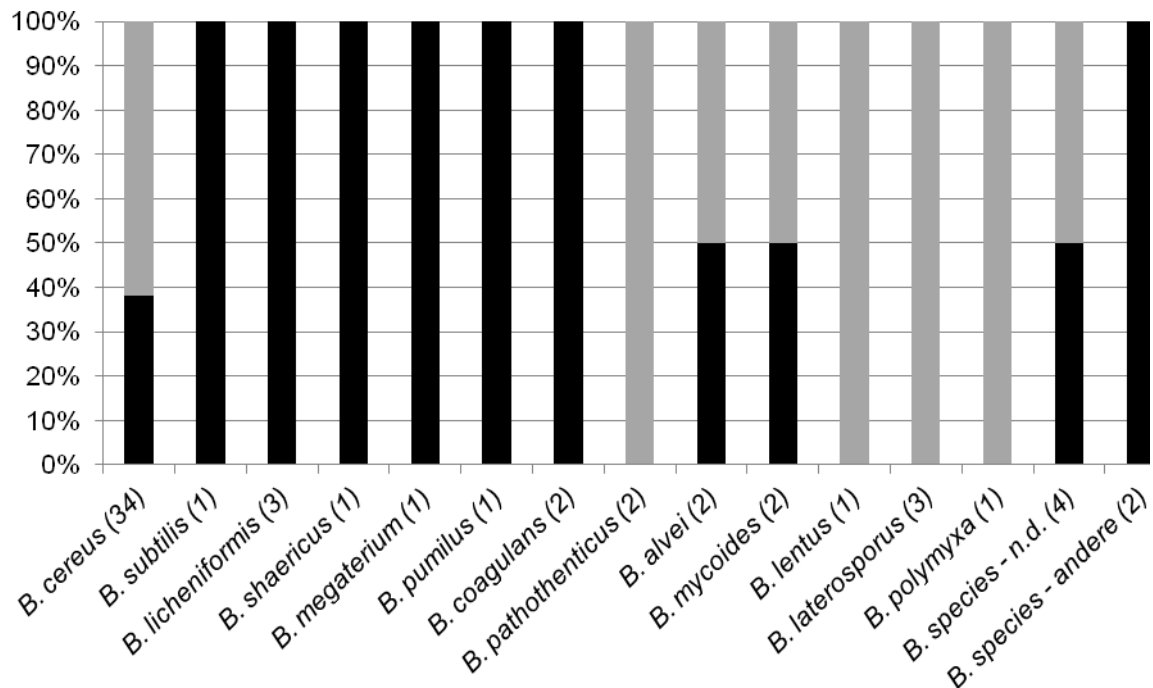


Abb. 37: Häufigkeitsverteilung von rPlyG-resistent (schwarz) und -sensitiv (grau) getesteten 60 Isolaten anderer *Bacillus* spp. nach engültigem Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests. Die Zahl hinter der Speziesbezeichnung gibt die Anzahl der getesteten Isolate an.

## 4.6 Prüfung der *Bacillus* spp.-Isolate im $\gamma$ -Phagentest

### 4.6.1 Ergebnisse der *B. anthracis*-Isolate im $\gamma$ -Phagentest

Alle 108 *B. anthracis*-Isolate wurden vor Aufnahme in die Stammsammlung und zusätzlich im Rahmen der vorliegenden Arbeit im  $\gamma$ -Phagentest untersucht. Routinemäßig wurde dazu der laboreigene  $\gamma$ -Phagentest durchgeführt. Parallel wurde in einigen Fällen, v. a. bei den Isolaten bei denen der laboreigene Test nicht eindeutig auswertbar war, zusätzlich der  $\gamma$ -Phagentest nach ABSHIRE et al. (2005) und der  $\gamma$ -Phagentest mit flüssigem Probenmaterial (siehe 3.5.1) durchgeführt. Lediglich drei Isolate (B127, B135, B136) führten in allen Testansätzen zu keinem positiven Ergebnis. Diese drei Isolate zeigten entweder keine oder nur eine sehr schwache Lysereaktion, bei der die Plaques schon nach kurzer Bebrütungsdauer von einzelnen Kolonien überwachsen wurden und sich

keine klare Abgrenzung zum Bakterienrasen zeigte. Alle übrigen 105 Isolate reagierten eindeutig sensitiv auf den  $\gamma$ -Phagen (siehe Tab. 16). Bei der Anwendung der unterschiedlichen Methoden des  $\gamma$ -Phagentests waren keine Unterschiede erkennbar.

#### **4.6.2 Ergebnisse der anderen *Bacillus* spp.-Isolate im $\gamma$ -Phagentest**

Alle *Bacillus* spp.-Isolate, die nicht der Spezies *B. anthracis* angehörten, waren vor Aufnahme in die Stammsammlung im Labor des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim mit dem laboreigenen  $\gamma$ -Phagentest untersucht worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 60 der 200 Isolate im laboreigenen  $\gamma$ -Phagentest und teils auch mit den weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Varianten des  $\gamma$ -Phagentests (siehe 3.5.1) überprüft. Zu den untersuchten Isolaten zählten vor allem diejenigen, die in einem der rPlyG-Lysetests kein negatives Ergebnis zeigten. Im  $\gamma$ -Phagentest reagierten nur drei der getesteten *Bacillus* spp.-Isolate (B16, B146, B338 = ATCC4342) positiv und weitere drei Isolate (B10, B197, B238) waren nicht eindeutig zu bewerten (siehe Tab. 9 und Tab. 17). Diese Ergebnisse ließen sich jeweils mit den anderen drei in dieser Arbeit durchgeführten Varianten des  $\gamma$ -Phagentests bestätigen.

### **4.7 Vergleich der Ergebnisse der *Bacillus* spp.-Isolate in den angewendeten Testmethoden**

#### **4.7.1 Vergleich der Ergebnisse der *B. anthracis*-Isolate im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest und im $\gamma$ -Phagentest**

Der Vergleich aller Ergebnisse im endgültigen Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests und im  $\gamma$ -Phagentest zeigt, dass die Sensitivität des Lysetests mit 93,5 % etwas niedriger lag als diejenige des  $\gamma$ -Phagentests mit 97,2 %. Erweitert man jedoch das Protokoll des rPlyG-Lysetests um die ü. N.-bebrüteten Kulturen, so sind die Sensitivitäten der beiden Tests identisch (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Vergleich der Ergebnisse aller 108 *B. anthracis*-Isolate im endgültigen rPlyG-Lysetest und im  $\gamma$ -Phagentest.

Reaktionsmuster	Testergebnisse		Anzahl der Isolate	Anteil an den untersuchten Isolaten (%)
	endgültiger kolorimetrischer rPlyG-Lysetest	laboreigener $\gamma$ -Phagentest		
1	+	+	101	93,5
2	+ (aus ü. N.-Kultur)	+	4	3,7
3	-	- (+/-)	2 (1)	2,8
<b>Summe</b>			<b>108</b>	<b>100</b>

Legende: +: positives Testergebnis  
 -: negatives Testergebnis  
 +/-: fragliches, in Wiederholungen widersprüchliches Testergebnis

#### 4.7.2 Vergleich der Ergebnisse der anderen *Bacillus* spp.-Isolate in den einzelnen rPlyG-Lysetests und im $\gamma$ -Phagentest

Tab. 10 zeigt die Reaktionsmuster der 200 anderen *Bacillus* spp.-Isolate in den einzelnen in dieser Arbeit entwickelten rPlyG-Lysetests und dem  $\gamma$ -Phagentest. Dazu wurden die jeweiligen Ergebnisse des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests (Variante 2), des vorläufigen und des endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests und des  $\gamma$ -Phagentests gegenübergestellt. Allerdings wurden im endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetest nur 60 der 200 Isolate getestet.

Die Anzahl der falsch positiven und fraglich getesteten *Bacillus* spp.-Isolate konnte im Verlauf der Optimierung von 44 Isolaten (22 %) im turbidimetrischen rPlyG-Lysetests (Reaktionsmuster a, b, c, d, e) auf 39 Isolate (19,5 %) im vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetest (Reaktionsmuster a, b, c, d, f) reduziert werden. Im endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetest wurden noch 32 (53,3 %) der 60 getesteten Isolate falsch positiv oder fraglich getestet (Reaktionsmuster a, b, f, g).

Tab. 10: Vergleich der Ergebnisse von 200 anderen *Bacillus* spp.-Isolaten in den angewendeten Methoden

Reaktions- muster	Testergebnisse				Anzahl der Isolate	Anteil an den unter- suchten Isolaten (%)
	turbidimetrischer rPlyG-Lysetest (Variante 2)	vorläufiger kolorimetrischer rPlyG-Lysetest	endgültiger kolorimetrischer rPlyG-Lysetest	laboreigener $\gamma$ -Phagentest		
a	+	+	+	+ (+/-)	3 (2)	2,5
b	+ (+/-)	+	+	-	19 (3)	11,5
c	+ (+/-)	+	-	-	2 (2)	2,0
d	+ (+/-)	+/-	-	-	2 (2)	2,0
e	+ (+/-)	-	n. t.	-	6 (3)	4,5
f	-	+ (+/-)	+ (+/-)	-	1 (3)	1,5
g	-	-	+	-	1	0,5
h	-	-	-	+/-	1	0,5
i	-	-	-	-	19	9,5
j	-	-	n. t.	-	131	65,5
<b>Summe</b>					<b>200</b>	<b>100</b>

Legende: +: positives Testergebnis

-: negatives Testergebnis

+/-: fragliches, in Wiederholungen widersprüchliches Testergebnis

n. t.: nicht getestet

Bei einigen Isolaten zeigten sich Auffälligkeiten beim Vergleich der einzelnen Testergebnisse. Das *B. lentus*-Isolat B35 führte nur im endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetest zu einem falsch positiven Ergebnis, in den vorangegangenen Tests wurde es negativ getestet (Reaktionsmuster g). Vier Isolate (B98, B128, B256 und B332) waren im zunächst entwickelten turbidimetrischen rPlyG-Lysetest negativ, bei Untersuchungen im vorläufigen und endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetest war dagegen bei einem Isolat (B98) jeweils eine eindeutige Lyse nachweisbar, bei drei Isolaten kam es zu einem

fraglichen Ergebnis (Reaktionsmuster f). Diese Ergebnisse wurden jeweils durch mehrere Wiederholungen der Tests bestätigt.

Darüber hinaus sollten die in dieser Arbeit entwickelten Tests mit dem klassischen  $\gamma$ -Phagentest verglichen werden. Dafür wurden 60 *Bacillus* spp.-Isolate im Rahmen dieser Arbeit im klassischen  $\gamma$ -Phagentest untersucht und die Ergebnisse der übrigen 140 Isolate von vorangegangenen laborinternen Untersuchungen übernommen (siehe Tab. 17). Keines dieser 140 Isolate zeigte eine Lyse durch den  $\gamma$ -Phagen oder einen der in dieser Arbeit durchgeführten rPlyG-Lysetests. Von den 60 eigens untersuchten Isolaten wurden sechs vom  $\gamma$ -Phagen lysiert, was einer Spezifität von 90 % entspricht. Bezieht man die vorangegangenen Untersuchungen des Instituts aller 200 Isolate mit in die Berechnung ein (siehe Tab. 10) so liegt die Spezifität des  $\gamma$ -Phagentest bei 97 %.

Beim Vergleich der einzelnen Testergebnisse fiel auf, dass ein Isolat (B197), das vom  $\gamma$ -Phagen teilweise lysiert wurde, in keinem der drei rPlyG-Lysetests positiv reagierte (Reaktionsmuster h), dagegen wurden fünf Isolate (B10, B16, B146, B238 und B338), die im  $\gamma$ -Phagentest positive bzw. fragliche Ergebnisse aufwiesen, auch in allen drei Lysetests von rPlyG lysiert (Reaktionsmuster a). Weitere 44 Isolate (Reaktionsmuster b, c, d, e, f, g) wurden im  $\gamma$ -Phagentest negativ getestet, führten jedoch in mindestens einem der drei rPlyG-Lysetests zu positiven bzw. fraglichen Ergebnissen.



#### 4.8 Korrelation zwischen den hämolytischen Eigenschaften der *Bacillus*-Isolate und ihren Ergebnissen im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest

Die fehlende Hämolyseeigenschaft auf Schafblutagar von *B. anthracis* ist eine der wichtigsten Kriterien in der Differenzierung der *Bacillus*-Spezies und soll im Rahmen dieser Arbeit mit den vorliegenden Ergebnissen verglichen werden. Wie unter Abschnitt 3.1.2 beschrieben, wurde der kolorimetrische rPlyG-Lysetest mit Hilfe von 200 *Bacillus* spp.-Isolaten validiert, die aus verschiedenen Gründen in die Stammsammlung aufgenommen worden waren. Sie besteht nicht nur aus Isolaten, die in der Routinediagnostik auf *B. anthracis* als „verdächtig“ einzustufen waren, sondern auch aus Isolaten, die auf Grund ihrer Koloniemorphologie und insbesondere ihrer hämolytischen Eigenschaft eindeutig von *B. anthracis* zu differenzieren waren. Bei diesen Isolaten würden in der Routinediagnostik keine weiterführenden Untersuchungen wie die Testung im klassischen  $\gamma$ -Phagentest oder im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest eingeleitet werden.

Keines der 108 *B. anthracis*-Isolate, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden, reagierte auf Schafblutagar hämolytisch. Dagegen erzeugten 180 der 200 anderen *Bacillus* spp.-Isolate auf diesem Agar deutliche Hämolyse-Höfe. Von den 39 Isolaten, die im vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetest mit positivem oder fraglichem Ergebnis getestet wurden, riefen 30 Isolate eine Hämolysezone hervor und würden somit nicht als *B. anthracis*-verdächtige Kolonien in eine weitere Diagnostik mit dem rPlyG-Lysetest eingehen. Nur neun Isolate zeigten kein Hämolyseverhalten und wären als falsch positives Ergebnis des Diagnostiktests von Bedeutung. Die Zahl der falsch positiven Ergebnisse im vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetest lässt sich somit auf 4,5 % reduzieren. Daraus ergibt sich für ein zweistufiges *B. anthracis*-Identifizierungsverfahren aus (1) Screening mittels Hämolysetest auf Schafblutagar und (2) Nachtesten anhämolysierender Isolate mittels vorläufigem kolorimetrischen rPlyG-Lysetest eine Spezifität von 95,5 %. Ohne die Einbeziehung der Hämolyseeigenschaft lag die Spezifität bei 80,5 % (siehe 4.5.2).

Im endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetest wurden nur 60 der 200 anderen *Bacillus* spp.-Isolate getestet. Bei diesen 60 untersuchten Isolaten handelte es sich vor allem um Isolate, die bereits in vorangegangenen Untersuchungen falsch positive und fragliche Ergebnisse in den Lysetests erzielten. Aus den Testergebnissen dieser 60 Isolate ergibt sich für das zweistufige *B. anthracis*-Identifizierungsverfahren eine Spezifität von 86,7 %, da 24 der im endgültigen rPlyG-Lysetest positiv oder fraglich reagierenden Isolate anhämolytische Eigenschaften besaßen, bei einer unveränderten Sensitivität von 97,2 %. Somit war gegenüber der alleinigen Anwendung des endgültigen rPlyG-Lysetest mit einer Spezifität von 46,7 % eine deutliche Verbesserung erkennbar.

Tab. 11: Vergleich der Hämolyseeigenschaften aller *Bacillus* spp.-Isolate mit den Ergebnissen des rPlyG-Lysetests.

<i>Bacillus</i> spp.	Ergebnis im rPlyG-Lysetest		Anzahl der Isolate	
	vorläufiges Protokoll	endgültiges Protokoll	Hämolyse	keine Hämolyse
<i>B. anthracis</i>	n. t.	+	0	101 (93,5 %)
	n. t.	+ (aus ü. N.- Kultur)	0	4 (3,7 %)
	n. t.	-	0	3 (2,8 %)
	<b>gesamt</b>		<b>0</b>	<b>108 (100 %)</b>
andere <i>Bacillus</i> spp.	+	+	23 (11,5 %)	5 (2,5 %)
	+/-	+/-	1 (0,5 %)	2 (1,0 %)
	+	-	3 (1,5 %)	1 (0,5 %)
	+/-	-	3 (1,5 %)	1 (0,5 %)
	-	+	0	1 (0,5 %)
	-	-	20 (10 %)	0
	-	n. t.	130 (65 %)	10 (5,0 %)
	<b>gesamt</b>		<b>180 (90 %)</b>	<b>20 (10 %)</b>

Legende: +: positives Testergebnis

- : negatives Testergebnis

+/-: fragliches, in Wiederholungen widersprüchliches Testergebnis

n. t.: nicht getestet

#### 4.9 Wirkung des rPlyG auf bekapselte Zellen von *B. anthracis*

Für den Nachweis der lytischen Wirkung von rPlyG auf bekapselte Zellen von *B. anthracis*, wurden der pXO2-positive Stamm A93, der pXO2-negative Stamm A58 und der *B. cereus*-Stamm B181 jeweils parallel getestet. Von diesen Stämmen ist demnach nur das Isolat A93 fähig, eine Kapsel auszubilden. Zunächst wurden die Stämme auf TS-Agar mit Zusatz von NaHCO<sub>3</sub> ausgestrichen und in einer Atmosphäre mit 20 % CO<sub>2</sub> bebrütet. Anschließend wurde die Kapselbildung überprüft (siehe 3.5.3) und ein kolorimetrischer rPlyG-Lysetest nach endgültigem Protokoll durchgeführt. Dabei ließ sich bei keinem der Stämme eine Lyse nachweisen. Infolgedessen musste davon ausgegangen werden, dass die Wirkung des rPlyG durch einen der Inhaltsstoffe des TS-Agars negativ beeinflusst wurde.

Alternativ wurde deshalb die Anzucht der Stämme in FKS vorgenommen und die Flüssigkultur direkt in den kolorimetrischen rPlyG-Lysetest eingesetzt. Hierzu wurden die Stämme parallel sowohl in reinem FKS als auch in FKS mit 0,7 % NaHCO<sub>3</sub> in einer Atmosphäre mit 20 % CO<sub>2</sub> und 37 °C über Nacht bebrütet. Nachdem mittels Tuschkontrastierung bestätigt wurde, dass die Bakterienzellen des *B. anthracis*-Stammes A93 nur bei Anzucht mit NaHCO<sub>3</sub> eine Kapsel ausgebildet hatte, wurden alle sechs Ansätze im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest nach endgültigem Protokoll getestet. Wie Abb. 38 zeigt, wurde der *B. cereus*-Stamm B181 in beiden Ansätzen nicht lysiert, während sowohl der Stamm A93 als auch der Stamm A58 jeweils in beiden Ansätzen lysiert wurde. Dabei fiel auf, dass die OD-Differenzen in den beiden Ansätzen mit Zusatz von NaHCO<sub>3</sub> deutlich niedriger ausfielen als in den Ansätzen ohne NaHCO<sub>3</sub>.

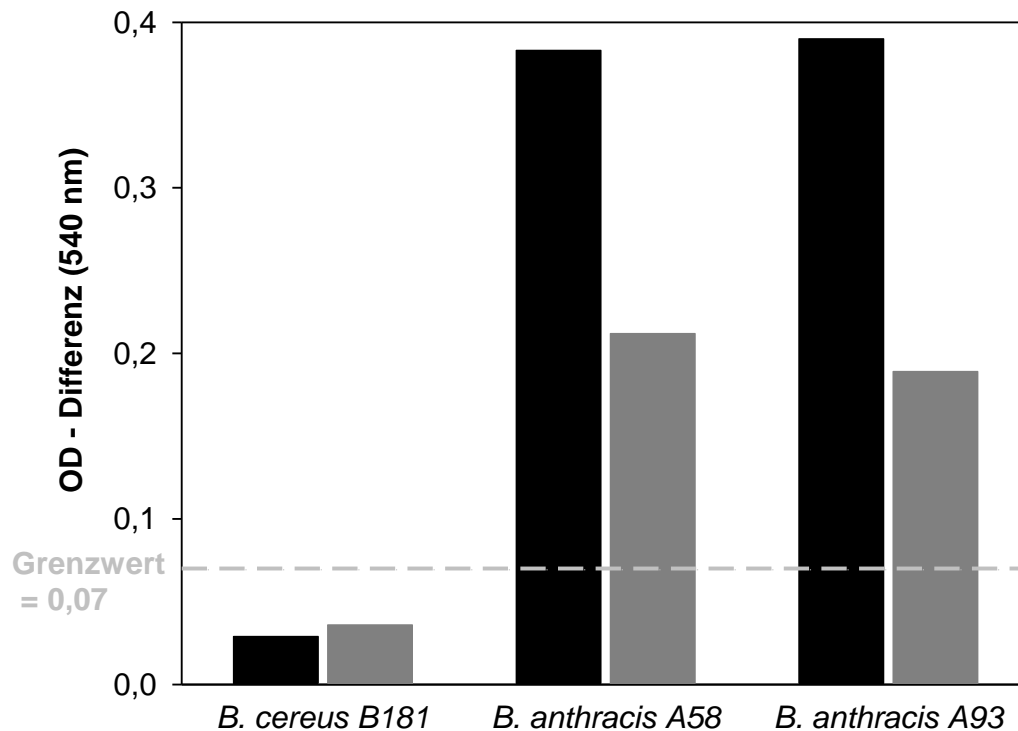


Abb. 38: Ergebnisse des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests (endgültiges Protokoll) nach Anzucht verschiedener *Bacillus* spp.-Stämme in FKS und in einer Atmosphäre mit 20 % CO<sub>2</sub> (schwarze Balken) und Zusatz von NaHCO<sub>3</sub> (graue Balken) zur Ausbildung einer Kapsel.

Vergleichend zu den Tests mit rPlyG wurde aus Bakterienkulturen derselben Stämme ein  $\gamma$ -Phagentest in Flüssigkultur und nach laboreigenem Protokoll auf einer Agarplatte (siehe 3.5.1) durchgeführt, um die Wirkung des  $\gamma$ -Phagen auf bekapselte Zellen zu prüfen. Dazu wurden für den Ansatz in Flüssigkultur jeweils 100  $\mu$ l der ü. N.-Kultur in 5 ml FKS ohne bzw. mit NaHCO<sub>3</sub> überführt und für 6 h bei 37 °C in 20 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bebrütet. Nach weiteren 6 h Inkubation in Anwesenheit des  $\gamma$ -Phagen waren die Bakterien von *B. anthracis* A58 in beiden Ansätzen lysiert, ebenso wie die Bakterien vom Stamm A93 im Ansatz ohne NaHCO<sub>3</sub>. Beide Ansätze von *B. cereus* B181 sowie der Ansatz von Stamm A93 mit NaHCO<sub>3</sub> in welchem die Kapselbildung nachweisbar war, zeigten eine Trübung der Bouillon bzw. einen wolkigen Bodensatz (siehe Abb. 39) und somit keine Lyse durch den  $\gamma$ -Phagen.

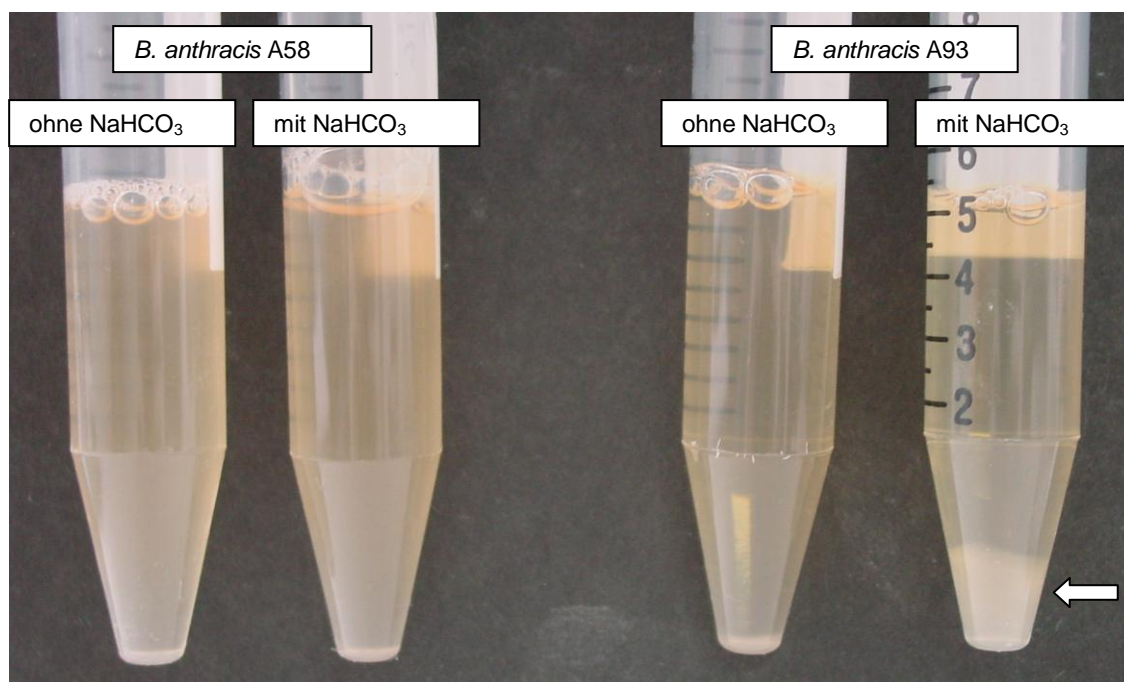


Abb. 39: Nachweis der Lyse von Bakterienzellen der *B. anthracis*-Isolate A58 und A93 nach Durchführung des  $\gamma$ -Phagentest in Flüssigkultur nach Bebrütung ohne und mit NaHCO<sub>3</sub> und in 20 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Der Pfeil zeigt das Bakterienpellet bei dem Ansatz mit ausgebildeter Kapsel.

Ergebnis: *B. anthracis* A58, ohne NaHCO<sub>3</sub>: Lyse  
*B. anthracis* A58, mit NaHCO<sub>3</sub>: Lyse  
*B. anthracis* A93, ohne NaHCO<sub>3</sub>: Lyse  
*B. anthracis* A93, mit NaHCO<sub>3</sub>: keine Lyse

Das Ergebnis des  $\gamma$ -Phagentests in Flüssigkultur sollte nachträglich auch mit Ergebnissen des  $\gamma$ -Phagentests nach laboreigenem Protokoll verglichen werden. Dafür wurde der  $\gamma$ -Phagentest nach laboreigenem Protokoll auf Blutagar mit und ohne Zusatz von NaHCO<sub>3</sub> bei 37 °C und in 20 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre über Nacht durchgeführt. Die Ausbildung der Kapsel wurde jeweils nach 3.5.3 überprüft. Eine Lyse war aber auch mit diesem Protokoll bei den bekapselten Bakterienzellen des Stammes A93 (Ansatz mit NaHCO<sub>3</sub>) nicht nachweisbar. Die unbekapselten Bakterienzellen des *B. anthracis*-Stammes A58 sowie des Stammes A93 (Ansatz ohne NaHCO<sub>3</sub>-Zusatz im Blutagar) ließen sich durch den  $\gamma$ -Phagen aber zerstören. Diese Ergebnisse zeigen, dass der  $\gamma$ -Phage im Gegensatz zum rPlyG nicht in der Lage ist, bekapselte *B. anthracis*-Bakterienzellen zu lysieren.

#### 4.10 Wirkung des rPlyG auf Sporen von *B. anthracis*

Die Wirkung des rPlyG auf Sporen von *B. anthracis* sollte näher untersucht werden, um für die Präparation von DNA zur Anwendung in der PCR-Diagnostik eingesetzt zu werden. Die Bakterien von *B. anthracis* versporen innerhalb kurzer Zeit und DNA kann dann erst nach induzierter Germination freipräpariert werden. Für die Überprüfung der rPlyG-Wirkung wurden Sporensuspensionen mit unterschiedlichen Konzentrationen in Germinationspuffer und unter Zugabe von rPlyG inkubiert und anschließend in der LightCycler-PCR analysiert.

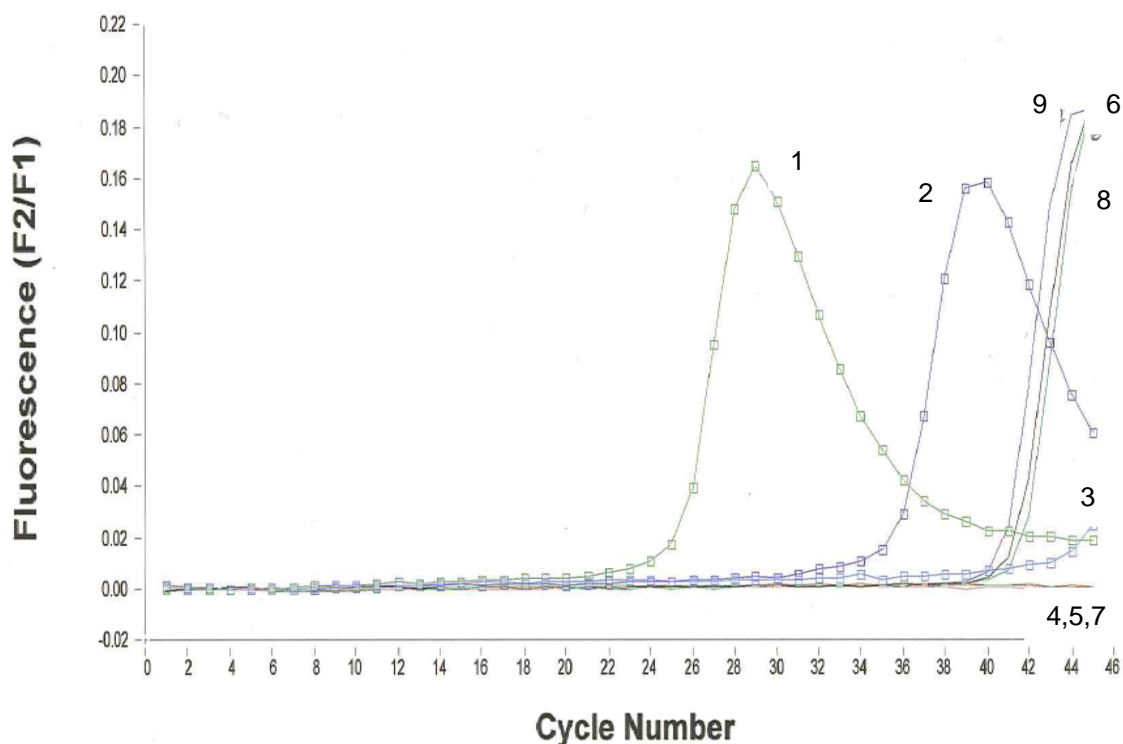


Abb. 40: Ergebnis der LightCycler-PCR zum Nachweis von Toxinplasmid in Sporen ( $10^2$ /Ansatz) des *B. anthracis*-Stammes A1.

- 1 und 2: Positivkontrolle *B. anthracis* A1 (1 ng, 1 pg)  
3: Negativkontrolle

Inkubation von *B. anthracis*-Sporen (Stamm A1):

- 4: in PBS, 20 min, 37 °C  
5: in PBS mit rPlyG (Endkonzentration 10 µg/ml), 20 min, 37 °C  
6: in Germinationspuffer, 40 min, 37 °C  
7: in Germinationspuffer, 40 min, 37 °C, anschl. mit rPlyG (Endkonzentration 10 µg/ml), 20 min, 37 °C  
8: in Germinationspuffer, 60 min, 37 °C  
9: in Germinationspuffer, 60 min, 37 °C, anschl. mit rPlyG (Endkonzentration 10 µg/ml), 20 min, 37 °C

Aus den Versuchen zur DNA-Präparation direkt aus Sporenmaterial wurde deutlich, dass Sporen nicht durch rPlyG lysiert werden. Weder bei direkter Inkubation von Sporen mit rPlyG noch nach vorangegangener Inkubationszeit in einem Germinationspuffer von 40 min und anschließender Zugabe von rPlyG konnte durch Lyse freigesetzte DNA nachgewiesen werden. Erst nach 60-minütiger Inkubation in Germinationspuffer und anschließender Zugabe von rPlyG kann Plasmid-DNA nachgewiesen werden. Die Zugabe von rPlyG brachte jedoch gegenüber der alleinigen Verwendung von Germinationspuffer keinen Vorteil.

#### **4.11 Anwendung des rPlyG zur DNA-Präparation aus vegetativen Zellen von *B. anthracis***

Nach der rPlyG-vermittelten Lyse der Bakterienzellen sollte freie DNA in einer Suspension vorliegen, die dann direkt in eine PCR eingesetzt werden kann. Für diese Untersuchung wurde eine ü. N.-Kultur vom *B. anthracis*-Isolat A72 angezüchtet und die DNA wie im Abschnitt 3.5.4 beschrieben, präpariert. Die DNA-Präparation wurde parallel in vier verschiedenen Reaktionsmedien getestet: H<sub>2</sub>O ddion., PBS, TE-Puffer und 10-fach konzentrierter Taq-Reaktionspuffer. In diesen Medien wurde die Präparation mit drei verschiedenen Methoden durchgeführt: die Lyse durch Inkubation mit rPlyG (Endkonzentration 4 µg/ml) für 20 min bei 37 °C, die Hitzedenaturierung für 5 min bei 100 °C und die Kombination aus beiden. Bei letzterer Methode wurde zuerst mit rPlyG inkubiert und anschließend der gesamte Reaktionsansatz hitzeinaktiviert. Abb. 41 zeigt die freigesetzte DNA auf einem Agarosegel nach unterschiedlichen Arten der Präparation. Die Banden der Bahnen 1 – 7 repräsentieren unterschiedliche DNA-Präparationen mit dem Einsatz von rPlyG und die Bahnen 9 – 12 ohne rPlyG. Dabei wird deutlich, dass beim Einsatz von rPlyG größere DNA-Moleküle freigesetzt werden, wogegen durch Kochen die DNA degradiert. Bei der Präparation mit rPlyG in PBS (Bahn 2) wird das beste Ergebnis erzielt.

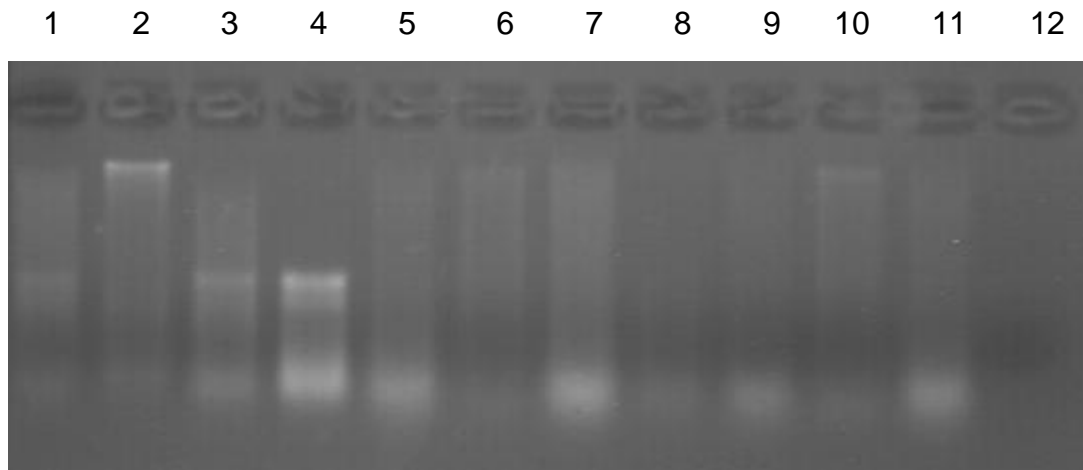


Abb. 41: Analyse der aus Bakterienzellen einer ü. N.-Kultur des *B. anthracis*-Isolat A72 mit verschiedenen Präparationstechniken freigesetzten DNA in einem 0,8 %-igen Agarosegel.

- Bahn 1: ddion. H<sub>2</sub>O, 4 µg/ml rPlyG, 20 min, 37 °C
- Bahn 2: PBS, 4 µg/ml rPlyG, 20 min, 37 °C
- Bahn 3: TE-Puffer, 4 µg/ml rPlyG, 20 min, 37 °C
- Bahn 4: 1 x Taq Reaktionspuffer, 4 µg/ml rPlyG, 20 min, 37 °C
- Bahn 5: ddion. H<sub>2</sub>O, 4 µg/ml rPlyG, 20 min, 37 °C, anschl. 5 min, 100 °C
- Bahn 6: PBS, 4 µg/ml rPlyG, 20 min, 37 °C, anschl. 5 min, 100 °C
- Bahn 7: TE-Puffer, 4 µg/ml rPlyG, 20 min, 37 °C, anschl. 5 min, 100 °C
- Bahn 8: 1xTaq Reaktionspuffer, 4 µg/ml rPlyG, 20 min, 37 °C, anschl. 5 min, 100 °C
- Bahn 9: ddion. H<sub>2</sub>O, 5 min, 100 °C
- Bahn 10: PBS, 5 min, 100 °C
- Bahn 11: TE-Puffer, 5 min, 100 °C
- Bahn 12: 1 x Taq Reaktionspuffer, 5 min, 100 °C

Die Anwendung der mit Hilfe von rPlyG präparierten DNA bot in der Real-Time-PCR zum Nachweis von Toxinplasmid keine Vorteile gegenüber der Präparation mittels Hitzebehandlung (5 min bei 100 °C). Abb. 42 zeigt bei allen drei Präparationsmethoden etwa ab der 18. Zyklenswiederholung einen deutlichen Anstieg des Messsignals und damit das Vorhandensein von freigesetzter DNA.



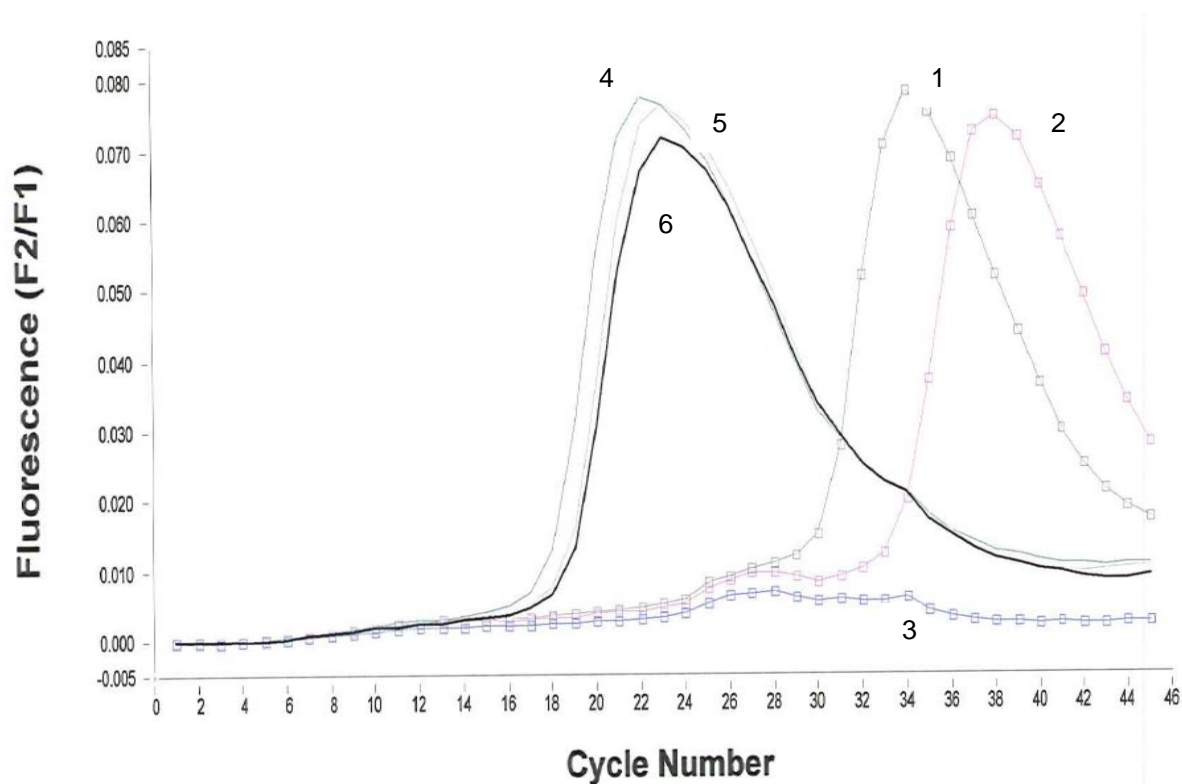


Abb. 42: Ergebnis der LightCycler-PCR zum Nachweis von Toxinplasmid in unterschiedlich präparierter DNA des *B. anthracis*-Isolats A30 in 10-fach konzentriertem Taq-Reaktionspuffer.

1 und 2: Positivkontrolle *B. anthracis* A30 (1 ng, 1 pg)

3: Negativkontrolle

4: Präparation mittels Hitzebehandlung (20 min, 100 °C)

5: Präparation mit rPlyG (Endkonzentration 4 µg/ml), anschl. Hitzebehandlung (20 min, 100 °C)

6: Präparation mit rPlyG (Endkonzentration 4 µg/ml)

#### 4.12 Definition einer Einheit für das rPlyG

Zur Standardisierung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests bei Nutzung verschiedener Produktionschargen des rPlyG erschien es notwendig, eine Wirkeinheit zu definieren. Dabei sollte eine Einheit diejenige Proteinmenge an rPlyG angeben, die innerhalb einer festgelegten Einwirkzeit des rPlyG und bei definierter Temperatur die Bakterienzellzahl des *B. cereus*-Stammes ATCC4342 um eine festgelegte Anzahl an log-Stufen reduziert. Es war ebenfalls zu bestimmen, von welcher Ausgangskonzentration an Bakterien diese Reduktion gemessen werden sollte.

Für die Ermittlung der Wirkeinheit wurde die Keimzahlbestimmung vor und nach Einwirkung von rPlyG dreimal wiederholt. Hierzu wurde eine ü. N.-Kultur des *B. cereus*-Stammes ATCC4342 hergestellt und auf eine  $OD_{600}$  von 0,3 eingestellt. Nach Zugabe der rPlyG-Lösung mit einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml und einer Inkubation von 15 min bei 37 °C wurde die Keimzahl zum Zeitpunkt Null und nach 15 min durch das Kochsche Oberflächenverfahren bestimmt (siehe 3.5.5). Die Untersuchung offenbarte, dass bei konstanter  $OD_{600}$  von 0,3 die tatsächliche Keimzahl zwischen  $10^6$  und  $10^7$  schwanken konnte. Dennoch wurde bei Zugabe der rPlyG-Lösung (Endkonzentration von 0,1 µg/ml) regelmäßig eine Keimzahlreduktion um zwei Zehnerpotenzen innerhalb von 15 min erreicht (siehe Abb. 43).

Eine Wirkeinheit rPlyG wurde somit definiert als diejenige rPlyG-Menge, die innerhalb von 15 min Inkubation bei 37 °C die Bakterienzellzahl des Teststammes *B. cereus* ATCC4342 um zwei Zehnerpotenzen, ausgehend von einer Zellzahl zwischen  $10^6$  und  $10^7$ , reduziert. Dies entsprach für die von uns getestete rPlyG-Charge vom 21.04.2006 einer Menge von 0,1 µg rPlyG.

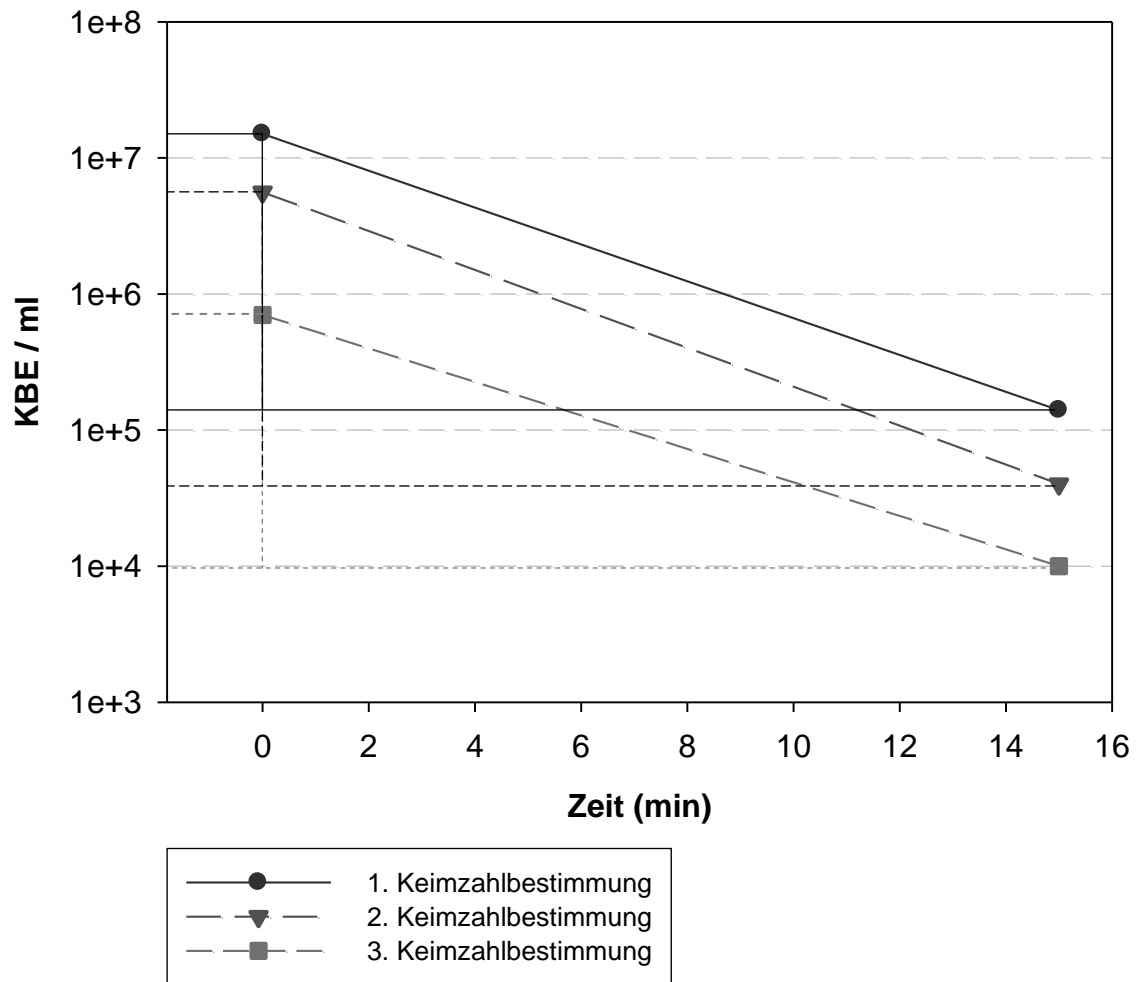


Abb. 43: Keimzahl in einer Bakterienkultur von *B. cereus* ATCC4342 vor und nach Einwirkung von rPlyG in der Endkonzentration von 0,1 µg/ml (Charge vom 21.04.2006).

## 4.13 Überprüfung der Langzeitlagerung des rPlyG

Zur Überprüfung der Lagerstabilität wurde eine Charge des rPlyG in sechs unterschiedlichen Puffern (siehe 3.7.1) sowie eine weitere Charge lyophilisiert in 1 ml-Aliquots bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Nach bestimmten Zeitabständen wurde mit den entsprechenden Aliquots ein rPlyG-Aktivitätstest (siehe 3.6.2) mit einer Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 durchgeführt und die jeweilige OD<sub>600</sub>-Abnahme mit der Abnahme zum Zeitpunkt Null des Lagerversuchs verglichen.

### 4.13.1 Überprüfung der Stabilität des rPlyG in unterschiedlichen Lagerpuffern

Die Aliquots der sechs verschiedenen Lagerpuffer wurden vor der Lagerung und nach 1, 2, 4, 6 und 8 Wochen, sowie nach 3, 6 und 9 Monaten Lagerung im rPlyG-Aktivitätstest (siehe 3.6.2) überprüft. In jedem Test wurden identische Konzentrationen und Volumina der jeweiligen Charge eingesetzt.

Die Kurven in den Abb. 44 und Abb. 45 demonstrieren die größte Aktivität des rPlyG schon vor der Lagerung in HEPES-Puffer mit Zugabe von BSA. Im Verlauf der Lagerung nahm die rPlyG-Aktivität kontinuierlich ab, wenn sie in Puffern gelagert waren, die Glycerol enthielten. Beim Vergleich der rPlyG-Aktivitäten nach der Lagerung in HEPES-Puffer, der Lagerung nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und der Lagerung in HEPES-Puffer mit BSA-Zusatz war kein Unterschied nachweisbar.

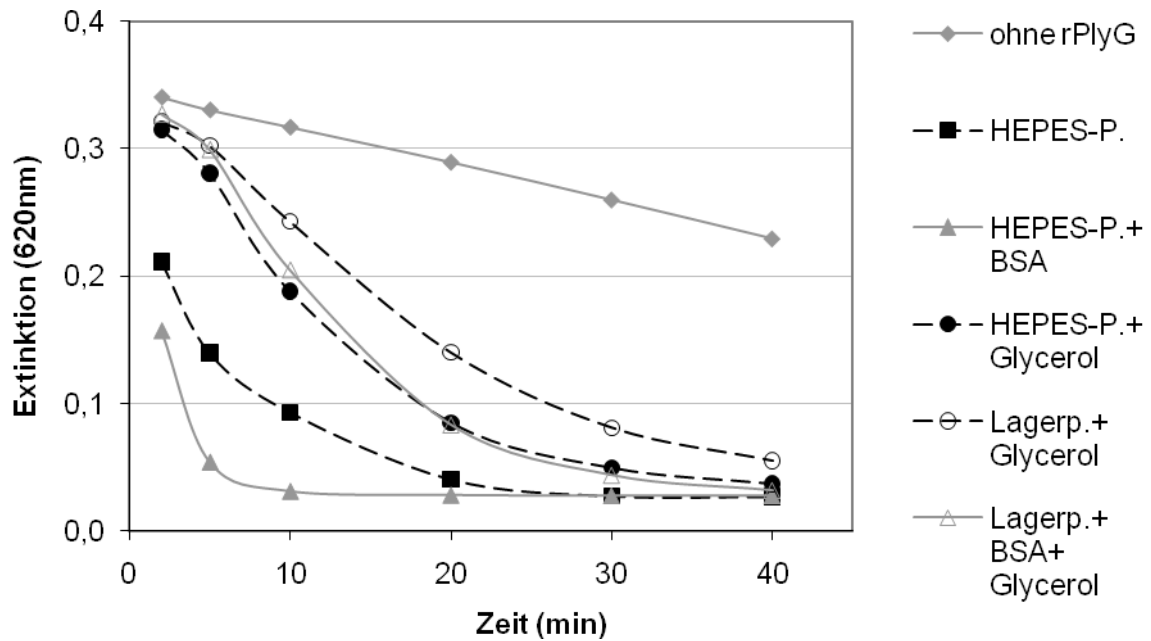


Abb. 44: Ergebnisse des rPlyG-Aktivitätstests mit einer Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 bei Aufnahme des rPlyG in unterschiedlichen Puffern zum Zeitpunkt Null vor der Langzeitlagerung.

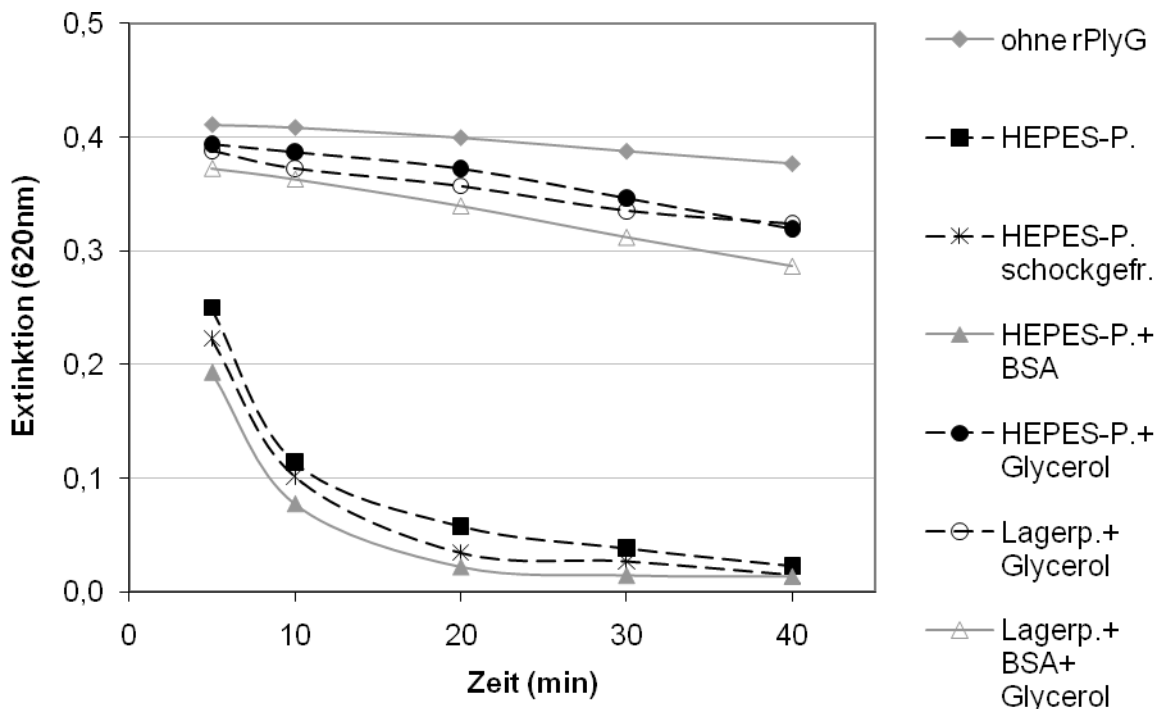


Abb. 45: Ergebnisse des rPlyG-Aktivitätstests mit einer Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 nach 9-monatiger Lagerung des rPlyG in unterschiedlichen Puffern.

#### 4.13.2 Lyophilisation des rPlyG zur Erhöhung der Stabilität bei Lagerung

Eine weitere Charge rPlyG wurde aliquotiert und nach Lyophilisation bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Ein rPlyG-Aktivitätstest (siehe 3.6.2) wurde zum Zeitpunkt Null vor der Lyophilisation und direkt nach der Lyophilisation sowie nach Lagerung über 3, 5 und 8 Monate durchgeführt. Zur Resolubilisierung der Lyophilisate wurden jeweils 500 µl H<sub>2</sub>O ddion. verwendet.

Die Abb. 46 zeigt, dass die Aktivität des rPlyG durch die Lyophilisation nicht vermindert wurde. Auch nach acht Monaten Lagerung war die lytische Aktivität des rPlyG in einer Bakteriensuspension von *B. cereus* ATCC4342 vergleichbar mit der Aktivität zum Zeitpunkt Null.

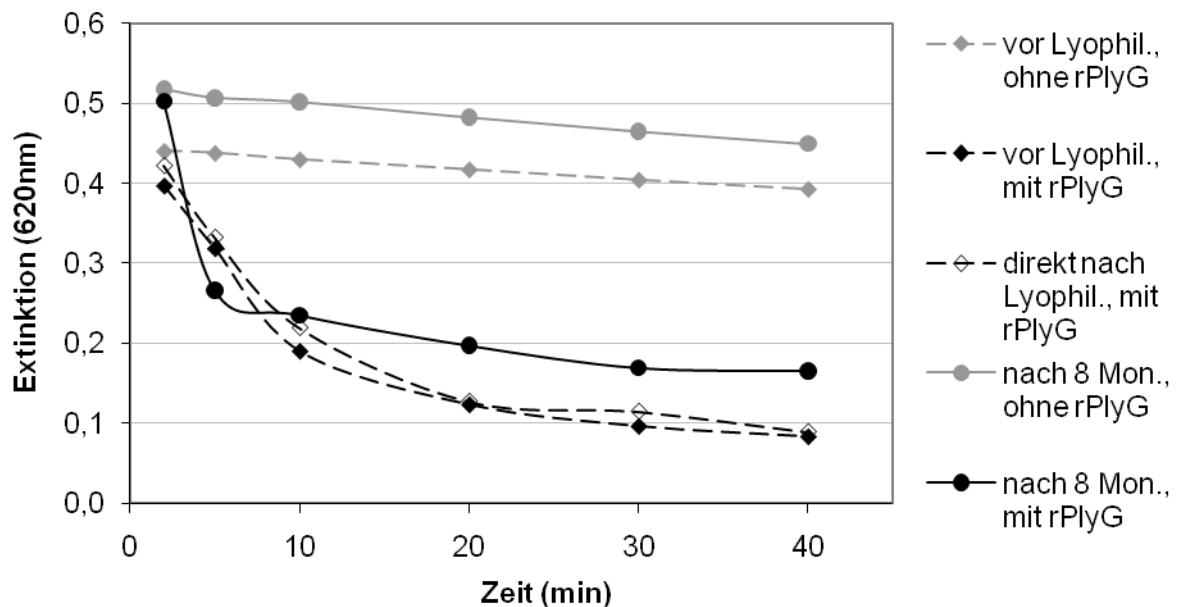


Abb. 46: Zwei rPlyG-Aktivitätstests mit Bakteriensuspensionen von *B. cereus* ATCC4342 im Vergleich: Vor bzw. direkt nach Lyophilisation des rPlyG zum Zeitpunkt Null (gestrichelte Linien) und nach 8 Monaten Lagerung des lyophilisierten rPlyG (durchgehende Linien).

## 5 Diskussion

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass nicht nur der  $\gamma$ -Phage *B. anthracis* spezifisch lysiert, sondern auch das vom  $\gamma$ -Phagen produzierte Endolysin PlyG (SCHUCH et al., 2002). Inhalt dieser Arbeit sollte zunächst die rekombinante Herstellung und die Aufreinigung dieses Phagenlysins mit größtmöglicher Ausbeute und Aktivität sein. Anschließend wurden, zur Überprüfung seiner Spezifität und Sensitivität gegenüber unterschiedlichen *Bacillus* spp. 308 Isolate der Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim getestet. Aus diesen Untersuchungen sollte schließlich die Entwicklung eines neuen Diagnostiktests hervorgehen, der in seiner Zuverlässigkeit dem bisher verwendeten  $\gamma$ -Phagentest entspricht. Die Anforderungen an den neu entwickelten Test bezogen sich vor allem auf eine einfache Abarbeitung ohne aufwändigen Geräteinsatz, große Genauigkeit und unkomplizierte Auswertbarkeit, um den Test auch in einfach ausgestatteten Laboren, wie etwa in Ländern Afrikas und Asiens, anwenden zu können. Zusätzlich sollte eine hohe Sensitivität und Spezifität erreicht werden und allgemein gezeigt werden, dass rekombinant hergestellte Phagenlysine für die Anwendung in der Diagnostik geeignet sind. Aktuelle klinische Ausbrüche in Europa (RAMSAY et al., 2010; OIE, 2009) und bioterroristische Angriffe (INGLESBY et al., 2002; SCHMID und KAUFMANN, 2002) zeigen, dass ein schneller, sicherer und kostengünstiger Test nicht nur für diejenigen Länder von großer Bedeutung ist, in denen Milzbrand noch immer endemisch vorkommt, sondern auch für alle anderen Nationen.

### 5.1 Rekombinante Herstellung des rPlyG

In einer vorangegangenen Diplomarbeit (LEMNITZER, 2005) am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim wurden bereits mehrere Versuche zur Expression des rPlyG mit unterschiedlichen Organismen durchgeführt. Ebenso wurden verschiedene Expressionsbedingungen untersucht und die Aufreinigung mittels Metallchelat-Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie miteinander verglichen. Dabei erzielte eine Expression im *E. coli*

OrigamiB pQE60 pREP4 und eine anschließende Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie die besten Ergebnisse.

Das Expressionssystem *E. coli* OrigamiB eignet sich auf Grund seiner Mutationen in den Genen der Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und der Glutathion-Reduktase (*gor*) besonders gut für die Expression von rPlyG. Das Endolysin besitzt in seiner Aminosäuresequenz vier Cysteine, die untereinander Disulfidbrücken ausbilden. Diese Ausbildung scheint für die Aktivität von rPlyG Voraussetzung zu sein. Rekombinantes PlyG, das mittels anderer Expressionssystemen produziert wurde, wies dagegen keine bzw. nur geringere Aktivität auf (LEMNITZER, 2005). Es ist außerdem bekannt, dass die Ausbildung von Disulfidbrücken in anderen Expressionssystemen, die diese oben genannten Mutationen nicht besitzen, verhindert wird (PRINZ et al., 1997). Die beiden Reduktasen spielen eine wichtige Rolle im cytoplasmatischen Disulfid-Metabolismus und stellen ein physiologisches Reduktionsmittel dar (VOET und VOET, 1992). Durch die Mutationen in den Reduktasen kommt es im Zytoplasma zu leicht oxidativen Bedingungen, die die Ausbildung der Disulfidbrücken begünstigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus eine periplasmatische Expression des rPlyG im *E. coli* Top 10F' pBAD/gIII A untersucht. Mit Hilfe der aminoterminalen Gensequenz gIII sollte das Protein über den Sec-Proteintranslokationsweg in den periplasmatischen Raum der Bakterienzelle sekretiert werden und die Sequenz nach der Translokation durch die Signalpeptidase abgespalten werden. Da im Periplasma im Vergleich zum Zytoplasma kein reduzierendes Milieu herrschte, sollten die Ausbildung von Schwefelbrücken und damit eine korrekte Faltung des Proteins und eine Erhöhung der Proteinausbeute gewährleistet sein. Hierzu wurden verschiedene Versuchsansätze mit unterschiedlicher Arabinose-Konzentration und Expressionsdauer durchgeführt und der *E. coli* LMG194 pBAD/gIII A als weiteres Expressionssystem getestet. Es ließ sich jedoch bei keinem der Versuchsansätze eine periplasmatische Expression nachweisen. Dagegen war das rPlyG immer im Zytoplasma nachweisbar (siehe Abb. 8), was zeigt, dass eine Expression stattgefunden hat. Die Einstellung der Arabinose-Konzentration ist laut den Angaben des Herstellers Invitrogen™ essentiell für die Optimierung der



Expression. Außerdem wird die Regulation des Promotors pBAD als sehr sensibel beschrieben und die Expression soll durch Veränderung der Arabinose-Konzentration gesteuert werden können. Schon bei geringer Menge an Arabinose soll eine hohe Expressionsrate erreicht werden (CLARK et. al., 1997). In den hier durchgeführten Versuchen wurde mit einer Konzentration von 0,02 % und 0,2 % L-Arabinose getestet. Schon bei 0,02 % L-Arabinose war eine deutliche Expression erkennbar. Es wurden Inkubationszeiten von 4 h, 6 h und über Nacht untersucht. Durch einen osmotischen Schock wurde die Zellwand zum Platzen gebracht, um die Inhaltsstoffe des Periplasmas selektiv der Analyse zugänglich zu machen. Auf diese Weise sollte geprüft werden, ob sich das rPlyG im periplasmatischen Raum befand. Es konnte jedoch bei keinem der Versuchsansätze eine periplasmatische Expression festgestellt werden, weshalb auch die Menge des produzierten rPlyG nicht näher bestimmt wurde. Die korrekte Durchführung des Tests konnte in jedem Ansatz durch die Positivkontrolle *E. coli* Top10F' pBAD/gIII calmodulin (siehe 3.1.4) sichergestellt werden, deren periplasmatische Expression sich durch die Auswertung im SDS-Gel (Abb. 8) nachweisen ließ.

Die Verwendung des Vektors pBAD/gIII A wird nur in wenigen Publikationen beschrieben. Darunter ist die Veröffentlichung von YU (2007), der von einer fünf- bis sechsfachen Steigerung der Enzymaktivität der rekombinant hergestellten Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (Cu,Zn-SOD) berichtet. Der Sec-abhängige Proteintransport kann durch verschiedene Ursachen gestört werden (BRAUN und PASCHKE, 2006): Entweder beginnt die Faltung des Proteins schon im Zytoplasma, wodurch das Protein zu groß ist, um durch die Pore des Sec-Translokons ins Periplasma zu gelangen, oder es kann eine „Stopp Transfer“-Region in der linearen Sequenz des Proteins vorkommen, die den vollständigen Transport des Proteins verhindert. Ein weiterer Grund für die Störung des Proteintransports können die fehlenden Co-Faktoren, wie ATP-abhängige Chaperone, im Periplasma sein. Dabei gelingt zwar ein Transport ins Periplasma, die Faltung des Proteins findet jedoch nicht statt. Ferner besteht die Möglichkeit, dass es durch das oxidierende Milieu im Periplasma zur Ausbildung von nicht-nativen Disulfidbrücken kommt, die somit zu einer fehlerhaften Faltung des Proteins führen. Da in der vorliegenden Arbeit über das SDS-Gel eindeutig gezeigt werden konnte, dass kein Protein im Periplasma vorlag, kann man eine fehlerhafte

oder fehlende Faltung als Ursache bei den hier durchgeführten Untersuchungen ausschließen. Stattdessen waren große Mengen an Protein im Zytoplasma nachweisbar, was darauf schließen lässt, dass kein Transport über die Pore des Sec-Translokons stattgefunden hat. Die mögliche Ursache hierfür wurde nicht näher untersucht, da die parallel untersuchte Expression im *E. coli* OrigamiB pQE60 pREP4 gute Ergebnisse zeigte. Aus diesem Grund wurde auch die Aktivität des im Zytoplasma vorliegenden Proteins bei den Untersuchungen mit dem pBAD-Vektor nicht überprüft, so dass nicht abschließend beurteilt werden kann, ob eine korrekte Faltung des Proteins stattgefunden hat.

Nachdem durch den zusätzlichen Einsatz des RIL-Plasmids im *E. coli* OrigamiB pQE60 pREP4 eine gute Ausbeute mit hoher Aktivität des rPlyG erreicht werden konnte, wurden für dieses Expressionssystem die weiteren Optimierungsschritte vorgenommen. Das RIL-Plasmid trägt die t-RNA Gene *argU*, *ileY* und *leuW*. Die auf diesen Genen kodierten t-RNAs erkennen die Codons AGA/AAG, CUA und AUA und ermöglichen somit die Translation der Aminosäuren Arginin, Leucin und Isoleucin. Diese Codons werden von *E. coli* selbst selten genutzt, weshalb die entsprechenden t-RNAs im *E. coli* kaum vorhanden sind. Durch die zusätzliche Bereitstellung der t-RNAs und dem reduzierten Milieu im Zytoplasma des *E. coli* OrigamiB wird eine erhöhte Expression und korrekte Faltung des rekombinanten Proteins ermöglicht (siehe 3.1.4 und 4.1.2).

Nach neueren Untersuchungen (SAINATHRAO et al., 2009) wurde inzwischen die Bindungsdomäne des rPlyG genauer identifiziert. Dabei zeigte sich, dass eine bestimmte Sequenz des PlyGs, bestehend aus 10 Aminosäuren (190LKMTADFIQ199), für die spezifische Bindungsaktivität verantwortlich ist. Somit kann diese kurze Sequenz allein zum Nachweis von *B. anthracis* herangezogen werden. Durch die Verwendung von kleineren rekombinanten Proteinen treten auch die Schwierigkeiten bei Expression und Aufreinigung, wie etwa Denaturierung oder fehlerhafter Aufbau in der Tertiärstruktur, seltener auf. Somit kann der Herstellungsprozess weiter vereinfacht und die Kosten verringert werden.

## 5.2 Spezifität und Sensitivität des rPlyG-Lysetest im Vergleich zum $\gamma$ -Phagentest

Für die Überprüfung der Spezifität und Sensitivität wurden *Bacillus* spp.-Isolate der Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim getestet. Diese bestand aus 108 *B. anthracis*- und 200 anderen *Bacillus* spp.-Isolaten. Die Isolate wurden vor allem aus Umweltproben in der Routinediagnostik gewonnen und die Stammsammlung zeigt somit keine gleichmäßige Verteilung der einzelnen Spezies (siehe Tab. 17). Da *B. cereus* ubiquitär im Boden vorkommt, wurden diese Isolate vermehrt nachgewiesen und machen einen Anteil von 66 % der Stammsammlung aus. *B. cereus* ist sehr eng mit *B. anthracis* verwandt und weist in diagnostischen Nachweisverfahren oft ähnliche Eigenschaften auf. Zusätzlich enthält die Stammsammlung einige Typstämme und Isolate aus anderen Stammsammlungen. Diese wurden in die Stammsammlung aufgenommen, da sie bei früheren Untersuchungen mit für das entsprechende Isolat untypischen Reaktionen, wie etwa die Empfindlichkeit gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen, auffielen. So gehören z. B. sechs *B. cereus*-Isolate zur Stammsammlung, die eine Sensibilität gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen aufweisen.

Bezogen auf die in dieser Arbeit getesteten Isolate lag die Spezifität des rPlyG nach Etablierung des vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests bei 80,5 % und war somit geringer als die Spezifität des  $\gamma$ -Phagentests mit 97 %. Es muss dabei erwähnt werden, dass alle 200 zu diesem Zeitpunkt vorhandenen *Bacillus* spp.-Isolate (außer *B. anthracis*) aus der vorhandenen Stammsammlung getestet wurden. Dies bedeutet, dass auch Isolate, die eine Hämolyse auf Schafblutagar hervorrufen, untersucht wurden, obwohl die fehlende Hämolyse eines der wichtigsten diagnostischen Merkmale von *B. anthracis* ist. Eine solche Kolonie würde in der Routinediagnostik nicht als verdächtig gelten und somit nicht in eine weiterführende Milzbranddiagnostik eingehen. Bei 30 der 39 rPlyG-positiven *Bacillus* spp.-Isolate war eine Hämolyse auf Schafblutagar nachweisbar (siehe 4.8). Da der kolorimetrische rPlyG-Lysetest als ein Bestätigungstest in der Milzbranddiagnostik anzusehen ist, sind diese Isolate für die Beurteilung des Tests nicht von Bedeutung. Die effektive Spezifität des vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests lässt sich dadurch auf 95,5 % erhöhen. Die Spezifität des

endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests lag lediglich bei 46,7 %. Jedoch wurden nach diesem Protokoll nur 60 der 200 Isolate untersucht und davon zeigten 39 Isolate bereits in vorangegangenen Tests positive oder fragliche Ergebnisse. Durch die Änderungen im Protokoll des endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests wurden jedoch nur noch 32 statt der 39 Isolate nach vorläufigem Protokoll lysiert. Somit kann insgesamt von einer Steigerung der Spezifität ausgegangen werden. Durch die zusätzliche Beachtung der Hämolyseeigenschaften kann die Spezifität des endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests auf 86,7 % gesteigert werden. Bezieht man die Hämolyseeigenschaft auch in die Berechnung der Spezifität des  $\gamma$ -Phagentest mit ein, so kommt man auf eine Spezifität von 100 %, da alle falsch-positiven Isolate des  $\gamma$ -Phagentests auch eine Hämolyse zeigten.

Die Sensitivität des endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests ist mit 97,2 % (drei falsch-negative Isolate von 108 getesteten *B. anthracis*-Isolaten) mit derjenigen des  $\gamma$ -Phagentests identisch. Dabei ist zu beachten, dass vier der getesteten Isolate nur bei einer Durchführung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests aus einer ü. N.-Kultur zu einem positiven Ergebnis führten, nach regulärem Protokoll aus einer 6 h-Kultur dagegen ein negatives Ergebnis erbrachten. Um die Sensitivität des Tests von 93,5 % auf 97,2 % zu erhöhen, sollten Isolate mit negativem Ergebnis aus einer 6 h-Kultur zusätzlich nach einer Anzucht über Nacht getestet werden (siehe 5.4.3).

Vergleichbare Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität des  $\gamma$ -Phagentests gibt es von unterschiedlichen Arbeitsgruppen. Die publizierten Ergebnisse differieren geringgradig, jedoch zeigen sie mit denjenigen der vorliegenden Arbeit eine weitgehende Übereinstimmung. So untersuchte schon BROWN et al. (1958) die Sensitivität und Spezifität des  $\gamma$ -Phagen und kam dabei auf eine Sensitivität von 100 % bei 122 untersuchten *B. anthracis*-Isolaten. Die Spezifität lag bei 95,7 %, da drei der untersuchten *B. mycooides*-Isolate, jedoch keines der *B. cereus*-Isolate, lysiert wurden. In der Veröffentlichung von BUCK et al. (1963) wurden 63 der 74 untersuchten *B. anthracis*-Isolate lysiert, was einer Sensitivität von 85 % entspricht. Die Spezifität lag bei 64 untersuchten anderen *Bacillus* spp.-Isolaten bei 97 %. Nach dem heutigen Stand der Kenntnisse und durch genetische

Untersuchungen, lässt sich allerdings vermuten, dass einige der von BUCK et al. (1963) untersuchten *B. anthracis*-Isolate heute phylogenetisch zur Gruppe von *B. cereus* zu zählen sind. Somit ist die relativ niedrige Sensitivität nur bedingt mit neueren Daten zu vergleichen. Die Untersuchungen durch ABSHIRE et al. (2005) zeigten eine Sensitivität des  $\gamma$ -Phage von knapp 96 %, da zwei der 51 untersuchten *B. anthracis*-Isolate eine Resistenz gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen aufwiesen. Außerdem wurden 49 andere *Bacillus* spp.-Isolate untersucht, die eine Spezifität von ebenfalls 96 % ergaben. Bei den beiden  $\gamma$ -Phagen-sensitiven Isolaten handelte es sich einerseits um den *B. cereus*-Stamm ATCC4342, der auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, und andererseits um ein *B. mycooides*-Isolat. Bei dem untersuchten *B. mycooides*-Stamm wurde durch nachfolgende Untersuchungen nachgewiesen, dass es sich stattdessen um einen *B. anthracis*-Stamm handelt, der beide Plasmide verloren hat.

Eine vergleichende Untersuchung zur Sensitivität und Spezifität des rPlyG durch SCHUCH et al. (2002) ergab eine Sensitivität von 100 %. Die Spezifität war mit 85 % gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen mit 92,3 % geringgradig reduziert, denn außer dem *B. cereus*-Stamm ATCC4342, der sowohl vom  $\gamma$ -Phagen als auch vom rPlyG lysiert wurde, zeigte noch ein weiteres *B. cereus*-Isolat eine schwache Lyse durch die Wirkung des rPlyG. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass in dieser Veröffentlichung insgesamt nur 14 *B. anthracis*- und 13 andere *Bacillus* spp.-Isolate getestet wurden. Somit ist der Vergleich zu der in der vorliegenden Arbeit ermittelten, deutlich besseren Spezifität des rPlyG von 96 % und einer vergleichbaren Sensitivität von 97,2 % bei einer deutlich größeren Anzahl an Isolaten nur begrenzt möglich.

*B. anthracis*-Stämme, die resistent gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen sind, wurden schon früher beschrieben (BUCK et al., 1963). Dabei stellte sich heraus, dass diese Stämme auch gleichzeitig in anderen Diagnostiktests, wie etwa dem Perlschnurtest, nicht die für *B. anthracis* charakteristischen Ergebnisse zeigten. In einer weiteren Veröffentlichung (MARSTON et al., 2006) wurde beschrieben, dass 23 von 600 untersuchten Stämmen nicht eindeutig als *B. anthracis* zu identifizieren waren. Dabei zeigten sich sechs Stämme resistent gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen, während PCR-Untersuchungen einen eindeutigen Nachweis von

*B. anthracis* erbrachten. Im Gegensatz dazu wiesen 17 Stämme eine Sensitivität gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen auf, wurden aber mittels PCR-Untersuchungen negativ auf *B. anthracis* getestet. Als Ursache der Phagenresistenz kann entweder das Unvermögen des  $\gamma$ -Phagen an die Zelle zu binden oder die fehlende lytische Wirkung des Lysins angesehen werden (ABSHIRE et al., 2005). Darüber hinaus wird auch immer wieder ein Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen und dem Vorhandensein eines oder beider Virulenzplasmide diskutiert. Dabei scheinen Stämme, denen das pXO1 Plasmid fehlt, empfindlicher gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen zu sein als Stämme, die beide Plasmide besitzen. Der Grund dafür ist vermutlich, dass Stämme mit dem Plasmid pXO1 leichter sporulieren und somit eher unangreifbar für den  $\gamma$ -Phagen werden. Dies kann auch als ein Grund für die Unwirksamkeit des rPlyG angenommen werden. Ein weiterer Grund für eine fehlende oder eingeschränkte Wirksamkeit kann die Bindung des rPlyG an abgestorbene Zellreste sein. Je älter eine Bakterienkultur, desto mehr Sporen, abgestorbene Zellen und Zellwandreste liegen in der Kultur vor, somit ist dann weniger rPlyG für die Lyse lebender Bakterienzellen verfügbar. Alle sieben *B. anthracis*-Isolate (A33, A34, A68, A84, A127, A135 und A136), die im Rahmen den vorliegenden Untersuchungen keine oder erst nach Anzucht über Nacht eine Lyse durch rPlyG zeigten, besitzen jedoch beide Virulenzplasmide. Somit konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen vorhandenen Plasmiden und rPlyG-Empfindlichkeit aufgezeigt werden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich folgern, dass die Sensitivität des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests mit 97,2 % besser ist, als die von ABSHIRE et al. (2005) ermittelte Sensitivität des  $\gamma$ -Phagentests von 96 %. Die Spezifität des vorläufigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests ist mit 95,5 % etwa identisch mit den 96 % des  $\gamma$ -Phagentests. Auch der Vergleich mit den übrigen Veröffentlichungen zeigt weitgehende Übereinstimmung.

### **5.3 Vergleiche in der Anwendung von $\gamma$ -Phage und rPlyG**

Seit Verwendung des  $\gamma$ -Phagens wurde mehrfach von Schwierigkeiten bei der Anwendung berichtet. Dazu gehören das Kultivieren und Titrieren der

Phagensuspension, die nicht vollständig zu standardisieren sind, und die Stabilität der Suspension, die immer wieder mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht wurde. Nachstehend sollen Vor- und Nachteile des rPlyG gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen aufgezeigt werden.

Nach neueren Erkenntnissen verringert die Phagensuspension innerhalb von ein bis drei Jahren Lagerung bei 4 °C ihre PFU um beinahe eine Zehnerpotenz (ABSHIRE et al., 2005), während das rPlyG bei lyophilisierter Lagerung innerhalb von acht Monaten keinen Aktivitätsverlust zeigte (siehe 5.8). Auch tiefgefroren konnte bei Lagerung in HEPES-Puffer nach neun Monaten kein Aktivitätsverlust beobachtet werden. In früheren Arbeiten (BUCK et al., 1963; COWLES, 1931) wurde publiziert, dass es nötig ist, den  $\gamma$ -Phagen für jeden Versuch neu zu kultivieren und zu titrieren. Die damaligen Untersuchungen zeigten, dass der Titer schon nach kurzer Zeit im Kühlschrank absinkt und der  $\gamma$ -Phage durch Einfrieren und Auftauen sogar vollständig zerstört wird. Die mangelnde Stabilität führten BUCK et al. (1963) auf die fehlende Scheide am Schwanz des  $\gamma$ -Phagen zurück, der dadurch nicht gegen äußere Einflüsse geschützt ist. Diese Begründung scheint aber nicht die eigentliche Ursache zu sein, da die Phagensuspensionen heutzutage eine deutlich größere Stabilität zeigen. Auch die für diese Arbeit eingesetzten Phagensuspensionen wurden über mehrere Monate bei 4 °C gelagert, wobei in der Routinearbeit keine Abnahme der Aktivität festgestellt werden konnte. Vermutlich spielt die Einhaltung von sterilen Bedingungen bei Kultivierung und Lagerung eine entscheidende Rolle für die Stabilität. Heutzutage sind Nährmedien und Umgebungsbedingungen stabiler und steriles Arbeiten ist einfacher umzusetzen als zu jener Zeit. Somit ist bei aktuellen Arbeiten eine Titration vor jeder Durchführung des  $\gamma$ -Phagentests nicht mehr notwendig, was den Arbeitsaufwand in einem Routinelabor im Vergleich zu früher deutlich senkt. Allerdings wird auch in aktuellen Veröffentlichungen noch eine eingeschränkte Stabilität und die damit verbundene begrenzte Lagerfähigkeit beschrieben (POWLEDGE, 2004; STONE, 2002). Es gibt mehrere Möglichkeiten, die beim Einsatz einer Phagensuspension zu Problemen führen können. Zum einen besteht die Gefahr, dass bei einer bakteriellen Verunreinigung Proteasen produziert werden, die die Phagen schädigen. Zum anderen kann durch eine Kontamination die Phagenkultivierung beeinträchtigt werden, indem das entsprechende

Bakterienwachstum gehemmt wird. Außerdem kann es bei der Kultivierung zu Mutationen der Bakterienzellen kommen, die den Phagenrezeptor verändern, so dass der  $\gamma$ -Phage nicht mehr an die Zelle binden kann. Phagen sind lebende Organismen und es kann während der Phagenvermehrung zu Mutationen kommen, die dessen Spezifität und Sensitivität beeinflussen (BUCK et al., 1963). Diese Risiken können bei einem Protein wie dem rPlyG vollständig ausgeschlossen werden.

Die aufwändige Kultivierung und Erhaltung der Phagensuspension setzt ein gut ausgestattetes Labor und gut ausgebildete Mitarbeiter voraus. Dies ist für einfach ausgestattete Labore und Labore, die keine Routinediagnostik von Milzbrand betreiben, oft nicht umsetzbar. Das rPlyG kann dagegen kommerziell in großen Mengen hergestellt und einfach gelagert werden. So können auch Labore, die nur selten Diagnostiktests zum Nachweis von *B. anthracis* durchführen, für diesen Test ausgestattet sein.

Die Phagenkonzentration ist wie die eingesetzte Bakterienmenge, also die Dichte des Bakterienrasens und die Inkubationszeit von großer Bedeutung für die sichere Auswertung des  $\gamma$ -Phagentests. Hierüber sind sich Autoren älterer und neuerer Publikationen einig (ABSHIRE et al., 2005, McCLOY, 1951a). Die genaue Einhaltung der Phagenkonzentration muss dabei über aufwändiges Titrieren kontrolliert werden. Im Gegensatz dazu ist es möglich die Menge an rPlyG genau zu definieren. Die Definition des rPlyG wurde in dieser Arbeit für die Wirkeinheit von 0,1  $\mu\text{g}$  vorgenommen und wie unter Abschnitt 4.12 beschrieben festgelegt. Somit ist es möglich, die eingesetzte rPlyG-Konzentration für den kolorimetrischen rPlyG-Lysetest genau zu definieren und den Test zu standardisieren. In der Veröffentlichung von SCHUCH et al. (2002) wurde die Einheit für eine Unit rPlyG als 1  $\mu\text{g}$  definiert und die eingesetzten Konzentrationen waren entsprechend größer, als in der vorliegenden Arbeit. Um die Messungen nicht an ein Sicherheitslabor binden zu müssen, wurde für die Einheitendefinition, wie auch in der Literatur (SCHUCH et al., 2002) bereits beschriebenen, kein *B. anthracis*-Stamm, sondern der Referenzstamm *B. cereus* ATCC4342 angewendet. Die Inkubationszeit des BCA-Reagenz kann für den kolorimetrischen rPlyG-Lysetest ebenfalls definiert werden, wogegen die eingesetzte Bakterienmenge beim



Abnehmen einer Kolonie nicht genau definiert werden kann. Die Auswertung wird jedoch über die Differenz der OD-Werte mit bzw. ohne rPlyG vorgenommen und somit ist die eingesetzte Bakterienmenge nur von untergeordneter Bedeutung.

Ein weiterer bedeutender Vorteil des rPlyG im Vergleich zum  $\gamma$ -Phagen ist der eher unwahrscheinliche Fall der Resistenzbildung von *B. anthracis* gegenüber rPlyG. SCHUCH et al. (2002) wiesen nach, dass der *B. cereus*-Stamm ATCC4342 eine spontane Resistenz gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen ausbilden kann. Die Untersuchungen zeigten dabei aber auch, dass diese Bakterienkultur weiterhin sensitiv für das rPlyG war. Dies liegt vermutlich an der hohen Bindungsaffinität des rPlyG zu lebensnotwendigen Kohlenhydratverbindungen der Bakterienzellwand, wodurch die Möglichkeit einer Resistenzentwicklung für das rPlyG nahezu ausgeschlossen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass rPlyG eine lytische Wirkung auf bekapselte Zellen von *B. anthracis* besitzt, die für den  $\gamma$ -Phagen nicht nachgewiesen werden konnte (siehe 5.6).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass durch den weniger aufwändigen Umgang, die genaue Einheitendefinition, die unkomplizierte Lagermöglichkeit von lyophilisiertem rPlyG und die höhere Stabilität im Vergleich zum  $\gamma$ -Phagen die Anwendung des rPlyG auch in einfach ausgestatteten Laboren problemlos möglich ist.

#### **5.4 Entwicklung eines Diagnostiktests**

Anforderungen an den zu entwickelnden Test waren eine unkomplizierte Durchführung ohne aufwändigen Geräteinsatz, so dass der Test auch unter einfachen Laborverhältnissen durchzuführen ist. Zusätzlich sollte der Test problemlos abzuarbeiten und zuverlässig auszuwerten sein, so dass keine umfangreiche Erfahrung des Laborpersonals benötigt wird. Da es sich um einen Bestätigungstest für verdächtige Kolonien handelt, sollte der Sensitivität die größte Bedeutung zukommen. Mit der Erhöhung der Sensitivität eines Diagnostiktests geht allerdings in der Regel eine Verminderung der Spezifität einher. Dies

bedeutet, dass ein falsch-positives Ergebnis in Kauf genommen werden muss, um keine falsch-negativen Ergebnisse zu riskieren. Allerdings spielen auch Unempfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Genauigkeit an wechselnden Tagen und bei wechselnden Personen eine wichtige Rolle für Diagnostiktests. Auch die Testdauer und die entstehenden Arbeitskosten sollten Beachtung finden.

#### **5.4.1 Erste Versuche mit rPlyG als diagnostisches Nachweisreagenz für *B. anthracis***

Erste Versuche im Rahmen dieser Arbeit zum Nachweis von *B. anthracis* durch PlyG orientierten sich an den Untersuchungen von SCHUCH et al. (2002). In dieser Veröffentlichung wird der Nachweis einer Bakterienlyse durch rPlyG in Flüssigkultur mit Hilfe einer einfachen OD-Messung bei  $\lambda=600$  nm beschrieben. Dazu wurde eine Bakterienkultur von *B. cereus* ATCC4342 mit 20  $\mu\text{g/ml}$  rPlyG bzw. mit Puffer versetzt und nach Inkubation für 15 min bei 37 °C bei beiden Ansätzen die  $\text{OD}_{600}$  ermittelt. Dabei beschrieb die Arbeitsgruppe eine Reduktion der  $\text{OD}_{600}$  durch den Zusatz von rPlyG, die nach Auszählung der Zellzahl einer Reduktion um mehr als  $10^7$  entspricht und somit eine nahezu vollständige Lyse aller Bakterien widerspiegelte. Auf der Grundlage dieser Methode wurde der in dieser Arbeit verwendete turbidimetrische rPlyG-Lysetest entwickelt (siehe 3.6.1). In der vorliegenden Arbeit konnte zwar ebenfalls eine deutliche Lyse nachgewiesen werden, allerdings wurde die maximale  $\text{OD}_{600}$ -Reduktion meist erst nach etwa 10 min erreicht.

In der Veröffentlichung von SCHUCH et al. (2002) wurde ein weiterer Versuch zum Nachweis der Reduktion der Bakterienzellzahl durch rPlyG durch das Auszählen von Kolonien beschrieben. Dabei wurde die Reduktion der Zellzahl einer Kultur von *B. cereus* ATCC4342 nachgewiesen, die mit 2  $\mu\text{g/ml}$  rPlyG nach 2 min fast vollständig lysiert wurde. Die Bestimmung der Zellzahl nach Durchführung des turbidimetrischen rPlyG-Lysetests wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls überprüft. Dabei stellte sich allerdings heraus, dass bei wiederholten Lyseversuchen mit dem Stamm *B. cereus* ATCC4342 das Auszählen der Kolonien zu unterschiedlichen Ergebnissen führte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die ermittelte OD nicht zuverlässig mit der eigentlichen

Zellzahl korreliert (siehe 4.2.1). Als Grund dafür ist anzusehen, dass die Bazillen *in vitro* zur Kettenbildung neigen und davon ausgegangen werden muss, dass bei zunehmender Bakteriendichte ein Auszählen der Keime nach Ausstreichen der Bakteriensuspension nicht mehr repräsentativ ist, da auch die Länge der Ketten zunimmt. SCHUCH et al. (2002) beschreiben außerdem, dass die Abnahme der OD einige Minuten verzögert gegenüber dem Zelltod stattfindet, was ebenfalls die Bestimmung der Keimzahl beeinflussen kann. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen vermuten die Autoren die Ursache für die verzögerte Abnahme darin, dass rPlyG nicht direkt zum Zellwandabbau führt, sondern die Zellen zunächst eine Formveränderung aufweisen, bevor es zur endgültigen Lyse der Zellen kommt. Des Weiteren können laut der Veröffentlichung sogenannte Ghost-Zellen zurückbleiben, die zusätzlich die Messung der Lichtstreuung beeinflussen können. Durch die Ermittlung dieser Ergebnisse zeigte sich, dass allein auf der Grundlage der Messung der OD-Abnahme einer Bakteriensuspension kein zuverlässiger Diagnostiktest entwickelt werden konnte.

Trotz dieser Erkenntnisse wurden zunächst mit Hilfe dieses einfach durchzuführenden rPlyG-Lysetests die optimalen Bedingungen, wie z. B. Reaktionsmedium, pH-Wert und Temperatur, für Versuche mit rPlyG ausgetestet. Zusätzlich wurde überprüft, in welcher Wachstumsphase der Bakterien, welcher Bakteriendichte und welcher rPlyG-Konzentration die besten Ergebnisse zu erzielen sind. Im Bezug auf die Reaktionsmedien (siehe Abb. 12) zeigte sich deutlich, dass die Wirkung des rPlyG durch Std.-I-Bouillon gehemmt wird. Deshalb musste ein Waschschrift der Bakterienkultur in das Protokoll eingeführt werden, wodurch die Bakterien in PBS überführt wurden, welches keine hemmende Wirkung auf rPlyG zeigte. Ein Grund für die hemmende Wirkung in Std.-I-Bouillon ist vermutlich auf den Inhaltsstoff Pepton zurückzuführen. Pepton besteht aus einem Gemisch von Peptiden und Aminosäuren, die durch Hydrolyse aus pflanzlichen oder tierischen Proteinen hergestellt wurden. Eventuell sind noch Rückstände im Pepton vorhanden, die auch zur Hydrolyse von rPlyG führen und somit dessen Wirkung beeinträchtigen. Die Ermittlung der optimalen Wachstumsphase war für die Entwicklung des Tests von großer Bedeutung. Es musste eine Phase erreicht werden, in der sich eine Reduktion der Zellzahl auch deutlich in der OD widerspiegelte (siehe Abb. 16). Dies war nach nur 3 h noch

nicht möglich. Dagegen war bei der Anwendung einer ü. N.-Kultur davon auszugehen, dass sich die Bakterien bereits in der stationären Phase befinden und dadurch schon einige Bakterien abgestorben sind und als Zelltrümmer die OD-Messung beeinflussen. Zudem besteht die Gefahr, dass einige Zellen schon zu sporulieren beginnen, was sie für rPlyG unangreifbar macht. Zusätzlich wäre bei einer größeren Zellzahl auch der Einsatz einer größeren Menge an rPlyG nötig gewesen. Somit war es gleichzeitig nötig, die eingesetzte Konzentration von rPlyG und die Ausgangsdichte der Bakterienkultur aufeinander abzustimmen. Die besten Ergebnisse ließen sich bei einer Ausgangs-OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 und einer eingesetzten Konzentration von 8 µg/ml rPlyG erzielen.

#### **5.4.2 Methoden zum indirekten Nachweis der Lyse durch rPlyG**

Im Rahmen einer durch die Autorin mitbetreuten Diplomarbeit (LANG, 2006) wurden parallel zu dieser Arbeit weitere Untersuchungen zum Nachweis von Zellinhaltsstoffen durchgeführt, die durch die Lyse mit rPlyG freigesetzt werden. Diesen Untersuchungen wurden neben dem Nachweis von Proteinen auch biochemische Nachweise zu Grunde gelegt, wie sie auch in kommerziellen APIs<sup>®</sup> angewandt werden. Dazu gehörten die direkten Nachweise von alkalischer Phosphatase mittel kommerzieller Nachweisreagenzien oder von Acetoin mittels Voges-Proskauer-Reaktion. Außerdem wurde der indirekte Nachweis von Enzymen getestet, die Glucose bzw. N-Acetyl-Glucosamin abbauen. Die daraus resultierende pH-Wert-Änderung konnte mittels Phenolrot nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde versucht, die durch Lyse frei werdende DNA mittels Ethidiumbromid nachzuweisen. Insgesamt lieferte jedoch neben dem in dieser Arbeit untersuchten Proteinnachweis nur der DNA-Nachweis zufriedenstellende Ergebnisse. Für den Nachweis von DNA waren jedoch ein UV-Licht-Kasten und die Anwendung des gesundheitsschädlichen Ethidiumbromids notwendig. Als Alternative zu Ethidiumbromid stehen inzwischen zwar Alternativen wie etwa SYBR Green zur Verfügung, jedoch ist deren Toxizität und Mutagenität noch nicht vollständig geklärt und deren Anwendung teuer. Somit konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen zur Entwicklung eines Diagnostiktests allein auf den Nachweis von frei werdenden Proteinen.

### 5.4.3 Entwicklung des endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests

Für die Entwicklung des endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests wurde das durch Lyse frei gewordene intrazelluläre Protein mit Hilfe des BCA-Reagenz nachgewiesen. Der quantitative Nachweis basiert auf einem Farbumschlag, der zum Teil schon mit dem bloßen Auge auswertbar oder bei einer Wellenlänge von 540 nm zu messen ist. Die Reaktion (SMITH et al., 1985) beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ - zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen durch Proteine. Die Kupferionen bilden dann mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen Komplex, der ein definiertes Absorptionsmaximum aufweist. Die Absorption des Komplexes ist linear zur Konzentration des vorhandenen Proteins. So lässt sich durch das gleichzeitige Erstellen einer Eichgeraden mit der Hilfe von Standardlösungen aus BSA der Proteingehalt genau bestimmen. Für den rPlyG-Lysetest spielte jedoch nur die relative Menge an freigesetzten Proteinen eine Rolle. Diese Menge wird als Differenz aus den OD-Werten der Bakterienkultur mit rPlyG bzw. mit Puffer ermittelt. Durch die Testung einer Vielzahl von *B. anthracis*- und anderen *Bacillus* spp.-Isolaten ließ sich ein Grenzwert für diese  $\text{OD}_{540}$ -Differenz ermitteln, der abschließend auf 0,07 festgelegt wurde. Dieser kolorimetrische Nachweis zeigte eine deutlich höhere Spezifität und Sensitivität als die Messung der OD-Abnahme der Bakterienkultur mittels turbidimetrischen rPlyG-Lysetest.

Vorversuche mit den Referenzstämmen *B. anthracis* A58 und *B. cereus* ATCC4342 führten jeweils zu einer deutlichen  $\text{OD}_{540}$ -Abnahme im Vergleich zur Negativkontrolle *B. cereus* B181 und so war es zunächst einfach, die entsprechenden Parameter des Tests zu optimieren. Mit der Testung der *Bacillus* spp.-Isolate (nicht *B. anthracis*) zeigten sich jedoch einige Abweichungen in den Ergebnissen. Die Auswertung einiger Isolate ergaben eine deutlich höhere  $\text{OD}_{540}$ -Abnahme als die bisher ermittelten Werte der Negativkontrolle *B. cereus* B181 (siehe Abb. 33). Diese Werte mussten bei der Ermittlung des Grenzwertes zusätzlich beachtet werden und die eindeutige Abgrenzung zwischen positiven und negativen Ergebniswerten wurde dadurch deutlich schwieriger.

Weitere Probleme zeigten sich anschließend bei der Testung der *B. anthracis*-Isolate der Stammsammlung. Zunächst mussten die einzelnen Schritte des Tests an die Bedingungen eines Sicherheitslabors angepasst werden und eine

eventuelle Infektionsgefahr so gering wie möglich gehalten werden. Um eine Aerosolbildung zu verhindern wurde deshalb die Mikrotiterplatte mit einer Polypropylenfolie abgeklebt. Des Weiteren wurde das einzusetzende Volumen der Bakteriensuspension so weit wie möglich reduziert, um nur mit geringen Mengen an infektiösem Material arbeiten zu müssen. Einige der *B. anthracis*-Isolate zeigten deutlich geringere Ergebniswerte ( $OD_{540}$ -Differenzen), als die zunächst getesteten Referenzstämme *B. anthracis* A58 und *B. cereus* ATCC4342, was die Validierung des Grenzwertes erschwerte. Durch weitere Veränderungen im Protokoll des Tests, wie dem Zusatz von 300.000 U/l Lysozym zum Agar, einem zusätzlichen Waschschrift und einer verlängerten Inkubationszeit, konnten schließlich 101 der 108 *B. anthracis*-Isolate mit eindeutigen Ergebniswerten getestet werden. Durch den Zusatz von Lysozym sollte die Kettenbildung unterdrückt werden und somit erreicht werden, dass die Bakterien größtenteils als Einzelkolonien vorliegen und somit besser angreifbar für rPlyG sind. Lysozym wird als Agarzusatz in der Diagnostik von *B. anthracis* eingesetzt, da es die Zellwände von Gram-negativen Bakterien spaltet und somit deren Wachstum unterdrückt. Für *B. anthracis* lässt sich dagegen mikroskopisch nachweisen, dass es dessen Kettenbildung hemmt. Zum Nachweis der Lysozymwirkung wurden vergleichende Untersuchungen im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest mit den *B. anthracis*-Isolaten A93 und A110 durchgeführt, die bei Anzucht ohne Lysozym im vorläufigen rPlyG-Lysetest nur eine schwache  $OD_{540}$ -Abnahme zeigten. Dabei konnte bei diesen Isolaten und dem Stamm A58 eine zusätzliche Steigerung der Ergebniswerte erreicht werden (siehe Abb. 24). Dies spricht dafür, dass die Bakterienzellen durch die verminderte Kettenbildung für das rPlyG besser angreifbar sind. Der Waschschrift, der für die Testetablierung ebenfalls eingeführt wurde, sollte sicherstellen, dass keine Mediumreste im Testansatz zurückbleiben. Wie in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt (siehe Abb. 12), hemmt die Anwendung z. B. von Std.-I-Bouillon die rPlyG-Wirkung. Auch durch diese Optimierung konnte eine Steigerung der Ergebniswerte erreicht werden (Abb. 25). Durch die Einführung des zusätzlichen Waschschrifts waren alle Ausgangs- $OD_{540}$ -Werte niedriger als ohne Waschschrift. Somit kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur Mediumreste sondern eventuell auch unspezifisches, zuvor sekretiertes Protein entfernt wird. Dadurch steigt die Sicherheit, dass nur Protein nachgewiesen wird, welches durch die spezifische Wirkung von rPlyG freigesetzt

wurde. Die letzten Veränderungen, die für die Etablierung des Protokolls vorgenommen wurde betrafen die Inkubationstemperatur und die Inkubationszeit. Die Verlängerung der Inkubationszeit bewirkte, dass auch bei weniger sensitiven Isolaten eine Lyse nachweisbar wurde und sie hatte zusätzlich Einfluss auf die Validierung des Grenzwertes. Dies führte dazu, dass die OD<sub>540</sub>-Differenzen bei allen Testansätzen größer wurden und somit auch die negativ getesteten Isolate höhere Ergebniswerte lieferten. Aus diesem Grund musste der Grenzwert neu ermittelt werden und wurde von 0,05 im vorläufigen Protokoll auf 0,07 im endgültigen Protokoll des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests erhöht (siehe Abb. 35 und Abb. 29).

Bei der Auswertung der Testergebnisse wird deutlich, dass die einzelnen Isolate variierende Ergebniswerte aufweisen. Diese sind darauf zurück zu führen, dass unterschiedliche Proteinmengen freigesetzt werden. Ursachen dafür können zum Einen die unterschiedliche Sensitivität der Isolate, wie sie auch gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen bekannt ist, und zum Anderen die ausgeprägte Tendenz zur Kettenbildung in vitro sein. Durch die Kettenbildung werden die Oberflächen der Bakterienzellen und somit die Bindungsstellen für das rPlyG schlechter zugänglich. Auch durch den Zusatz des Lysozyms im Agar kann die Kettenbildung vermutlich nicht vollständig verhindert werden. Als weitere Ursache für die variierenden Ergebniswerte kann auch eine sehr frühe Sporenbildung einiger Isolate in Frage kommen. Eine geringe Teilungsrate ist vermutlich dafür verantwortlich, dass bei den *B. anthracis*-Isolaten A33, A34, A68 und A84 erst nach Anzucht über Nacht eine deutliche Lyse im kolorimetrischen Test nachzuweisen war.

## **5.5 Anwendung des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests in der Routinediagnostik**

Klassische bakterielle Nachweismethoden, wie z. B. der Ascoli-Test oder der Perlschnurtest, sind inzwischen veraltet. Allerdings sind kaum alternative kommerzielle Tests verfügbar und molekularbiologische Untersuchungen sind oft mit teurer Ausstattung verbunden und aufwändig. Da der Nachweis von *B. anthracis* häufig mit Schwierigkeiten verbunden ist, zeigen neueste

Empfehlungen für die Diagnostik von Milzbrand (Abb. 2), wie wichtig es ist, verschiedene Methoden für den Nachweis von *B. anthracis* zur Verfügung zu haben. Darüber hinaus spielt ein einfacher, kostengünstiger aber auch sicherer Test eine bedeutende Rolle für die Diagnostik in einfach ausgestatteten Laboren. So sollte die Durchführung des Tests auch unter Feldbedingungen möglich sein, um eventuell in den ärmeren Ländern Afrikas und Asiens Anwendung zu finden. Nachfolgend sollen einige der vorhandenen Diagnostiktests im Bezug auf ihre aktuelle Anwendung beschrieben werden.

In der Routinediagnostik von Milzbrand steht der kulturelle Nachweis von *B. anthracis* mit der Überprüfung der Hämolyse und der Beurteilung der Koloniemorphologie an erster Stelle. Verdächtige Kolonien werden dann über Bestätigungsuntersuchungen, wie z. B.  $\gamma$ -Phagentest und mikroskopische Beurteilung, weiter überprüft. In die Kategorie der Bestätigungsuntersuchungen ist auch der kolorimetrische rPlyG-Lysetest einzuordnen. Die Bestätigungsdiagnostik mittels PCR gilt heute als Standardmethode, kann aber wegen der relativ hohen Kosten und der Geräteanforderung nicht in jedem Labor durchgeführt werden. Hierbei ist sowohl der Nachweis der beiden Virulenzplasmide, als auch der chromosomalen DNA entscheidend. Da die Testung an Versuchstieren immer an letzter Stelle der Diagnostik stehen sollte, ist es besonders wichtig, mehrere Diagnostiktests für unterschiedliche Eigenschaften des Bakteriums zur Verfügung zu haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die große Anzahl erfolgreich getesteter Isolate belegt werden, dass der neu entwickelte vorläufige kolorimetrische rPlyG-Lysetest in der Routinediagnostik Anwendung finden kann. Mit einer Spezifität von 80,5 % und einer Sensitivität von 97,2 % erfüllt der Test die geltenden Vorgaben für einen Diagnostiktest, die laut OIE (2009) mindestens 75 % Spezifität und 75 % Sensitivität voraussetzen. Diese Kriterien wurden mit dem neu entwickelten kolorimetrischen rPlyG-Lysetest eindeutig erfüllt. Zudem konnten die zu Grunde gelegten Anforderungen, wie eine einfache Durchführung und Auswertung, erfüllt werden. Auch die Standardisierung des Tests wurde mit der Definition einer Wirkeinheit für das rPlyG und die genaue Vorgabe der Inkubationszeit des BCA-Reagenz erreicht. Durch die geringe Testdauer von maximal einem Tag und dem



geringen Kosteneinsatz konnten somit alle geforderten Zielstellungen erfüllt werden.

Kritisch betrachtet werden kann bei dem neu entwickelten Diagnostiktest, dass für die Durchführung eine Bakteriensuspension hergestellt werden muss. Dies erhöht die Gefahr einer Aerosolbildung und einer eventuellen Infektion. Um diese Gefahr so gering wie möglich zu halten, ist es notwendig, den Test unter einer Sicherheitswerkbank abzuarbeiten und die Messung im Photometer erst nach Abkleben der Mikrotiterplatte durchzuführen. Außerdem kann die Menge der eingesetzten Bakterien wie auch beim  $\gamma$ -Phagentest nicht genau bestimmt werden. Dies scheint jedoch auf Grund der gewonnenen Erfahrungen keinen Einfluss auf das Testergebnis zu nehmen, da sich die Bakterienmenge nur relativ auf die zu ermittelnde OD<sub>540</sub>-Differenz auswirkt.

## 5.6 Wirkung des rPlyG auf bekapselte Bakterienzellen

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass das rPlyG bekapselte Bazillen *in vitro* lysieren kann, während der  $\gamma$ -Phage dies nicht kann. In einem entsprechenden Versuch (siehe 4.9) wurden die *B. anthracis*-Isolate A93 und A58 und der *B. cereus*-Stamm B181 getestet. Von diesen Isolaten besitzt nur A93 die Fähigkeit, eine Kapsel zu bilden. Die Kapselbildung wurde durch die Anzucht in FKS mit NaHCO<sub>3</sub>-Zusatz und bei Bebrütung in 20 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre induziert und mittels Tuschkontrastierung überprüft. Nach Durchführung des endgültigen kolorimetrischen rPlyG-Lysetests zeigte sich eine OD<sub>540nm</sub>-Abnahme bei den Stämmen A93 und A58 beider Ansätze (siehe Abb. 38). Jedoch fiel auf, dass die OD<sub>540nm</sub>-Differenzen bei den Kulturen mit NaHCO<sub>3</sub>-Zusatz deutlich geringer ausfielen als ohne Zusatz. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Lyseaktivität des rPlyG durch den Zusatz von NaHCO<sub>3</sub> gehemmt wird, so wie es in dieser Arbeit bereits bei verschiedenen Medien nachweisbar war. Des Weiteren ist es möglich, dass NaHCO<sub>3</sub> hemmend auf das Bakterienwachstum wirkt und dadurch bereits die Ausgangs-OD der Kulturen mit NaHCO<sub>3</sub>-Zusatz geringer war als ohne. Dadurch standen weniger Zellen für die Lyse zur Verfügung und weniger Protein konnte freigesetzt werden. Die Ausgangs-OD wurde jedoch zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung nicht ermittelt. Eine Hemmung der

Lysewirkung durch die Kapsel selbst kann ausgeschlossen werden, da sowohl das unbekapselte Isolat A53 als auch das bekapselte Isolat A93 bei Anzucht mit  $\text{NaHCO}_3$  eine geringere  $\text{OD}_{540\text{nm}}$ -Differenz als ohne Zusatz aufwiesen. Die lytische Wirkung des rPlyG auf bekapselte Zellen wurde auch bereits in der Veröffentlichungen von SCHUCH et al. (2002) beschrieben.

Eine lytische Wirkung des  $\gamma$ -Phagen auf bekapselte Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, obwohl dies in einer früheren Veröffentlichung (BROWN und CHERRY, 1955) beschrieben wurde. Eine Erklärung für die Phagenresistenz bekapselter Zellen wäre, dass das rPlyG klein genug ist, um in die Kapsel einzudringen und an seinem Rezeptor anzugreifen, der  $\gamma$ -Phage jedoch nicht. Dies würde bedeuten, dass die Kapsel von *B. anthracis* eine wichtige Schutzfunktion gegenüber dem  $\gamma$ -Phagen darstellt.

## 5.7 Wirkung des rPlyG auf Sporen

Eine Wirkung des rPlyG auf Sporen konnte in unseren Versuchen erst nach 60 min Germination unter Zugabe von L-Alanin und Inosin nachgewiesen werden. In weiteren Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe konnte durch HARTMANN (pers. Mttl., 2007) ein physiologisches Stadium, in dem die Bakterien für eine Lyse voll empfänglich waren, erst nach 90 min in vitro Germination nachgewiesen werden. Dagegen beschrieben SCHUCH et al. (2002) eine Wirkung des rPlyG auf Sporen schon nach 5 min Germination unter Zugabe von L-Alanin. Die spezifische Bindungsstelle des rPlyG besteht aus Peptidoglykanverbindungen der Zellwand, die bei Bakterien, die als Sporen vorliegen, nicht zugänglich sind. Um die Germination auszulösen, sind verschiedene Voraussetzungen notwendig. Dazu gehört das Vorhandensein von Germinanten, also spezifischen Nährstoffen, wie Aminosäuren, Kohlenhydrate und Nukleoside. Die Germinanten binden an Rezeptoren der Membran und induzieren die Aufnahme von Wasser und die Vergrößerung des Sporenkerns. Des Weiteren werden der Cortex und der Mantel der Spore abgebaut und die Zelle nimmt ihre Stoffwechselaktivität wieder auf (DRIKS, 2009). Die Kernwand der Spore ist eine Peptidoglykanschicht, die als Grundlage für die Ausbildung der Zellwand der vegetativen Zelle dient. Man muss somit davon ausgehen, dass zunächst der Abbau der äußeren Sporenhüllen und

der Aufbau der Zellwand der vegetativen Zelle stattfinden müssen, bevor das rPlyG seine spezifische Bindungsstelle erreichen kann. Die erfolgreiche Germination von *B. anthracis*-Sporen durch die kombinierte Zugabe von L-Alanin und Inosin ist vielseitig untersucht. In einer Veröffentlichung von DODATKO et al. (2009) wird beschrieben, dass Sporen von *B. anthracis* zwingend beide Germinanten für eine vollständige Germination in vitro benötigen. SCHUCH et al. (2002) beschreiben in ihrer Methode dagegen lediglich den Zusatz von L-Alanin für eine erfolgreiche Germination. Trotz Versuchen mit unterschiedlicher Bakteriendichte und verschiedenen Konzentrationen von L-Alanin und / oder Inosin, sowie unterschiedlichen rPlyG-Konzentrationen konnten die Ergebnisse von SCHUCH et al. (2002) in unserer Arbeitsgruppe nicht reproduziert werden (HARTMANN, pers. Mttl., 2007). Wären Sporen durch rPlyG angreifbar, wäre dies ein großer Vorteil für die Anwendung in der DNA-Präparation, denn es wären nicht nur vegetative Zellen sondern auch Sporen direkt in Bodenproben nachweisbar, ohne vorher deren Germination zu induzieren.

## 5.8 Lagerfähigkeit

Wie gezeigt werden konnte, ist die Lagerung von rPlyG nach Lyophilisation über einen Zeitraum von acht Monaten ohne Aktivitätsverlust möglich. Es ist davon auszugehen, dass bei korrekter Lagerung des Lyophilisats auch eine längerfristige Haltbarkeit besteht. Ein weiterer Vorteil ist die Lagerung des Lyophilisats bei 4 °C, denn dadurch können Schädigungen durch den Gefrier-Tau-Vorgang verhindert werden und es ist kein Gefriergerät für die Lagerung notwendig. Allerdings muss nach einmaligem Auflösen des Lyophilisats die nicht verbrauchte Menge möglichst portioniert tiefgefroren werden oder innerhalb kurzer Zeit verbraucht werden. Eine Lagerung in HEPES-Puffer mit und ohne BSA bei -80 °C hat ebenfalls gezeigt, dass nach neun Monaten kein Aktivitätsverlust des rPlyG nachzuweisen war. Durch die Möglichkeit der Lyophilisation kann das rPlyG kurz vor Anwendung in dem Puffer gelöst werden, der für die weitere Verwendung in Diagnostik oder Therapie notwendig ist. Dies ist von großer Bedeutung, da in Vorversuchen gezeigt wurde, dass die Wirkung des rPlyG von bestimmten Zusatzstoffen gehemmt wird (siehe 4.2.2.1).

## 5.9 Schlussfolgerungen und Ausblick

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen kann der endgültige kolorimetrische rPlyG-Lysetest in der Routinediagnostik als Bestätigungstest eingesetzt werden. Es ist jedoch zu empfehlen, das rPlyG zunächst über einen längeren Zeitraum parallel zum  $\gamma$ -Phagentest in einem Diagnostiklabor anzuwenden, um weitere Erfahrungen im Umgang mit Routineproben zu gewinnen. Auch die Einführung eines Grenzbereichs anstatt des Grenzwertes wäre zu überlegen, da dadurch die Sicherheit des Tests weiter verbessert werden könnte. Des Weiteren sind Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit und Genauigkeit für die Validierung des Tests unerlässlich. Für den Einsatz des Tests in der Routine wäre es notwendig, das rPlyG kommerziell in großen Mengen herzustellen, da die Aufreinigung relativ aufwändig ist. Der Test zeigt eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität zum  $\gamma$ -Phagentest und darüber hinaus Vorteile in seiner Durchführung, wie etwa die einfache und schnelle Abarbeitung und die eindeutige Auswertung. Weitere Vorteile des rPlyG sind seine stabile Aktivität während der Lagerung und seine Wirkung auf bekapselte Bakterienstadien.

Es kann geschlussfolgert werden, dass auch zukünftig eine Kombination aus mehreren Tests nötig sein wird, um *B. anthracis* eindeutig von anderen *Bacillus* spp. differenzieren zu können. Vor allem die Isolate, die über die klassischen Nachweismethoden der Bakteriologie zu keinen eindeutigen diagnostischen Ergebnissen führen, werden die Diagnostik weiterhin vor eine Herausforderung stellen.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein rekombinant hergestelltes Phagenlysin für die Anwendung in der Diagnostik geeignet ist. Diese Erkenntnisse lassen sich als Modell auch auf andere Bakterienarten übertragen. So bleibt zu hoffen, dass die Erforschung der Phagenlysine für ihren Einsatz in Diagnostik und Therapie auch zukünftig Beachtung finden wird.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Evaluierung eines neuen Testverfahrens zur diagnostischen Erkennung von *B. anthracis*. Der Test sollte auf der erregerspezifischen Lyse durch das Bakteriophagen-kodierte Enzym PlyG beruhen. Er sollte einerseits unter einfachen Bedingungen ohne aufwändigen Geräteinsatz durchzuführen und andererseits leicht zu standardisieren und zu beurteilen sein. Ferner sollte geprüft werden, ob PlyG zur Präparation von DNA aus vegetativen Zellen und Sporen von *B. anthracis* geeignet ist. Zur Evaluierung der Tests bzw. Methoden wurden 108 *B. anthracis*-Isolate und 200 Isolate anderer *Bacillus* spp. aus der Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim verwendet.

Im Rahmen der Testentwicklung wurde PlyG, das Endolysin des  $\gamma$ -Phagen W, zunächst rekombinant in *E. coli* OrigamiB pQE60 pREP4 RIL hergestellt (rPlyG). Mit der Kombination aus Anionen- und Kationenaustauschchromatografie in TRIS-Puffer und zwischengeschalteter Dialyse gelang es, auch größere Mengen an enzymatisch aktivem rPlyG herzustellen. Erste Versuche, die bakteriolytische Wirkung des rPlyG auf *Bacillus*-Bakterien mittels Turbidimetrie von Kulturmaterial zu erfassen, verliefen unbefriedigend, da die beobachtete Reduktion der Trübung nicht zuverlässig mit der Abnahme der Bakterienzellzahl korrelierte. Erfolgreicher war die Entwicklung eines kolorimetrischen rPlyG-Lysetests. Dabei wird die rPlyG-vermittelte Bakteriolyse mittels BCA-Reagenz und Photometrie bei 540 nm an der Menge des aus den Bakterienzellen freigewordenen Proteins gemessen. Bei der Untersuchung der *Bacillus* spp.-Isolate zeigte sich der kolorimetrische rPlyG-Lysetests ebenso wie der hausinterne  $\gamma$ -Phagentest als hochgradig spezifisch und sensitiv in der Erkennung von *B. anthracis*. So reagierten 101 *B. anthracis*-Isolate (93,5 %) im kolorimetrischen rPlyG-Lysetest (endgültiges Protokoll) positiv, bei Verwendung von Übernachtskulturen sogar 105 Isolate (97,2 %). Dagegen blieben 161 von 200 Isolaten (80,5 %) anderer *Bacillus* spp. in diesem Test negativ. Ein zweistufiges Testverfahren, in dem zunächst das Hämolyseverhalten geprüft wird und anhämolysierende Isolate anschließend dem kolorimetrischen rPlyG-Lysetest

unterworfen werden, war hinsichtlich der Differenzierung zwischen *B. anthracis* und anderen *Bacillus* spp. zu 97,2 % sensitiv und zu 95,5 % spezifisch. Damit unterlag dieses neue Testverfahren nur knapp dem Verfahren, bei dem der hausinterne  $\gamma$ -Phagentest anstelle des kolorimetrischen rPlyG-Lysetests verwendet wurde, und das zu 100 % sensitiv und zu 97 % spezifisch war.

In vergleichenden Untersuchungen erwies sich rPlyG als geeignet, um damit DNA aus vegetativen *B. anthracis*-Zellen frei zu setzen. Die Anwendung von rPlyG führte sogar zur Freisetzung größerer DNA-Moleküle als die Behandlung mit Hitze. Beide Verfahren waren gleichwertig, um DNA-Präparate für den diagnostischen Nachweis von *B. anthracis*-spezifischer Plasmid-DNA mit der Real-Time-PCR herzustellen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich mit rPlyG im Gegensatz zum  $\gamma$ -Phagen auch bekapselte *B. anthracis*-Zellen lysieren lassen. *B. anthracis*-Sporen wurden dagegen als rPlyG-unempfindlich eingestuft, da das entsprechend behandelte Material in der *B. anthracis*-spezifischen Real-Time-PCR stets negativ reagierte. Verlaufsuntersuchungen zeigten, dass sich rPlyG in lyophilisierter Form über mindestens acht Monate ohne Aktivitätsverlust lagern lässt.

Im Zuge der hier durchgeführten Arbeiten konnte ein neues Diagnostikum entwickelt werden, das sich gut in die Palette der vorhandenen Tests zur Identifizierung von *B. anthracis*-Isolaten einfügt. Da der Test hochgradig spezifisch und sensitiv ist und sich mit wenig Aufwand durchführen lässt, kann dieser Test zu einer Verbesserung der Milzbrand-Schnelldiagnostik vor allem in weniger gut ausgestatteten Labors beitragen. Seine einfache und leicht zu standardisierende Durchführung bieten in Kombination mit der Stabilität des rPlyGs vor allem gegenüber dem  $\gamma$ -Phagentest anwendungstechnische Vorteile.

## 7 Summary

The aim of this work was the development and evaluation of a new test procedure for the diagnostic detection of *B. anthracis*. The assay should be based on the pathogen-specific lysis by the bacteriophage-encoded enzyme PlyG. On the one hand it should be carried out under simple conditions without complex devices and on the other hand be easy to standardize and to judge. It ought to be examined whether PlyG is suitable for preparations of DNA from vegetative cells and spores of *B. anthracis*. To evaluate the assays and methods 108 *B. anthracis* isolates and 200 isolates of other *Bacillus* spp. from the strain collection of the Institute for Environmental and Animal Hygiene, University of Hohenheim were used.

As part of the test development PlyG, the endolysin of the gamma-phage W has been produced recombinantly in *E. coli* OrigamiB pQE60 pREP4 RIL (rPlyG). With the combination of anion- and cation-exchange chromatography in TRIS-buffer and interposed dialysis it succeeded to produce larger quantities of enzymatically active rPlyG. Attempts to detect the bacteriolytic effect of rPlyG on *Bacillus*-bacteria from culture material by turbidimetry were however unsatisfactory since the observed reduction of the turbidity is not reliably correlated with the decrease of bacteria cell number. More successful was the development of a colorimetric rPlyG lysis assay where the rPlyG-mediated bacteriolysis is measured on the amount of released protein from the bacterial cells by using the BCA reagent and photometry at 540 nm. In the investigation of *Bacillus* spp. isolates the colorimetric rPlyG lysis assay showed to be highly specific and sensitive in the detection of *B. anthracis* as an in-house gamma-phage assay. Thus 101 *B. anthracis* isolates (93.5 %) reacted positively in the colorimetric rPlyG lysis assay (final protocol), with the use of overnight cultures even 105 isolates (97.2 %). However 161 of 200 isolates (80.5 %) of other *Bacillus* spp. remained negative in this assay. A two-step test procedure for the differentiation between *B. anthracis* and other *Bacillus* spp. showed 97.2 % sensitivity and 95.5 % specificity. Therefore it was initially tested the haemolytic characteristic and then anhaemolytic isolates were subjected to the rPlyG lysis assay. Thus the new test method was subject just

narrowly the method of the in-house gamma-phage assay that was 100 % sensitive and 97 % specific.

In comparative studies rPlyG was proved as suitable in order to set free DNA from vegetative *B. anthracis* cells. The application of rPlyG even led to the release of larger DNA molecules than the treatment with heat. Both methods were equivalent to produce DNA preparations for the diagnostic detection of *B. anthracis*-specific plasmid DNA with real-time PCR. Further investigation showed that rPlyG is able to lyse encapsulated *B. anthracis* cells in contrast to the gamma-phage. *B. anthracis* spores however were classified as rPlyG-insensitive, because they always reacted negatively in the *B. anthracis*-specific real-time PCR. Follow-up studies showed that rPlyG can be stored in lyophilized form for at least 8 months without loss of activity.

As part of this work it was possible to develop a new diagnostic assay which fits well to the existing tests for identification of *B. anthracis*-isolates. Because the assay is highly specific and sensitive and can be performed with little effort, this assay can help to improve the anthrax diagnostic, especially in ordinary equipped laboratories. The simple and easy to standardize implementation combined with the stability of the rPlyG offers advantages in application in contrast to the gamma-phage.



## 8 Literaturverzeichnis

**Abramova, F.A., L.M. Grinberg, O.V. Yampolskaya, D.H. Walker.** 1993. Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 2291-2294.

**Abshire, T.G., J.E. Brown, J.W. Ezzell.** 2005. Production and validation of the use of  $\gamma$  phage for identification of *Bacillus anthracis*. J. Clin. Microbiol. 43: 4780-4788.

**Ascoli, A.** 1957. Präzipitation bei Milzbrand. Zbl. Bakt. I. Orig. 58: 63-70.

**Athamna, A., M. Athamna, N. Abu-Rashed, B. Medlej, D.J. Bast, E. Rubinstein.** 2004. Selection of *Bacillus anthracis* isolates resistant to antibiotics. J. AntimicroB. Chemother. 54: 424-428.

**Barman, P., D. Gadre.** 2007. A study of phage based diagnostic technique for tuberculosis. Indian J. Tuberc. 54: 36-40.

**Bavykin, S.G., Y.P. Lysov, V. Zakhariev, J.J. Kelly, J. Jackman, D.A. Stahl, A. Cherni.** 2004. Use of 16S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationship of *Bacillus cereus* group micro-organisms. J. Clin. Microbiol. 42: 3711-3730.

**Beyer, W., P.C.B. Turnbull.** 2009. Anthrax in animals. Mol. Aspects Med. 30: 481-489.

**Beyer, W.** 2004. Impfstrategien zur Milzbrandprophylaxe. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 117: 508-524.

**Beyer, W., C. Bartling, H. Neubauer.** 2003. Zum Stand der Nachweisverfahren für *Bacillus anthracis* in klinischen und Umweltproben. Tierärztl. Umschau. 58: 653-662.

**Bundesgesetzblatt.** 2004. Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) vom 03.11.2004. BGBl. I S. 2764. Zuletzt geändert am 18.12.2009.

**Bundesgesetzblatt.** 1999. Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (BiostoffV) vom 27.01.1999. BGBl. I S.50. Zuletzt geändert 18.12.2008.

**Bundesgesetzblatt.** 1991. Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand (MilzbrRbV) vom 23.05.1991. BGBl. I S.1172.

- Bundesgesetzblatt.** 1909. Tierseuchengesetz (TierSG) vom 26.06.1909 in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 2004. BGBl. I S.1260, 3588. Zuletzt geändert 09.12.2010.
- Bischof T.S., B.L. Hahn, P.G. Sohnle.** 2007. Characteristics of spore germination in a mouse model of cutaneous anthrax. *J. Infect. Dis.* 195: 888-894.
- BMELV.** 2007. Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen. [http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Tierseuchen/Infektion\\_srichtlinie.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Tierseuchen/Infektion_srichtlinie.pdf?__blob=publicationFile).
- Böhm, R, W. Beyer.** 2003. Bioterroristische Anschläge mit *Bacillus anthracis*. – Erfahrungen und Konsequenzen aus den Ereignissen des Jahres 2001. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 11: 956-964.
- Böhm, R., D. Strauch.** 1974. A fluorescence serological rapid test for the determination of spores from *Bacillus anthracis* using the micro culture method on nucleopore filters] *Zentralbl. Veterinärmed. B.* 21: 329-35.
- Braun, B., M. Paschke.** 2006. Phagen-Display auf neuen Wegen. *Biospektrum.* 04.06: 381-383.
- Brook, I.** 2002. Review - The prophylaxis and treatment of anthrax. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 20: 320-325.
- Broudy, T.B., V. Pancholi, V.A. Fischetti.** 2001. Induction of lysogenic bacteriophage and phage-associated toxin from group A *streptococci* during coculture with human pharyngeal cells. *Infect. Immun.* 69: 1440-1443.
- Brown, E.R., M.D. Moody, E.L. Treece, C.W. Smith.** 1958. Differential diagnosis of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus cereus* var. *mycoides*. *J. Bacteriol.* 75: 499-509.
- Brown, E.R., W.B. Cherry.** 1955. Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J. Infect. Dis.* 96: 34-39.
- Bryskier, A.** 2002. *Bacillus anthracis* and antibacterial agents. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 467–478.
- Buck, C.A., R.L. Anacker, F.S. Newman, A. Eisenstark.** 1963. Phage isolated from lysogenic *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 85: 1423-1430.
- Carlton, R.M.** 1999. Phage Therapy: Past history and future prospects. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 47: 267-274.

- Cavallo, J.D., F. Ramisse, M. Girardet, J. Vaissaire, M. Mock, E. Hernandez.** 2002. Antibiotics susceptibilities of 96 isolates of *Bacillus anthracis* isolated in France between 1994 and 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2307-2309.
- CDC.** 2006. Centers for Disease Control and Prevention. Bioterrorism Agents / Diseases: By Category (<http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>).
- Chang, Y.H., Y.H. Shangkuan, H.C. Lin, H.W. Liu.** 2003. PCR assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4502-4510.
- Cheng, Q., D. Nelson, S. Zhu, V.A. Fischetti.** 2005. Removal of group B *Streptococci* colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 111-117.
- Choe, C.H., S.S. Bouhaouala, I. Brook, T.B. Elliott, G.B. Knudson.** 2000. In vitro development of resistance to ofloxacin and doxycycline in *Bacillus anthracis* Sterne. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1766.
- Clark, M.A., F.R. Hammond, A. Papaioannou, N.J. Hawkins, R.L. Ward.** 1997. Regulation and expression of human Fabs under the control of the *Escherichia coli* Arabinose promoter, pBAD. *Immunotechnology.* 3: 217-226.
- Cowles, P.B.** 1931. A bacteriophage for *B. anthracis*. *J. Bacteriol.* 21: 161-169.
- d'Herelle, F.H.** 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *C. R. Acad. Sci.* 165: 373-375.
- Davies, J.C.** 1980. Transmission of anthrax. *Cent. Afr. J. Med.* 26: 47.
- Davison, S., E. Couture-Tosi, T. Candela, M. Mock, A. Fouet.** 2005. Identification of the *Bacillus anthracis*  $\gamma$  phage receptor. *J. Bacteriol.* 187: 6742-6749.
- Diaz, E., R. Lopez, J.L. Garcia.** 1990. Chimeric phage-bacterial enzymes: A clue to the modular evolution of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8125-8129.
- Dixon, T.C., A.A. Fadl, T.M. Koehler, J.A. Swanson, P.C. Hanna.** 2000. Early *Bacillus anthracis*-macrophage interactions: intracellular survival and escape. *Cell. Microbiol.* 2: 453-463.
- Dixon, T.C., M. Meselson, J. Guillemin, P.C. Hanna.** 1999. Medical progress: Anthrax. *N. Engl. J. Med.* 341: 815-826.

- Dodatko, T., M. Akoachere, S.M. Muehlbauer, F. Helfrich, A. Howerton, C. Ross, V. Wysocki, J. Brojatsch, E. Abel-Santos.** 2009. *Bacillus cereus* spores release alanine that synergizes with inosine to promote germination. PLoS ONE. 4: e6398.
- Driks, A.** 2009. The *Bacillus anthracis* spore. Mol. Aspects Med. 30: 368-373.
- Fischetti, V.A.** 2001. Phage antibacterials make a come back. Nature biotechnology. 19: 734-735.
- Fichtel, J.** 2008. Bestimmung des Endosporenteils an der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Wattsedimenten. Dissertationsarbeit der Universität Oldenburg.
- Garcia, E., J.L. Garcia, P. Garcia, A. Arraras, J.M. Sanchez-Puelles.** 1988. Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 914-918.
- Goossens, P.L.** 2009. Animal models of human anthrax: The quest for the holy grail. Mol. Aspects Med. 30: 467-480.
- Greenfield, W.S.** 1880. Lectures on some recent investigations into the pathology of infectious and contagious disease. Lecture III, part 1. Lancet. 115: 517-520.
- Gruending, A., M.D. Manson, R. Young.** 2001. Holins kill without warning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 9348-9352.
- Guidi-Rontani, C., M. Levy, H. Ohayon, M. Mock.** 2001. Fate of germinated *Bacillus anthracis* spores in primary murine macrophages. Mol. Microbiol. 42: 931-938.
- Guidi-Rontani, C., M. Weber-Levy, E. Labruyere, M. Mock.** 1999. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. Mol. Microbiol. 31: 9-17.
- Heine, H.S., J. Bassett, L. Miller, J.M. Hartings, B.E. Ivins, M.L. Pitt, D.Fritz, S.L. Norris, W.R. Byrne.** 2007. Determination of antibiotic efficacy against *Bacillus anthracis* in a mouse aerosol challenge model. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 1373-1379.
- Helgason, E., O.A. Okstad, D.A. Caugant, H.A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hehna, A.-B. Kolsto.** 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2627-2630.

- Hering, D., W. Thompson, J. Hewetson, S. Little, S. Norris, J. Pace-Templeton.** 2004. Validation of the anthrax lethal toxin neutralization assay. *Biologicals*. 32: 17-27.
- Hoffmaster, A.R., J. Ravel, D.A. Rasko, G.D. Chapman, M.D. Chute, C.K. Marston, B.K. De, C.T. Sacchi, C. Fitzgerald, L.W. Mayer, M.C.J. Maiden, F.G. Priest, M. Barker, L. Jiang, R.Z. Cer, J. Rilstone, S.N. Peterson, R.S. Weyant, D.R. Galloway, T.D. Read, T. Popovic, C.M. Fraser.** 2004. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 8449–8454.
- HPA (Health Protection Agency).** 2012. [http://www.hpa.org.uk/webw/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb\\_C/1317135229403](http://www.hpa.org.uk/webw/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb_C/1317135229403).
- Huard, C., G. Miranda, F. Wessner, A. Bolotin, J. Hansen, S.J. Foster, M.-P. Chapot-Chartier.** 2003. Characterization of AcmB, an N-acetylglucosaminidase autolysin from *Lactococcus lactis*. *Microbiol.* 149: 695-705.
- Hudson, M.J., W. Beyer, R. Böhm, A. Fasanella, G. Garofolo, R. Golinski, P.L. Goossens, U. Hahn, B. Hallis, A. King, M. Mock, C. Montecucco, A. Ozind, F. Tonello, S.H.E. Kaufmann.** 2008. *Bacillus anthracis*: Balancing innocent research with dual-use potential. *Int. J. Med. Microbiol.* 298: 345–364.
- Hugh-Jones, M., J. Blackburn.** 2009. The ecology of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* 30: 356-367.
- Hugh-Jones, M.** 1999. 1996-1997 global anthrax report. *J. Appl. Microbiol.* 87: 189-191.
- Inglesby, T.V., T. O’Toole, D.A. Henderson, J.G. Bartlett, M.S. Ascher, E. Eitzen, A.M. Friedlander, J. Gerberding, J. Hauer, J. Hughes, J. McDade, M.T. Osterholm, G. Parker, T.M. Perl, P.K. Russell, K. Tonat.** 2002. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *J. Am. Med. Assoc.* 287: 2236-2252.
- Invitrogen.** Katalog-Nr. V450-01. [www.invitrogen.de](http://www.invitrogen.de).
- Jado, I., R. Lopez, E. Garcia, A. Fenoll, J. Casal, P. Garcia.** 2003. Phage lytic enzyme as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 967-973.
- Jay, V.** 2001. The legacy of Robert Koch. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125: 1148–1149.

- Jensen, J., H. Kleemeyer.** 1953. Bacterial differential diagnosis of the anthrax by means of a new specific test called the string-of pearls-test. Zentralbl. Bakteriolog. Orig. 159: 494-500.
- Johnson, R.P., C.L. Gyles, W.E. Huff, S. Ojha, G.R. Huff, N.C. Rath, A.M. Donoghue.** 2008. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. Anim. Health Res. Rev. 9: 201-215.
- Keim, P., L.B. Price, A.M. Klevytska, K.L. Smith, J.M. Schupp, R. Okinaka, P.J. Jackson, M.E. Hugh-Jones.** 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships with *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 182: 2928-2936.
- Keim, P., A. Kalif, J. Schupp, K. Hill, S.E. Travis, K. Richmond, et al.** 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. J. Bacteriol. 179:818-824.
- Kenny, J.G., S. McGrath, G.F. Fitzgerald, D. van Sinderen.** 2004. Bacteriophage Tuc2009 encodes a tail-associated cell wall-degrading activity. J. Bacteriol. 186: 3480-3491.
- Kielwein, G.** 1957. Ein Vorschlag zur praktischen Differenzierung des *Bacillus anthracis* durch den Phagentest. Tierärztl. Umsch. 12: 183-186.
- Kikkawa, H.S., T. Ueda, S. Suzuki, J. Yasuda.** 2008. Characterization of the catalytic activity of the  $\gamma$ -phage lysin, PlyG, specific for *Bacillus anthracis*. FEMS Microbiol. Lett. 286: 236-240.
- Kikkawa, H., Y. Fujinami, S. Suzuki, J. Yasuda.** 2007. Identification of the amino acid residues critical for specific binding of the bacteriolytic enzyme of  $\gamma$ -phage, PlyG, to *Bacillus anthracis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 363: 531-535.
- Klee S.R., E.B. Brzuszkiewicz, H. Nattermann, H. Brüggemann, S. Dupke, A. Wollherr, T. Franz, G. Pauli, B. Appel, W. Liebl, E. Couacy-Hymann, C. Boesch, F.-D. Meyer, F.H. Leendertz, H. Ellerbrok, G. Gottschalk, R. Grunow, H. Liesegang.** 2010. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. PLoS ONE. 5: e10986.
- Klee S.R., H. Nattermann, S. Becker, M. Urban-Schriefer, T. Franz, D. Jacob, B. Appel.** 2006. Evaluation of different methods to discriminate *Bacillus anthracis* from other bacteria of the *Bacillus cereus* group. Microbiol. J. Appl. Microbiol. 100: 673-681.

- Koch, R.** 1876. Die Ätiologie der Milzbrandkrankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 2: 277–310.
- Koehler, T.M.** 2009. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. Mol. Aspects Med. 30: 386-396.
- Kuhn, J., M. Suissa, D. Chiswell, A. Azriel, B. Bergman, D. Shahar, S. Reznick, R. Sharf, J. Wyse, T. Bar-On, I. Cohen, R. Giles, I. Weiser, S. Lubinsky-Mink, S. Ulitzur.** 2002. A bacteriophage reagent for *Salmonella*: molecular studies on Felix 01. Int. J. Food Microbiol. 74: 217-227.
- Kwong, K.L., T.L. Que, S.N. Wong, K.T. So.** 1997. Fatal meningoencephalitis due to *Bacillus anthracis*. J. Paediatr. Child Health. 33: 539-541.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Lalitha, M.K., M.K. Thomas.** 1997. Penicillin resistance in *Bacillus anthracis*. Lancet. 349: 1522.
- Lang, P.** 2006. Aufreinigung eines rekombinanten Phagenlysins und dessen Anwendung in der Diagnostik. Diplomarbeit am Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin der Universität Hohenheim.
- Lasch, P., W. Beyer, H. Nattermann, M. Stämmler, E. Siegbrecht, R. Grunow, D. Naumann.** 2009. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. Appl. Environ. Microbiol. 75: 7229–7242.
- Lemnitzer, F.** 2005. Klonierung, Expression und Charakterisierung eines *Bacillus anthracis*-spezifischen Phagenlysins. Diplomarbeit am Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin der Universität Hohenheim.
- Lewerin, S.S., M. Elvander, T. Westermarck, L.N. Hartzell, A.K. Norström, S. Ehrs, R. Knutsson, S. Englund, A.-C. Andersson, M. Granberg, S. Bäckman, P. Wikström, K. Sandstedt.** 2010. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd – 1st case in 27 years: Case report. Acta Vet Scand. 52.
- Liu H., Z. Du, J. Wang, R. Yang.** 2007. Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 73: 1899–1907.

- Loeffler J.M., V.A. Fischetti.** 2003. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 375-377.
- Loeffler, J.M., D. Nelson, V.A. Fischetti.** 2001. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with bacteriophage cell wall hydrolase. *Science.* 294: 2170-2172.
- Loessner, M.J., K. Kramer, F. Ebel, S. Scherer.** 2002. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.* 44: 335-349.
- Lopez, R.** 2004. *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: one long argument. *Int. Microbiol.* 7: 163-171.
- Low, L.Y., C. Yang, M. Perego, A. Osterman, R.C. Liddington.** 2005. Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin. *J. Biol. Chem.* 280: 35433-35439.
- Marston C.K., J.E. Gee, T. Popovic, A.R. Hoffmaster.** 2006. Molecular approaches to identify and differentiate *Bacillus anthracis* from phenotypically similar *Bacillus* species isolates. *BMC Microbiol.* 6.
- McCloy, E.W.** 1951a. Studies on a lysogenic *Bacillus* strain. I. A bacteriophage specific for *Bacillus anthracis*. *J. Hyg.* 49: 114-125.
- McCloy, E.W.** 1951b. Unusual behavior of a lysogenic *Bacillus* strain. *J. Gen. Microbiol.* 51: xiv-xvi.
- Mock, M., T. Mignot.** 2003. Anthrax toxins and the host: a story of intimacy. *Cell. Microbiol.* 5: 15-23.
- Montecucco C., M. Mock.** 2009. Editorial. *Mol. Aspects Med.* 30(6): 345-6.
- Nelson, M., A.J. Stagg, D.J. Stevens, M.A. Brown, P.C. Pearce, A.J. Simpson, M.S. Lever.** 2011. Post-exposure therapy of inhalational anthrax in the common marmoset. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 38: 60-64.
- Nelson, D., L. Loomis, V.A. Fischetti.** 2001. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A *Streptococci* by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 4107-4112.
- Neumeister, B., H.K. Geiss, R.W. Braun, P. Kimmig.** 2009. *Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie–Mykologie–Virologie–Parasitologie.* Thieme Verlag, Stuttgart. 2. Auflage.



**OIE.** 2012. [http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single\\_report&pop=1&reportid=12121](http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=12121).

**OIE (World Organisation for Animal Health).** 2009. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2009. Chapter 2.1.1. Anthrax.

**OIE.** 2009. [http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease\\_immediate\\_summary&selected\\_year=2009](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_immediate_summary&selected_year=2009)

**OIE.** 2009. Standard Operating Procedure (SOP) for OIE Validation and Certification of Diagnostic Assays. Version 2.1 (06/2009).

**Okinaka, R., T. Pearson, P. Keim.** 2006. Anthrax, but not *Bacillus anthracis*? PLoS Pathogens. 2: 1025-1027.

**Öncü, S., S. Öncü, S. Sakarya.** 2003. Anthrax – an overview. Med. Sci. Monit. 9: 276-283.

**Pasteur, L.** 1881. De l'attenuation des virus et de leur retour a la virulence. C. R. Acad. Sci. Agric. Bulg. 92: 429-435.

**Peek, R., K.R. Reddy.** 2006. FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products. Gastroenterology. 131: 1370.

**Pile, J.C., J.D. Malone, E.M. Eitzen, A.M. Friedlander.** 1998. Anthrax as a potential biological warfare agent. Arch. Intern. Med. 158: 429-434.

**Popov, S.G., T.G. Popova, E. Grene, F. Klotz, J. Cardwell, C. Bradburne, Y. Jama, M. Maland, J. Wells, A. Nalca, T. Voss, C. Bailey, K. Alibek.** 2004. Systemic cytokine response in murine anthrax. Cell. Microbiol. 6: 225-233.

**Popovic, T., A. Hoffmaster.** 2005. Validation of methods for confirmatory identification of presumptive isolates of *Bacillus anthracis*. Journals of AOAC International. 88: 175-177.

**Powledge, T.M.** 2004. New antibiotics – Resistance is futile. PloS Biology. 2: 151-154.

**Prinz, W.A., F. Aslund, A. Holmgren, J. Beckwith.** 1997. The role of the Thioredoxin and Glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. J. Biol. Chem. 272: 15661-15667.

**Pritchard, D.G., S. Dong, J.R. Baker, J.A. Engler.** 2004. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. Microbiology. 150: 2079-2087.

**ProMED-mail.** 2012. Archive Number: 20120716.1203908.

- Qiagen.** 2003. The QIAexpressionist: A handbook for high level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5. Auflage. Qiagen GmbH, Hilden
- Radun, D., H. Bernard, M. Altmann, I. Schöneberg, V. Bochat, U. van Treeck, R.M. Rippe, R. Grunow, M. Elschner, W. Biederbick, G. Krause.** 2010. Preliminary case report of fatal anthrax in an injecting drug user in North-Rhine-Westphalia, Germany, December 2009. *Eurosurveillance*. 15.
- Ramsay, C.N., A. Stirling, J. Smith, G. Hawkins, T. Brooks, J. Hood, G. Penrice, L.M. Browning, S. Ahmed.** 2010. An outbreak of infection with *Bacillus anthracis* in injecting drug users in Scotland. *Eurosurveillance*. 15.
- Rees, C.E.D., C.E.R. Dodd.** 2006. Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food. *Adv. Appl. Microbiol.* 59: 159-186.
- Ressel, G.** 2001. CDC updates interim guidelines for anthrax exposure management and antimicrobial therapy. *Am. Fam. Physician.* 64: 1901-1902.
- Richtlinie 2000/54/EG** des europäischen Parlaments und des Rates vom 18.09.2000 über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit. ABl. EG Nr. L262 S.21.
- RKI (Robert Koch Institut).** 2012. [http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/A/Anthrax/Milzbrand-dritter-Todesfall\\_2012\\_Berlin.html?nn=2398074](http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/A/Anthrax/Milzbrand-dritter-Todesfall_2012_Berlin.html?nn=2398074)
- Sainathrao, S., K.V.K. Mohan, C. Atreya.** 2009. Gamma-phage lysin PlyG sequence-based synthetic peptides coupled with Qdot-nanocrystals are useful for developing detection methods for *Bacillus anthracis* by using its surrogates, *B.anthraxis-Sterne* and *B. cereus-4342*. *BMC Biotechnology*. 9: 1-7.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmid, G., A. Kaufmann.** 2002. Anthrax in Europe: its epidemiology, clinical characteristics, and role in bioterrorism. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 479-488.
- Schuch, R., V.A. Fischetti.** 2006. Detailed genomic analysis of the W $\beta$  and  $\gamma$  Phages infecting *Bacillus anthracis*: Implications for evolution of environmental fitness and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 188: 3037-3051.
- Schuch, R., D. Nelson, V.A. Fischetti.** 2002. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*. 418: 884-889.
- Schwartz, M.** 2009. Dr. Jekyll and Mr. Hyde: A short history of anthrax. *Mol. Aspects Med.* 30: 347-355.

- Seaman, T., A. Trollip, R. Mole, H. Albert.** 2003. The use of a novel phage-based technology as a practical tool for the diagnosis of tuberculosis in Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 2: 40-45.
- Shlyakhov, E., E. Rubinstein.** 1996. Evaluation of the anthrax skin test for diagnosis of acute and past human anthrax. *Eur. J. Clin. Mikrobiol. Infect. Dis.* 15: 242-245.
- Smirnova, N.I., N.B. Cheldyshova, E.A. Kostromitina, A.N. Kulichenko, V.V. Kutyrev.** 2001. Characterization of *vibrio cholerae eltor* isolates according to their epidemic potential using new diagnostic cholera bacteriophages eltor ctx+ and ctx- and by the polymerase chain reaction. *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 6: 11-16.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, B.J. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Sozhamannan, S., M. McKinstry, S.M. Lentz, M. Jalasvuori, F. McAfee, A. Smith, J. Dabbs, H.-W. Ackermann, J.K.H. Bamford, A. Mateczun, T.D. Read.** 2008. Molecular characterization of a variant of *Bacillus anthracis*-specific phage AP50 with improved bacteriolytic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6792-6796.
- Stone, R.** 2002. Stalin's forgotten cure. *Science.* 298: 728-731.
- Swartz, M.N.** 2001. Recognition and management of anthrax – an update. *N. Engl. J. Med.* 345: 1621-1626.
- Tan, G.H., K. Yusoff, H.F. Seow, W.S. Tan.** 2007. A phage-displayed single chain variable fragment that interacts with hepatitis B core antigen: Library construction, selection and diagnosis. *J. Clin. Virol.* 38: 49-56.
- Thorne, C.B., C.G. Gomez, R.D. Housewright.** 1952. Synthesis of glutamic acid and glutamyl polypeptide by *Bacillus anthracis*. II. *J. Bacteriol.* 63: 363-368.
- Tigertt, W.D.** 1980. Anthrax: William Smith Greenfield, MD,FRCP, professor superintendent, the Brown Animal Sanatory Institution (1878-81) concerning the priority due to him for the production of the first vaccine against anthrax. *J. Hyg. (Lond).* 85: 415-420.
- Tournier, J.-N., S.R. Paccani, A. Quesnel Hellmann, C.T. Baldari.** 2009. Anthrax toxins: A weapon to systematically dismantle the host immune defences. *Mol. Aspects Med.* 30: 456-466.

- Turnbull, P.C., M. Diekmann, J.W. Killian, W. Versfeld, V. de Vos, L. Arntzen, K. Wolter, P. Bartels, A. Kotze.** 2008. Naturally acquired antibodies to *Bacillus anthracis* protective antigen in vultures of southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 75: 95-102.
- Turnbull, P.C.B.** 2002. Introduction: anthrax history, disease and ecology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 271: 1-19.
- Turnbull, P.C.B.** 1999. Definitive identification of *Bacillus anthracis* – a review. *J. Appl. Microbiol.* 87: 237–240.
- Turnbull, P.C.B., R. Böhm, O. Cosivi, M. Doganay, M.E. Hugh-Jones, D.D. Joshi, M.K. Lalitha, V. de Vos.** 1998. Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals, 3<sup>rd</sup> edition. (WHO/EMC/ZDI/98.6). World Health Organization, Department of Communicable Diseases Surveillance and Response, Genf, Schweiz, 1-106.
- Turnbull, P.C., R.A. Hutson, M.J. Ward, M.N. Jones, C.P. Quinn, N.J. Finnie, C.J. Duggleby, J.M. Kramer, J. Melling.** 1992. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 21-8.
- Twort, F.W.** 1914. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet.* 11: 1241-1246.
- Ugorcakova, J., G. Bukovska.** 2003. Lysin and holins: tools of phage-induced lysis. *Biologia, Bratislava.* 58: 31-38.
- Van der Goot, G., J.A.T. Young.** 2009. Receptors of anthrax toxin and cell entry. *Mol. Aspects Med.* 30: 406-412.
- Varea, J., B. Monterroso, J.L. Saiz, C. Lopez-Zumel, J.L. Garcia, J. Laynez, P. Garcia, M. Menendez.** 2004. Structural and thermodynamic characterization of Pal, a phage natural chimeric lysin active against *Pneumococci*. *J. Biol. Chem.* 279: 43697-43707.
- Vilas-Boas, G.T., A.P.S. Peruca, O.M.N. Arantes.** 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* 53: 673-687.
- Voet, D., J.G. Voet (Hg.).** 1992. Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 376f, 755.
- Wang, I.-N., D.L. Smith, R. Young.** 2000. Holins: The protein clocks of bacteriophage infections. *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 799- 825.

- Walter, M.H., D.D. Baker.** 2003. Three *Bacillus anthracis* bacteriophages from topsoil. *Curr.Microbiol.* 47: 55-58.
- Watson A., D. Keir.** 1994. Information on which to base assessments of risk from environments contaminated with anthrax spores. *Epidemiol. Infect.* 113: 479-490.
- WHO.** 2008. Anthrax in humans and animals. 4<sup>th</sup> edition. ISBN 978 92 4 154753 6.
- Yoong, P., R. Schuch, D. Nelson, V.A. Fischetti.** 2006. PlyPH, a bacteriolytic enzyme with a broad pH range of activity and lytic action against *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 188: 2711-2714.
- Yoong, P., R. Schuch, D. Nelson, V.A. Fischetti.** 2004. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibioticresistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.* 186: 4808-4812.
- Young, R., U. Blaes.**1995. Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 17: 191-205.
- Yu, P.** 2007. Enhancing survival of *Escherichia coli* by increasing the periplasmic expression of Cu,Zn superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 : 867-871.
- Zimmermann, P., M. Müller, M. Antwerpen, H. Meyer, S. Hörmansdorfer.** 2009. *Bacillus anthracis* – ein Fallbericht aus Bayern. 28. Arbeits- und Fortbildungstagung des AVID, Bakteriologie, 16.-18. September, Bad Staffelstein, Abstract S. 61.
- Zwartouw, H.T., H. Smith.**1956. Polyglutamic acid from *Bacillus anthracis* grown in vivo: structure and agressin activity. *Biochem. J.* 63: 437-454.

## 9 Anhang

### 9.1 Verwendete Medien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 12: Nährmedien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Std.-I-Bouillon	1.07882.0500	Merck, Darmstadt
Std.-I-Agar	1.07882.0500	Merck, Darmstadt
TS-Bouillon	CM0129	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
TS-Agar	CM0131	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
Columbia Agar mit 5 % Schafsblut (defibriniert)	1.10455.5000 SR0051C	Merck, Darmstadt Oxoid, Wesel

Tab. 13: Reagentien und Testkits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
100 bp DNA Ladder	15628-019	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	A0166	Roth, Karlsruhe
BC Assay Reagent	UP 95424A	Uptima, Montlucon, Frankreich
Bestatin	UP 300991	Uptima, Montlucon, Frankreich
Chloramphenicol	C-3175	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Coo Protein Assay	UP F8640	Uptima, Montlucon, Frankreich
Dithiotreitol (DTT)	D-0632	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dulbecco´s PBS steril pH 7,4	D8537	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Fortsetzung der Tab. 13 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 13

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
E64	UP 789581	Uptima, Montlucon, Frankreich
Enzympuffer für HindIII	BR5	Fermentas, St. Leon Rot
Enzympuffer für NcoI	BY5	Fermentas, St. Leon Rot
Mass Ruler™, DNA Ladder, Low Range	SM 0383	Fermentas, St. Leon Rot
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	F-530S	Finnzymes, Espoo, Finnland
High Pure Plasmid Isolation Kit	1754785	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
IPTG	2316.3	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	91145722	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
L-(+)Arabinose	5118.1	Roth, Karlsruhe
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	12 239 272 001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Limulus Amebocyte Lysate Endochrome-K	EX 53392	Charles River Endosafe, Charleston, USA
Lysozym	L6876	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Malachitgrün	1398	Merck, Darmstadt
Pepstatin A	UP 827752	Uptima, Montlucon, Frankreich
peqGOLD Protein-Marker IV (Prestained)	27-2111	peqLab, Erlangen
Perfectprep-Gel Cleanup Kit	0032 007.740	Eppendorf, Hamburg
Phosphoramidon	UP 348115	Uptima, Montlucon, Frankreich

Fortsetzung der Tab. 13 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 13

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller / Lieferant
PhastGel Blue R-350	17-0518-01	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
PMSF	6367.1	Roth, Karlsruhe
QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	28104	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzym HindIII	ER0501	Fermentas, St. Leon Rot
Restriktionsenzym NcoI	ER0571	Fermentas, St. Leon Rot
Safranin O	1.15948.0025	Merck, Darmstadt
T4 DNA-Ligase	EL0331	Fermentas, St. Leon Rot
Taq DNA-Polymerase	0032002.307	Eppendorf, Hamburg
HotMaster Taq Puffer	0032002.676	Eppendorf, Hamburg
Tetracyclin	T 3383	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Die Standardchemikalien des Labors (z. B. NaCl) wurden von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen.

Tab. 14: Lösungen

Lösung	Chemikalie	Menge	Einheit
PBS (pH7,4)	NaCl	138,0	mM
	KCl	2,7	mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1	mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	mM
TE-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	10	mM
	EDTA	1	mM
1 x TAE-Puffer (pH 8,3)	Tris-Base	40	mM
	Essigsäure	20	mM
	EDTA	2	mM
	ddion. H <sub>2</sub> O		
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	Tris-HCl (pH 7,4)	10	mM
	CaCl <sub>2</sub>	50	mM

Fortsetzung der Tab. 14 auf der nächsten Seite



Fortsetzung der Tab. 14

<b>Lösung</b>	<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>	<b>Einheit</b>
10 x DNA-Probenpuffer	Sucrose	67	% (w/v)
	Bromphenolblau	0,42	% (w/v)
	Xylencyanol	0,42	% (w/v)
1 x SDS-Probenpuffer	Tris-HCl	80	mM
	Bromphenolblau	36	mM
	Dithiotreitol	10	mM
	Glycerin	12,5	% (v/v)
	SDS	2	% (w/v)
	ddion. H <sub>2</sub> O		
Elektrophoresepuffer	Tris-HCl (pH 8,3)	25	mM
	Glycin	200	mM
	SDS	0,1	% (w/v)
Fixierlösung	Ethanol	40	% (v/v)
	Essigsäure	10	% (v/v)
	ddion. H <sub>2</sub> O		
Entfärbelösung	Ethanol	30	% (v/v)
	Essigsäure	8	% (v/v)
	ddion. H <sub>2</sub> O		
Färbelösung	PhastGel Blue-R	1	Tablette
	Entfärbelösung	400	ml
Proteaseinhibitoren-Mix	Pepstatin A	0,50	mg
	Bestatin	0,50	mg
	E64	0,25	mg
	Phosphoramidon	0,25	mg
	DMSO	ad 1	ml
Osmotische Schocklösung 1	Tris-HCl, pH 8	20,0	mM
	EDTA	2,5	mM
	Saccharose	20	%
Osmotische Schocklösung 2	Tris-HCl, pH 8	20,0	mM
	EDTA	2,5	mM

Tab. 15: Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Acrodisc <sup>®</sup> Syringe Filter, 0,2 µm	PN 4454	Pall Corporation, Ann Arbor, USA
CelluSep T2 dialysis tubing MWCO 6.000 – 8.000	T2-32-15	Uptima, Montlucon, Frankreich
Centricon Plus-20 MWCO 10.000	UFC2LGC08	Millipore (Amicon Seperations), Eschborn
EndoTrap <sup>®</sup> blue, endotoxin removal column	311053	Profos AG, Regensburg
HiTrap <sup>™</sup> Q HP, 1 ml	17-1153-01	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HiTrap <sup>™</sup> Q HP, 5 ml	17-1154-01	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HiTrap <sup>™</sup> SP HP, 1 ml	17-1151-01	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HiTrap <sup>™</sup> SP HP, 5 ml	17-1152-01	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Membranfilter 500 ml (0,45 µm)	295 4545	Nalge Nunc International, Rochester, USA
MicroSpin <sup>™</sup> S-400	27-5140-01	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
PD 10-Säulen, Sephadex <sup>™</sup> G-25M	17-0851-01	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Sealing Tape, Polypro- pylen für Mikrotiterplatten	M 12A	Dynatech, Denkendorf
Spitzenfilter (0,45 µm)	10462100	Schleicher & Schuell, Dassel

## 9.2 Eigenschaften der verwendeten *Bacillus*-Isolate

### 9.2.1 *B. anthracis*-Isolate

Tab. 16: Liste der untersuchten *B. anthracis*-Isolate und deren Eigenschaften

Isolat Nr.	Herkunft	identisch mit	Plasmide		laboreigener $\gamma$ -Phagentest
			Toxin	Kapsel	
A1	Sterne Behring	A134	+	-	+
A2	ATCC 14185 V 770 NP/1 R	A119	+	-	+
A3	DU III/7 BGA Berlin		-	+	+
A4	M10 BGA Berlin		-	+	+
A5	"Wien" BGA Berlin		+	+	+
A6	"Münster" BGA Berlin		-	+	+
A7	Nr. 2 BGA Berlin		+	+	+
A8	Nr. 3 BGA Berlin		+	+	+
A9	Nr. 5 BGA Berlin		+	+	+
A10	Nr.6 BGA Berlin		+	+	+
A11	Nr.7 BGA Berlin		+	+	+
A12	Nr,8 BGA Berlin		+	+	+
A15	Stamatin, Sokol	A120, A137	+	-	+
A16	LA 896 Lausanne		+	+	+
A18	LA 251 Lausanne		-	+	+
A19	LA 252 Lausanne		+	+	+
A22	Nr.6006, Sokol		+	+	+
A23	Nr. 4892, Sokol	A121	+	+	+
A24	TN Rind, Sokol		+	+	+
A25	TK Rind, Sokol		+	+	+
A27	Nr.1 Giessen		+	+	+
A28	Nr.5 (1952) FL.Nr.2569, Giessen		+	+	+
A29	Nr.7 (1954) Di.Nr4833, Giessen		+	+	+

Fortsetzung der Tab. 16 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 16

Isolat Nr.	Herkunft	identisch mit	Plasmide		laboreigener $\gamma$ -Phagentest
			Toxin	Kapsel	
A30	Nr.12 (1956) Schwein, Giessen		+	+	+
A32	Nr.22 (1957) FL.Nr.1626, Giessen		+	+	+
A33	Nr.24 (1957 ) FL.Nr.2316, Giessen		+	+	+
A34	Nr.26 (1957) Giessen		+	+	+
A35	Nr.31 (1958) 2712, Giessen		+	+	+
A36	Nr.37 (1959) FL.Nr.203, Giessen		+	+	+
A37	Nr.40 (1960) FL.Nr.940, Giessen		+	+	+
A38	Nr.41 () FL.Nr.973, Giessen		+	+	+
A39	Nr.43 () FL.Nr.2007, Giessen		+	+	+
A40	Nr.45 Vet.PU 448, Rind, Giessen		+	+	+
A41	Nr.47 Di.Nr.1654, Kuh, Giessen		+	+	+
A42	Nr.49 Vet.PU 112, Bulle, Giessen		+	+	+
A43	Nr.51 Vet.PU 115, Giessen		+	+	+
A44	Nr.52 Vet.PU 343, Giessen		+	+	+
A45	W 514, Bern		+	+	+
A46	Maier, Ferkel, UA Stuttgart		-	+	+
A47	B.A., UA Stuttgart	A59	+	+	+
A49	ohne Bez., Giessen		+	+	+
A58	CDC 1014 (Phag)		-	-	+
A59	1973, UA Stuttgart	A47	+	+	+
A60	Nr.10, BGA		-	+	+
A61	Nr.58, BGA		+	+	+
A62	Nr.82, BGA		+	+	+
A63	Nr.93, BGA		+	+	+
A64	Nr.117, BGA		+	+	+
A65	ohne Bez., Giessen		+	+	+
A66	Arova (Mensch), Dr. Nicolet, Bern		+	+	+
A67	Ziegenhaare, Dr. Nicolet, Bern		+	+	+

Fortsetzung der Tab. 16 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 16

Isolat Nr.	Herkunft	identisch mit	Plasmide		laboreigener $\gamma$ -Phagentest
			Toxin	Kapsel	
A68	Filter aus Klimaanlage, Dr. Nicolet, Bern		+	+	+
A69	F2103, USA, Hönicke		+	-	+
A70	ATCC 14578, Typstamm Vollum	A71	+	+	+
A71	ATCC 14578, Typstamm Vollum	A70	+	+	+
A72	D 2071		+	+	+
A73	(delta Ames), Manchee, UK		-	+	+
A74	Sterne, Manchee, UK		+	-	+
A80	Vet.Pu 103, Giessen		+	+	+
A81	Nr.38 (1959) FL.Nr.3597, Giessen		+	+	+
A82	Nr.36 (1959) FL.Nr.138, Giessen		+	+	+
A83	Nr.28 (1958) FL.Nr.688, Giessen		+	+	+
A84	Nr.25 (1957) Vet.PU200, Giessen		+	+	+
A85	Nr.23 (1957) FL.Nr.2132, Giessen		+	+	+
A86	Nr.10 (1956) Rind, Vet.PU23, Giessen		+	+	+
A87	Nr.4 (1951) FL.Nr.1451, Giessen		+	+	+
A88	LUA 3/77, LUA Stuttgart	A129	-	+	+
A89	Innsbruck-Österreich, 9080-G	A135, A136	+	+	+
A90	STI-1 Impfstamm, Reisolat (Maus)		+	-	+
A91	Polino-NP, Nekropsie Platz- Bodenprobe (2004)		+	+	+
A92	NMS-36/1-Neumünster, Reisolat (Maus)		+	+	+
A93	Ames Inst.f.MikroB.der Bundeswehr, Pool 2 + 3		+	+	+
A95	IMBW 2520, 1/1962, unknown orig.		+	+	+
A96	IMBW 4463, 1/1962, unknown orig.		+	+	+
A97	IMBW 5361, 5/1962, unknown orig.		+	+	+
A98	IMBW 13/38, 1/1962, unknown orig.		+	+	+

Fortsetzung der Tab. 16 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 16

Isolat Nr.	Herkunft	identisch mit	Plasmide		laboreigener $\gamma$ -Phagentest
			Toxin	Kapsel	
A100	IMBW 19/54, 1/1962, unknown orig.		+	-	+
A101	IMBW 19/57, 5/1962, unknown orig.		+	+	+
A102	IMBW 25/20, 2/1954, unknown orig.		+	+	+
A103	IMBW 250/500, 5/1962, unknown orig.		+	-	+
A106	IMBW B11/38, 5/1962, unknown orig.		+	+	+
A107	IMBW B16/39, 5/1962, unknown orig.		+	+	+
A108	IMBW B22/39, 1/1962, unknown orig.		+	+	+
A110	IMBW B19/39, 5/1962, unknown orig.		+	+	+
A111	IMBW Behring, 1/1962		+	+	+
A112	IMBW K.-M.-St., 1/1962, unknown orig.		+	+	+
A113	UD III/7, 05.07.00, unknown orig.		+	+	+
A117	WIS1, ATCC 11966		+	+	+
A118	WIS31, Sterne		+	-	+
A119	WIS33, ATCC 14185, V770 NP/1R	A2	+	-	+
A120	WIS107, Stamatina Sokol	A15, A137	+	-	+
A121	WIS117, Sokol 4892	A23	+	+	+
A122	WIS343, delta Ames, Manchee UK		-	+	+
A123	WIS344, Sterne, Manchee UK		-	-	+
A124	WIS397, Zenkowski, MMS Greifswald, NVA		+	-	+
A125	WIS398, STI-1, MMS Greifswald, NVA		+	-	+
A126	Sterne strain, unknown		+	-	+
A127	Milzbrand 527, 2002, unknown		+	+	+/-

Fortsetzung der Tab. 16 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 16

Isolat Nr.	Herkunft	identisch mit	Plasmide		laboreigener $\gamma$ -Phagentest
			Toxin	Kapsel	
A128	Bundesheer AT, unknown, Umweltisolat (AMES)		+	+	+
A129	LUA Sued, unknown	A88	+	+	+
A130	15/02 Kabul, unknown (Sterne)		+	-	+
A131	6282 Tirol, Isolat aus Kuh, 'Tyrolean clone'		+	+	+
A132	4675 Tirol, Isolat aus Kuh, 'Tyrolean clone'		+	+	+
A133	3520 Tirol, Isolat aus Kuh, 'Tyrolean clone'		+	+	+
A134	34F2 Impfstamm, unknown	A1	+	+	+
A135	411/G Georgia, unknown	A89, A136	+	+	-
A136	9080 Georgia, Innsbruck	A89, A135	+	+	-
A137	Innsbruck / Hohenheim	A15, A120	+	-	+

## 9.2.2 Andere *Bacillus* spp.-Isolate

Tab. 17: Liste der untersuchten anderen *Bacillus* spp.-Isolate und deren Eigenschaften. Die mit „(\*)“-markierten Ergebnisse des  $\gamma$ -Phagentests wurden den Untersuchungsdaten des Labors bei Aufnahme in die Stammsammlung entnommen.

Stamm-Nr.	Stamm	Herkunft	Bemerkung	labor-eigener $\gamma$ -Phagen-test	Hämo-lyse
B1	<i>B. subtilis</i>	BGA 19, Maier	lt. API 55% <i>B. licheniformis</i>	- (*)	+
B2	<i>B. megaterium</i>	Lausanne, LA 265	lt. API 37% <i>B. subtilis</i>	- (*)	+
B3	<i>B. cereus</i>	Münster		- (*)	+
B4	<i>B. globigii</i>	Münster	nicht 100% nach API	- (*)	+
B6	<i>B. subtilis</i>	BGA 20, Maier	nicht 100% nach API	- (*)	+
B7	<i>B. subtilis</i>	BGA 21, Maier		- (*)	+
B8	<i>B. thuringiensis</i>	Krieg, H7 BT 7/72	nicht 100% nach API	- (*)	+
B10	<i>B. cereus</i>	Bern 1		+/-	+
B12	<i>B. subtilis</i>	Gießen		- (*)	+
B13	<i>B. subtilis</i>	Gießen (Maier), ATCC 6633		- (*)	+
B14	<i>B. subtilis</i>	11265 B	lt. API 97% <i>B. megaterium</i>	- (*)	+
B16	<i>B. cereus</i>	Bern, W 447 II		+	+
B17	<i>B. megaterium</i>	M. Hohenheim	lt. API 99,9% <i>B. pumilus</i>	- (*)	+
B19	<i>B. subtilis</i>	M. Hohenheim		- (*)	+
B20	<i>B. subtilis</i>	FRB		- (*)	+
B21	<i>B. ssp.</i> nicht definiert	Hähnchen, 1976		- (*)	+
B22	<i>B. ssp.</i> nicht definiert	Stickstoff, 1976		-	+
B23	<i>B. cereus</i>	Gießen G9, ATCC 9634=ATCC 11778		- (*)	+
B28	<i>B. subtilis</i>	Gießen, BGA G 570	nicht 100% nach API	- (*)	+
B29	<i>B. megaterium</i>	ATCC 14581		- (*)	+
B30	<i>B. firmus</i>	ATCC 14575		- (*)	+
B31	<i>B. pumilus</i>	Lausanne, LA 2462		- (*)	+
B32	<i>B. subtilis</i>	Lausanne, LA 268		- (*)	+
B33	<i>B. cereus</i>	Lausanne, LA 925		- (*)	+
B35	<i>B. lentus</i>	Brü. N.n, CCM 35	nicht 100% nach API	-	-
B36	<i>B. licheniformis</i>	Brü. N.n, CCM 2181, ATCC 10716		- (*)	+
B39	<i>B. panthothenicus</i>	Brü. N.n, CCM 2049, ATCC 14576	Typstamm	-	-
B40	<i>B. laterosporus</i>	Brü. N.n, CCM 831, ATCC 6456		-	-
B41	<i>B. macerans</i>	Brü. N.n, CCM 2012, ATCC 8244	nicht 100% nach API	- (*)	+
B42	<i>B. sphaericus</i>	Brü. N.n, CCM 1087, ATCC 10208		- (*)	+

Fortsetzung der Tab. 17 auf der nächsten Seite



Fortsetzung der Tab. 17

Stamm-Nr.	Stamm	Herkunft	Bemerkung	labor-eigener $\gamma$ -Phagen-test	Hämo-lyse
B43	<i>B. alvei</i>	Prag, CCEB 1588	lt. API 99,8% <i>B. pumilus</i>	-	-
B44	<i>B.adius</i>	Prag, CCEB 623	nicht 100% nach API	- (*)	+
B46	<i>B. circulans</i>	Prag, CCEB 626		- (*)	+
B47	<i>B. coagulans</i>	Prag, CCEB 631	nicht 100% nach API	- (*)	+
B48	<i>B. firmus</i>	Prag, CCEB 627		- (*)	+
B61	<i>B. subtilis</i>	Difco 0453		- (*)	+
B62	<i>B. licheniformis</i>	Bern 4		- (*)	+
B65	<i>B. sphaericus</i>	Brü. N.n, CCM 2120, ATCC 14577		-	+
B66	<i>B. lentus</i>	Brü. N.n, CCM 2214, ATCC 10840	Typstamm	- (*)	+
B67	<i>B. circulans</i>	Brü. N.n, CCM 1084, ATCC 9966	lt. API 75% <i>B. laterosporus</i>	- (*)	+
B68	<i>B. globigii</i>	Brü. N.n, CCM 110	nicht 100% nach API	- (*)	+
B69	<i>B. cereus</i>	Brü. N.n, CCM 2010, ATCC 14579		- (*)	+
B70	<i>B. firmus</i>	Brü. N.n, CCM 2212, ATCC 8247		- (*)	+
B72	<i>B. licheniformis</i>	Brü. N.n, CCM 864		- (*)	+
B74	<i>B. cereus</i>	Brü. N.n, CCM 88		-	+
B75	<i>B. alvei</i>	Brü. N.n, CCM 2051, ATCC 6344	Typstamm	- (*)	+
B77	<i>B. licheniformis</i>	Brü. N.n, CCM 2145, ATCC 14580		- (*)	+
B78	<i>B. laterosporus</i>	Brü. N.n, CCM 1612, ATCC 9141		-	-
B84	<i>B. pasteurii</i>	Brü. N.n, CCM 2056, ATCC 11859	Typstamm	-	+
B88	<i>B. firmus</i>	Brü. N.n, CCM 37		- (*)	+
B90	<i>B. alvei</i>	Brü. N.n, CCM 203	lt. API 89,6% <i>B. megaterium</i>	- (*)	+
B91	<i>B. pumilus</i>	Brü. N.n, CCM 340		- (*)	+
B92	<i>B. sphaericus</i>	Brü. N.n, CCM 436		- (*)	+
B93	<i>B. subtilis</i>	Brü. N.n, CCM 878		- (*)	+
B95	<i>B. coagulans</i>	Brü. N.n, CCM 1082, ATCC 10545	lt. API 99,8% <i>B. pumilus</i>	- (*)	+
B98	<i>B. laterosporus</i>	Brü. N.n, CCM 2116, ATCC 64	Typstamm	-	-
B103	<i>B. mycoides</i>	Leistner B 39	nicht 100% nach API	-	+
B104	<i>B. pantothenicus</i>	Leistner B 29	nicht 100% nach API	-	+
B105	<i>B. pantothenicus</i>	Leistner B 38	nicht 100% nach API	- (*)	+
B106	<i>B.adius</i>	Leistner B 45, L 37	nicht 100% nach API	- (*)	+
B107	<i>B.adius</i>	Leistner B 46, L 55	nicht 100% nach API	- (*)	+
B108	<i>B. cereus</i>	Leistner B 10, NRS 272		-	+
B109	<i>B. cereus</i>	Leistner B 50, CB 1V		-	+
B110	<i>B. cereus</i>	Leistner B 51, CB 2V		-	+
B112	<i>B. coagulans</i>	Leistner B 11/37		- (*)	+

Fortsetzung der Tab. 17 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 17

Stamm-Nr.	Stamm	Herkunft	Bemerkung	labor-eigener $\gamma$ -Phagen-test	Hämo-lyse
B114	<i>B. coagulans</i>	Leistner B 42/11	lt. API 99,6% <i>B. licheniformis</i>	- (*)	+
B115	<i>B. licheniformis</i>	Leistner B 15/1, 1976	schleimige Kolonien	-	+
B116	<i>B. licheniformis</i>	Leistner B 25/2		- (*)	+
B117	<i>B. licheniformis</i>	Leistner B 33/6		- (*)	+
B118	<i>B. licheniformis</i>	Leistner B 48 CB 7		- (*)	+
B119	<i>B. licheniformis</i>	Leistner B 49 CB 10		- (*)	+
B120	<i>B. megaterium</i>	Leistner B 31 XIII/I/6		- (*)	+
B124	<i>B. mycoides</i>	Leistner B 40 Ha 21(2)	schleimige Kolonien	-	+
B125	<i>B. pantothenicus</i>	Leistner B 30/10		-	+
B128	<i>B. polymyxa</i>	Leistner B 53 W 4		-	-
B129	<i>B. subtilis glaxo</i>	Leistner B 3 CN/841		- (*)	+
B130	<i>B. subtilis glaxo</i>	Leistner B 13 NRS 231		- (*)	-
B146	<i>B. cereus</i>	keine Angaben		+	+
B147	<i>B. cereus</i>	NCTC 8035, Dr. Phillips, UK		- (*)	+
B148	<i>B. cereus</i>	NCTC 10320, Dr. Phillips, UK		- (*)	+
B156	<i>B. subtilis</i>	DSM 1087		- (*)	+
B157	<i>B. subtilis</i>	DSM 618 (BGA=AB-Test)		- (*)	+
B158	<i>B. subtilis</i>	DSMIO, ATCC 6051	Typstamm	- (*)	-
B159	<i>B. subtilis (amylolique)</i>	ATCC 23350, DSM 7		- (*)	+
B160	<i>B. pumilus</i>	ATCC 27142, DSM 492		- (*)	+
B161	<i>B. pumilus</i>	ATCC 72, DSM 355		-	+
B162	<i>B. pumilus</i>	ATCC 14884, DSM 361		- (*)	+
B165	<i>B. pumilus</i>	ATCC 7061, DSM27	Typstamm	- (*)	+
B169	<i>B. cereus</i>	ATCC 10702, DSM 487		- (*)	+
B170	<i>B. cereus</i>	ATCC 11778, DSM 345		-	+
B172	<i>B. megaterium</i>	ATCC 10778, DSM 509		- (*)	+
B175	<i>B. megaterium</i>	DSM 333		- (*)	-
B177	<i>B. licheniformis</i>	ATCC 10716, DSM 603		- (*)	+
B178	<i>B. licheniformis</i>	ATCC 14580, DSM 13	Typstamm	- (*)	+
B181	<i>B. cereus</i>	DSM 31	Typstamm	- (*)	+
B185	<i>B. cereus</i>	DSM 487, ATCC 10702		- (*)	+
B186	<i>B. cereus</i>	DSM 508		-	+
B187	<i>B. cereus</i>	DSM 626		-	+
B188	<i>B. thuringiensis</i>	DSM 2046	Typstamm, nicht 100% nach API	- (*)	+
B190	<i>B. cereus</i>	DSM 2299		-	-
B192	<i>B. cereus</i>	DSM 2302	Enterotoxin	- (*)	+
B194	<i>B. cereus</i>	BO 365	emet. Toxin, S1, Plasmid	- (*)	+
B195	<i>B. cereus</i>	BO 366	emet. Toxin, S1, Plasmid	- (*)	+
B196	<i>B. cereus</i>	BO 368	emet. Toxin, S1, Plasmid	- (*)	+

Fortsetzung der Tab. 17 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 17

Stamm-Nr.	Stamm	Herkunft	Bemerkung	labor-eigener $\gamma$ -Phagen-test	Hämo-lyse
B197	<i>B. cereus</i>	BO 372	emet. Toxin, S1, Plasmid	+/-	+
B198	<i>B. cereus</i>	BO 488	Diarrhoe-Toxin, S2	-	+
B199	<i>B. cereus</i>	BO 490	Enterotoxin	-	+
B200	<i>B. cereus</i>	BO 493	emet. Toxin, S1	- (*)	+
B206	<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	03/1975 NCTC 2603		-	+
B207	<i>B. sphaericus</i>	03/1975 NCTC 2608		- (*)	+
B210	<i>B. alvei</i>	03/1975 NCTC 3349	Kolonien streuen	-	-
B216	<i>B. circulans</i>	03/1975 NCTC 5846		- (*)	+
B217	<i>B. sphaericus</i>	03/1975 NCTC 5896		- (*)	+
B221	<i>B. brevis</i>	03/1975 NCTC 7577		-	-
B222	<i>B. circulans</i>	03/1975 NCTC 7578		- (*)	+
B223	<i>B. sphaericus</i>	03/1975 NCTC 7582		- (*)	+
B224	<i>B. sphaericus</i>	03/1975 NCTC 7585		- (*)	+
B227	<i>B. sphaericus</i>	03/1975 NCTC 9602		-	-
B229	<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	03/1975 NCTC 9680		- (*)	+
B230	<i>B. sphaericus</i>	03/1975 NCTC 10338		- (*)	+
B232	<i>B. cereus</i>	06/1993 DSM LU 6941		- (*)	+
B233	<i>B. cereus</i>	07/1993 DSM 318		-	+
B234	<i>B. cereus</i>	07/1993 DSM 336		-	+
B235	<i>B. cereus</i>	07/1993 DSM 351		-	+
B237	<i>B. cereus</i>	07/1993 DSM 3101		- (*)	+
B238	<i>B. cereus</i>	07/1993 DSM 4218	Pellet goldgelb	+/-	+
B239	<i>B. cereus</i>	DSM 428	Enterotoxin	- (*)	+
B241	<i>B. cereus</i>	DSM 612	Plasmid	- (*)	+
B242	<i>B. cereus</i>	DSM 679		-	+
B243	<i>B. cereus</i>	DSM 689	Plasmide	-	+
B244	<i>B. cereus</i>	B-14721 Nakamura, ATCC 33019	Enterotoxin	- (*)	+
B245	<i>B. cereus</i>	B-14720 Nakamura, ATCC 33018	Enterotoxin	-	+
B247	<i>B. cereus</i>	DSM1274, BKM B-365, NRS 404	<i>B. anthracoides</i> , klinisch pathogen	- (*)	+
B248	<i>B. cereus</i>	DSM 8438		-	+
B249	<i>B. cereus</i>	CCM 99		- (*)	+
B250	<i>B. cereus</i>	CCM 2543	Enterotoxin	- (*)	+
B252	<i>B. cereus</i>	BGA Bc 85		-	+
B253	<i>B. cereus</i>	BGA Bc 86	Plasmide	-	+
B254	<i>B. cereus</i>	BGA Bc 102		-	+
B255	<i>B. cereus</i>	BGA Bc 106	Plasmide	- (*)	+
B256	<i>B. cereus</i>	BGA Bc 107	Plasmid	-	+
B257	<i>B. cereus</i>	BGA EI 1		- (*)	+
B258	<i>B. cereus</i>	BGA EI 2		- (*)	+
B259	<i>B. cereus</i>	BGA EI 3		- (*)	+
B260	<i>B. cereus</i>	BGA EI 4		-	+
B261	<i>B. cereus</i>	BGA EI 5		- (*)	+
B262	<i>B. cereus</i>	BGA EI 6	Plasmid	- (*)	+

Fortsetzung der Tab. 17 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 17

Stamm-Nr.	Stamm	Herkunft	Bemerkung	labor-eigener $\gamma$ -Phagen-test	Hämo-lyse
B264	<i>B. cereus</i>	NCTC 9945, ATCC 10876a		- (*)	+
B265	<i>B. cereus</i>	NCTC 6474		-	+
B267	<i>B. cereus</i>	NCTC 9939		- (*)	+
B268	<i>B. cereus</i>	NCTC 10989		- (*)	+
B269	<i>B. cereus</i>	NCTC 11143 v. Gilbert, PHLS-Colindale	emet. Toxin, S1	- (*)	+
B270	<i>B. cereus</i>	NCTC 7464, ATCC10876, NRS1256		- (*)	+
B271	<i>B. cereus</i>	NCTC 9946, ATCC13061		- (*)	+
B272	<i>B. cereus</i>	BGA Bc 6 aus Staphenor		- (*)	+
B273	<i>B. cereus</i>	BGA Bc 12 aus Staphenor		- (*)	+
B274	<i>B. cereus</i>	BGA Bc 81	Plasmide	- (*)	+
B275	<i>B. cereus</i>	DSM ID 92-340	Plasmide	- (*)	+
B277	<i>B. cereus</i>	DSM ID 92-477	Plasmide	- (*)	+
B278	<i>B. cereus</i>	keine Angaben		- (*)	+
B282	<i>B. cereus</i>	keine Angaben		-	+
B284	<i>B. cereus</i>	NCIMB 8079, ATCC 7004	<i>B. cereus albolactis</i> , Plasmide	- (*)	+
B289	<i>B. cereus</i>	NCIMB 11925, ATCC 9139	Plasmid	-	+
B292	<i>B. cereus</i>	B 0031	lt. API evtl. <i>B. firmus</i>	-	+
B293	<i>B. cereus</i>	B 0038		- (*)	+
B294	<i>B. cereus</i>	B 0358	emet. Toxin, S1	- (*)	+
B295	<i>B. cereus</i>	B 0362	emet. Toxin, S1	- (*)	+
B296	<i>B. cereus</i>	B 0363	emet. Toxin, S1	- (*)	+
B297	<i>B. cereus</i>	B 0364	emet. Toxin, S1	- (*)	+
B298	<i>B. cereus</i>	B 0367	emet. Toxin, S1, Plasmide	- (*)	+
B299	<i>B. cereus</i>	B 0368	emet. Toxin, S1, Plasmide	- (*)	+
B300	<i>B. cereus</i>	B 0369	emet. Toxin, S1, Plasmid	- (*)	+
B301	<i>B. spp.</i> nicht definiert	keine Angaben		- (*)	+
B302	<i>B. cereus</i>	B 0371	emet. Toxin, S1, Plasmid	- (*)	+
B303	<i>B. cereus</i>	B 0374	emet. Toxin, S1, Plasmid	- (*)	+
B304	<i>B. cereus</i>	B 0375	Enterotoxin, S3, Plasmid	- (*)	+
B305	<i>B. cereus</i>	B 0376	Enterotoxin, S3, Plasmid	- (*)	+
B306	<i>B. cereus</i>	B 0377	S12	- (*)	+
B307	<i>B. ssp.</i> nicht definiert	keine Angaben		- (*)	+
B308	<i>B. cereus</i>	B 0379	S3	- (*)	+
B309	<i>B. cereus</i>	B 0380, aus Mastitis-Milch	S5	-	-
B310	<i>B. cereus</i>	B 0381	S5	- (*)	+
B311	<i>B. cereus</i>	B 0382	S5	- (*)	+
B313	<i>B. ssp.</i> nicht definiert	keine Angaben	S8	- (*)	+

Fortsetzung der Tab. 17 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 17

Stamm-Nr.	Stamm	Herkunft	Bemerkung	labor-eigener $\gamma$ -Phagen-test	Hämo-lyse
B314	<i>B. ssp.</i> nicht definiert	keine Angaben		-	+
B316	<i>B. cereus</i>	keine Angaben	S18	- (*)	+
B318	<i>B. ssp.</i> nicht definiert	keine Angaben		- (*)	+
B319	<i>B. ssp.</i> nicht definiert	keine Angaben		- (*)	+
B321	<i>B. ssp.</i> nicht definiert	keine Angaben		- (*)	+
B324	<i>B. ssp.</i> nicht definiert	keine Angaben		- (*)	+
B329	<i>B. cereus</i>	F 4810/72 von Kolsto		- (*)	+
B331	<i>B. cereus</i>	ATCC 6464 von Kolsto		- (*)	+
B332	<i>B. cereus</i>	Bodenproben-Isolate		-	-
B333	<i>B. megaterium</i>	Bodenproben-Isolate		-	-
B334	<i>B. ssp.</i> nicht definiert	Bodenproben-Isolate		-	-
B335	<i>B. mycoides</i>	Bodenproben-Isolate		-	-
B336	<i>B. brevis</i>	Bodenproben-Isolate		-	-
B338	<i>B. cereus</i>	ATCC4342		+	+
B339	<i>B. megaterium</i>	Bodenproben-Isolate-Zimbabwe		- (*)	+
B340	<i>B. coagulans</i>	Bodenproben-Isolate-Zimbabwe		-	+

### 9.3 Verwendete Vektorplasmide

In Abb. 47 sind die Vektorenkarten der Expressionsvektoren dargestellt, die für die Durchführung des osmotischen Schocktests verwendet wurden. Der Expressionsvektor pBAD/gIII A besitzt nicht die mit Stern markierten Restriktionsstellen *NheI* und *NotI*. Der Vektor pBAD/gIII/Calmodulin wurde als Positivkontrolle verwendet.

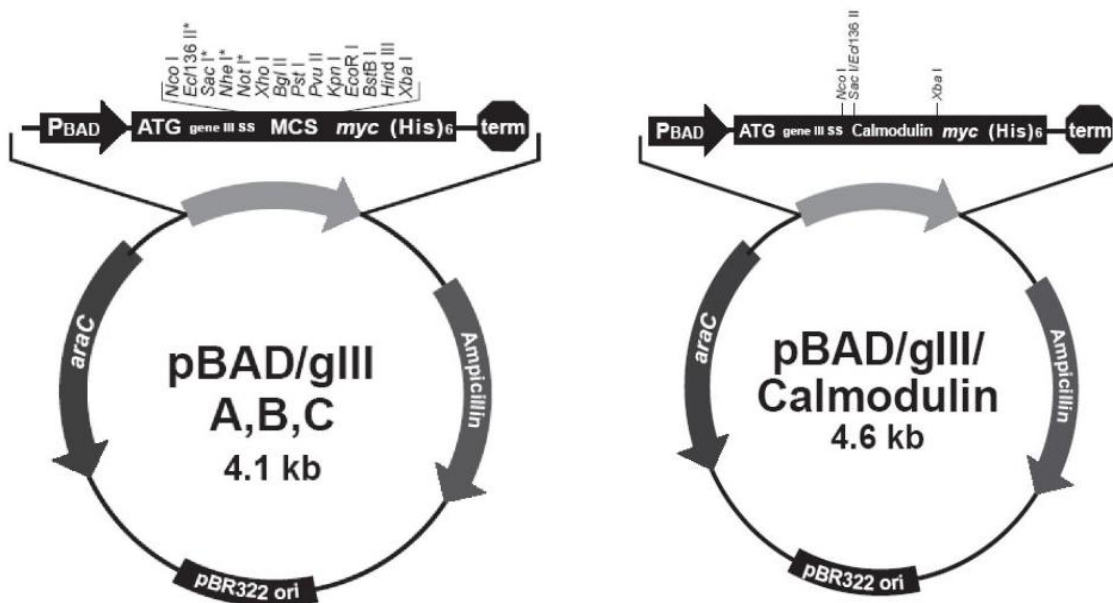


Abb. 47: Vektorenkarten der Expressionsvektoren für die Durchführung des osmotischen Schocktests ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))

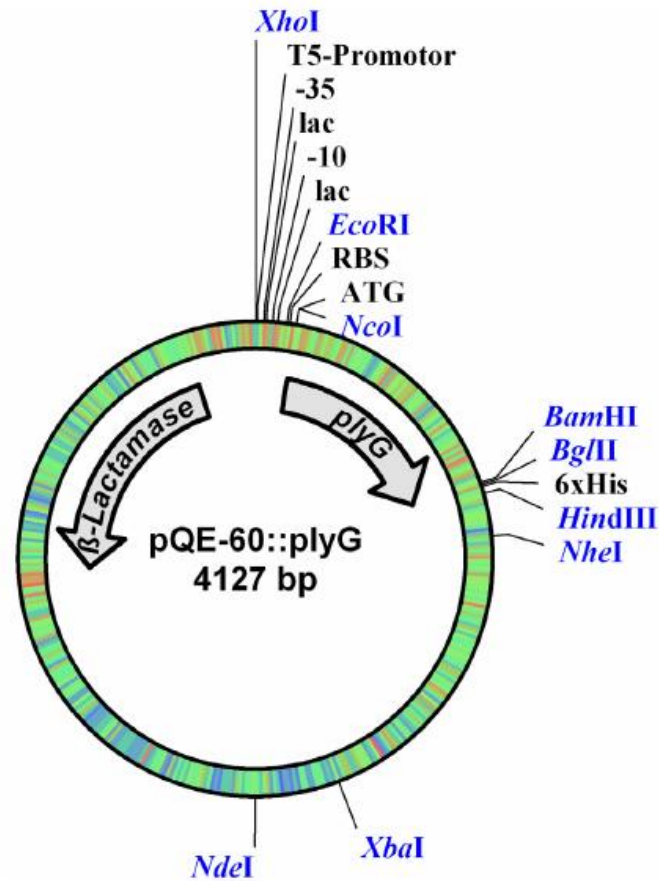


Abb. 48: Vektorenkarte des Expressionsvektors pQE60plyg (LEMNITZER, 2005)

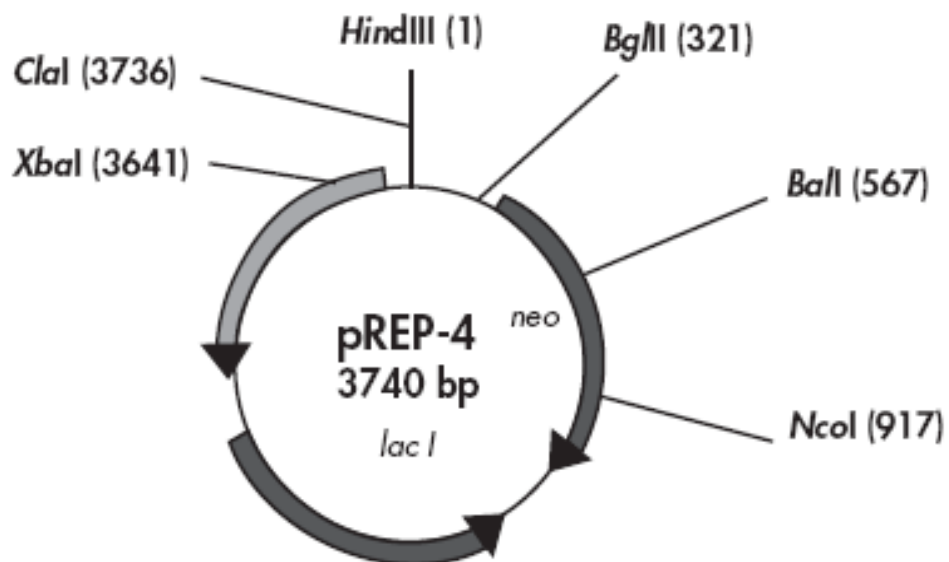


Abb. 49: Restriktionskarte des Repressorplasmids pREP-4 (Quelle: Qiagen, 2003)

## 9.4 Ermittelte Sequenz für das Plasmid pQE60plyG

Angabe der in der Diplomarbeit von LEMNITZER (2005) ermittelten Sequenz des Plasmids pQE60plyG. Dieses wurde als Grundlage für die vorliegende Arbeit angewendet.

```

XhoI
~~~~~
1  CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT
   GAGCTCTTTA GTATTTTTTA AATAAACGAA ACACTCGCCT ATTGTTAATA
                                     EcoRI
                                     ~~~~~
51  AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG
   TTATCTAAGT TAACACTCGC CTATTGTAA  AGTGTGTCTT AAGTAATTTT
                                     NcoI
                                     ~~~~~
                                     MetGlu IleGlnLysLys LeuValAsp ProSerLys
101 AGGAGAAATT AACCATGGAA ATCCAAAAAA AATTAGTTGA TCCAAGTAAG
   TCCTCTTTAA TTGGTACCTT TAGGTTTTTT TTAATCAACT AGGTTTCATC
   TyrGlyThrLys CysProTyr ThrMetLys ProLysTyrIle ThrValHis ·
151 TATGGTACAA AGTGTCCGTA TACAATGAAG CCTAAATATA TCACTGTTCA
   ATACCATGTT TCACAGGCAT ATGTTACTTC GGATTTATAT AGTGACAAGT
   ·AsnThrTyr AsnAspAlaPro AlaGluAsn GluValSer TyrMetIleSer ·
201 CAACACATAT AATGATGCTC CAGCTGAAAA TGAAGTGAGT TACATGATTA
   GTTGTGTATA TTACTACGAG GTCGACTTTT ACTTCACTCA ATGTACTAAT
   ·SAsnAsnAsn GluValSer PheHisIleAla ValAspAsp LysLysAla
251 GTAACAATAA TGAGGTGTCG TTTCATATTG CAGTAGATGA CAAGAAAGCG
   CATTGTTATT ACTCCACAGC AAAGTATAAC GTCATCTACT GTTCTTTTCG
   IleGlnGlyIle ProLeuGlu ArgAsnAla TrpAlaCysGly AspGlyAsn ·
301 ATTCAAGGTA TTCCGTTGGA ACGTAATGCA TGGGCTTGCG GAGACGGCAA
   TAAGTTCCAT AAGGCAACCT TGCATTACGT ACCCGAACGC CTCTGCCGTT
   ·GlySerGly AsnArgGlnSer IleSerVal GluIleCys TyrSerLysSer ·
351 TGGTTCGGGG AATCGTCAAT CCATTTCTGT AGAAATCTGT TATTCAAAAT
   ACCAAGCCCC TTAGCAGTTA GGTAAAGACA TCTTTAGACA ATAAGTTTTA
   ·SGlyGlyAsp ArgTyrTyr LysAlaGluAsp AsnAlaVal AspValVal
401 CAGGAGGAGA TAGATACTAT AAAGCTGAGG ATAATGCTGT TGATGTTGTA
   GTCCCTCTCT ATCTATGATA TTTTCGACTCC TATTACGACA ACTACAACAT
   ArgGlnLeuMet SerMetTyr AsnIlePro IleGluAsnVal ArgThrHis ·
451 CGACAACCTA TGTCATGTA CAATATTCCG ATTGAAAATG TTCGAACTCA
   GCTGTTGAAT ACAGATACAT GTTATAAGGC TAACTTTTAC AAGCTTGAGT
   ·GlnSerTrp SerGlyLysTyr CysProHis ArgMetLeu AlaGluGlyArg ·
501 TCAATCCTGG TCAGGTAAAT ATTGTCCGCA TAGAATGTTA GCTGAGGGAA
   AGTTAGGACC AGTCCATTTA TAACAGGCGT ATCTTACAAT CGACTCCCTT
   ·ATrpGlyAla PheIleGln LysValLysAsn GlyAsnVal AlaThrThr
551 GGTGGGGAGC ATTCATTCAG AAGGTTAAGA ATGGGAATGT GGCGACTACT
   CCACCCCTCG TAAGTAAGTC TTCCAATTCT TACCCTTACA CCGCTGATGA
   SerProThrLys GlnAsnIle IleGlnSer GlyAlaPheSer ProTyrGlu ·
601 TCACCAACAA AACAAAACAT CATCCAATCA GGGGCTTTCT CACCGTATGA
   AGTGGTTGTT TTGTTTTGTA GTAGGTTAGT CCCCAGAAAGT GTGGCATACT
   ·ThrProAsp ValMetGlyAla LeuThrSer LeuLysMet ThrAlaAspPhe ·
651 AACCCCTGAT GTTATGGGAG CATTAACGTC ACTTAAAATG ACAGCTGATT
   TTGGGGACTA CAATACCCCT GTAATTGCAG TGAATTTTAC TGTCGACTAA
   ·PileLeuGln SerAspGly LeuThrTyrPhe IleSerLys ProThrSer
701 TTATCTTACA ATCGGATGGA TTAACCTATT TTATTTCCAA ACCGACTTCA
   AATAGAATGT TAGCCTACCT AATTGAATAA AATAAAGGTT TGGCTGAAGT
   AspAlaGlnLeu LysAlaMet LysGluTyr LeuAspArgLys GlyTrpTrp ·
751 GATGCACAAC TAAAAGCAAT GAAAGAATAC CTTGACCGTA AAGGTTGGTG

```



CTACGTGTTG ATTTTCGTTA CTTTCTTATG GAACTGGCAT TTCCAACCAC  
 BglII  
 ~~~~~~  
 BamHI  
 ~~~~~~  
 HindIII  
 ~~~~

·TyrGluVal Lys\*\*\*

801 GTATGAAGTT AAATAAGGAT CCAGATCTCA TCACCATCAC CATCACTAAG  
 CATACTTCAA TTTATTCCTA GGTCTAGAGT AGTGGTAGTG GTAGTGATTG  
 HindIII  
 ~~~~

851 CTTAATTAGC TGAGCTTGGG CTCCTGTTGA TAGATCCAGT AATGACCTCA  
 GAATTAATCG ACTCGAACCT GAGGACAACCT ATCTAGGTCA TTAGTGGAGT

901 GAACTCCATC TGGATTTGTT CAGAACGCTC GGTGCGCGCC GGGCGTTTTT  
 CTTGAGGTAG ACCTAAACAA GTCTTGCGAG CCAACGGCGG CCCGCAAAAA

NheI  
 ~~~~~~

951 TATTGGTGAG AATCCAAGCT AGCTTGGCGA GATTTTCAGG AGCTAAGGAA  
 ATAACCACTC TTAGGTTCGA TCGAACCGCT CTAAAAGTCC TCGATTCCCTT

1001 GCTAAAATGG AGAAAAAAAA CACTGGATAT ACCACCGTTG ATATATCCCA  
 CGATTTTACC TCTTTTTTTA GTGACCTATA TGGTGGCAAC TATATAGGGT

1051 ATGGCATCGT AAAGAACATT TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA  
 TACCGTAGCA TTTCTTGTA AACTCCGTAA AGTCAGTCAA CGAGTTACAT

1101 CCTATAACCA GACCGTTCAG CTGGATATTA CGGCCTTTTT AAAGACCGTA  
 GGATATTGGT CTGGCAAGTC GACCTATAAT GCCGAAAAA TTTCTGGCAT

1151 AAGAAAAATA AGCACAAGTT TTATCCGGCC TTTATTCACA TTCTGCCCCG  
 TTCTTTTTAT TCGTGTTCAA AATAGGCCGG AAATAAGTGT AAGAACGGGC

1201 CCTGATGAAT GCTCATCCGG AATTTCTGAT GGCAATGAAA GACGGTGAGC  
 GGACTACTTA CGAGTAGGCC TTAAAGCATA CCGTTACTTT CTGCCACTCG

1251 TGGTGATATG GGATAGTGTT CACCCTTGTT ACACCGTTTT CCATGAGCAA  
 ACCACTATAC CCTATCACAA GTGGGAACAA TGTGGCAAAA GGTACTCGTT

1301 ACTGAAACGT TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACCACGACG ATTTCCGGCA  
 TGACTTTGCA AAAGTAGCGA GACCTCACTT ATGGTGCTGC TAAAGGCCGT

1351 GTTCTACAC ATATATTCGC AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAAACCTGG  
 CAAAGATGTG TATATAAGCG TTCTACACCG CACAATGCCA CTTTTGGACC

1401 CCTATTTCCC TAAAGGGTTT ATTGAGAATA TGTTTTTCGT CTCAGCCAAT  
 GGATAAAGGG ATTTCCCAA TAACTCTTAT ACAAAAAGCA GAGTCGGTTA

1451 CCCTGGGTGA GTTTCACCAG TTTTGATTTA AACGTGGCCA ATATGGACAA  
 GGGACCCACT CAAAGTGGTC AAAACTAAAT TTGCACCGGT TATACCTGTT

1501 CTTCTTCGCC CCCGTTTTCA CCATGCATGG GCAAATATTA TACGCAAGGC  
 GAAGAAGCGG GGGCAAAAGT GGTACGTACC CGTTTATAAT ATGCGTTCAG

1551 GACAAGGTGC TGATGCCGCT GCGGATTCAG GTTCATCATG CCGTCTGTGA  
 CTGTTCCACG ACTACGGCGA CCGCTAAGTC CAAGTAGTAC GGCAGACACT

1601 TGGCTTCCAT GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG TACTGCGATG  
 ACCGAAGGTA CAGCCGTCTT ACGAATTACT TAATGTTGTC ATGACGCTAC

1651 AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA TTTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA  
 TCACCGTCCC GCCCCGCATT AAAAAAATTC CGTCAATAAC CACGGGAATT

1701 ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG GCATCAAATA AAACGAAAGG  
 TGCGGACCCC ATTACTGAGA GATCGAACTC CGTAGTTTAT TTTGCTTTCC

1751 CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTTCGTTTTA TCTGTTGTTT GTCGGTGAAC  
 GAGTCAGCTT TCTGACCCGG AAAGCAAAT AGACAACAA CAGCCACTTG

XbaI  
 ~~~~~~

1801 GCTCTCCTGA GTAGGACAAA TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT  
 CGAGAGGACT CATCCTGTTT AGGCGGCGAG ATCTCGACGG AGCGCGCAA

1851 CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA  
 GCCACTACTG CCACTTTTGG AACTGTGTA CGTCGAGGGC CTCTGCCAGT

1901 CAGCTTGCTT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG  
 GTCGAACAGA CATTCGCCCTA CGGCCCTCGT CTGTTCCGGG AGTCCCAGCG

1951 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG  
 AGTCGCCCAC AACCGCCCAC AGCCCCCGGT CCGTACTGGG TCAGTGCATC

2001 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT CGGGCATCAG AGCAGATTGT  
 GCTATCGCCT CACATATGAC CGAATTGATA CGCCGTAGTC TCGTCTAACA

NdeI

~~~~~

2051 ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TGCGTAAGGA  
 TGA CTCTCAC GTGGTATACG CCACACTTTA TGGCGTGTCT ACGCATTTCCT

2101 GAAAAATACCG CATCAGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTCTCGCTG  
 CTTTTATGGC GTAGTCCGCG AGAAGGCGAA GGAGCGAGTG ACTGAGCGAC

2151 CGCTCGGTCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT  
 GCGAGCCAGC AAGCCGACGC CGCTCGCCAT AGTCGAGTGA GTTTCGCCA

2201 AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG  
 TTATGCCAAT AGGTGTCTTA GTCCCTATT CCGTCCTTTC TTGTACACTC

2251 CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG  
 GTTTTCCGGT CGTTTTCCGG TCCTTGGCAT TTTTCCGGCG CAACGACCGC

2301 TTTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC  
 AAAAAAGGTAT CCGAGGCGGG GGGACTGCTC GTAGTGT TTT TAGCTGCGAG

2351 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC  
 TTCAGTCTCC ACCGCTTTGG GCTGTCTCTGA TATTTCTATG GTCCGCAAAG

2401 CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCTT GCCGCTTACC  
 GGGGACCTTC GAGGGAGCAC GCGAGAGGAC AAGGCTGGGA CGGCGAATGG

2451 GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCATAG  
 CCTATGGACA GGCGGAAAGA GGAAGCCCT TCGCACCGCG AAAGAGTATC

2501 CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTTCG TCCAAGCTGG  
 GAGTGCACACA TCCATAGAGT CAAGCCACAT CCAGCAAGCG AGGTTTCGACC

2551 GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT  
 CGACACACGT GCTTGGGGGG CAAGTCGGGC TGGCGACCGG GAATAGGCCA

2601 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC  
 TTGATAGCAG AACTCAGGTT GGGCCATTCT GTGCTGAATA GCGGTGACCG

2651 AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTGCTA  
 TCGTCTGTTGA CCATTGTCTT AATCGTCTCG TCCATACAT CCGGACGAT

2701 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA  
 GTCTCAAGAA CTTCACCACC GGATTGATGC CGATGTGATC TTCCTGTCAT

2751 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG  
 AAACCATAGA CGCGAGACGA CTTCCGGTCAA TGGAAGCCTT TTTCTCAACC

2801 TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG  
 ATCGAGA ACT AGGCCGTTTG TTTGGTGGCG ACCATCGCCA CCAAAAAAAC

2851 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT  
 AAACGTTTCGT CGTCTAATGC GCGTCTTTTT TTCTTAGAGT TCTTCTAGGA

2901 TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA  
 AACTAGAAAA GATGCCCCAG ACTGCGAGTC ACCTTGCTTT TGAGTGCAAT

2951 AGGGATTTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT  
 TCCCTAAAAAC CAGTACTCTA ATAGTTTTTT CTAGAAGTGG ATCTAGGAAA

3001 TAAATTA AAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT  
 ATTTAATTTT TACTTCAAAA TTTAGTTAGA TTTTATATAT ACTCATTTGA

3051 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT  
 ACCAGACTGT CAATGGTTAC GAATTAGTCA CTCCGTGGAT AGAGTCGTA

3101 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA  
 GACAGATAAA GCAAGTAGGT ATCAACGGAC TGAGGGGCGAG CACATCTATT

3151 CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG  
 GATGCTATGC CCTCCC GAAT GGTAGACCGG GGTCACGACG TTACTATGGC

3201 CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC  
 GCTCTGGGTG CGAGTGGCCG AGGTCTAAAT AGTCGTTATT TGGTCGGTCG

3251 CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC  
 GCCTTCCCGG CTCGCTCTT CACCAGGACG TTGAAATAGG CGGAGGTAGG

3301 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT  
 TCAGATAATT AACAACGGCC CTTTCGATCTC ATTCATCAAG CGGTCAATTA

3351 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACGCTC  
 TCAAACGCGT TGCAACAACG GTAACGATGT CCGTAGCACC ACAGTGCAG

3401 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG  
 CAGCAAACCA TACCGAAGTA AGTCGAGGCC AAGGGTTGCT AGTTCGCTC

3451 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGTCCT  
 AATGTACTAG GGGGTACAAC ACGTTTTTTT GCCAATCGAG GAAGCCAGGA

3501 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT  
 GGCTAGCAAC AGTCTTCATT CAACCGCGT CACAATAGTG AGTACCAATA

3551 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT  
 CCGTCTGAC GTATTAAGAG AATGACAGTA CCGTAGGCAT TCTACGAAAA

```
3601 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
GACACTGACC ACTCATGAGT TGGTTCAGTA AGACTCTTAT CACATACGCC
3651 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA
GCTGGCTCAA CGAGAACGGG CCGCAGTTAT GCCCTATTAT GGC GCGGTGT
3701 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTTG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
ATCGTCTTGA AATTTTCACG AGTAGTAACC TTTTGCAAGA AGCCCCGCTT
3751 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT
TTGAGAGTTC CTAGAATGGC GACAACTCTA GGTCAAGCTA CATTTGGTGA
3801 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
GCACGTGGGT TGA CTAGAAG TCGTAGAAAA TGAAAGTGGT CGCAAAGACC
3851 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
CACTCGTTTT TGTCCTTCCG TTTTACGGCG TTTTTTCCCT TATTCCCGCT
3901 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTC AATA TTATTGAAGC
GTGCCTTTAC AACTTATGAG TATGAGAAGG AAAAAGTTAT AATAACTTCG
3951 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA
TAAATAGTCC CAATAACAGA GTACTCGCCT ATGTATAAAC TTACATAAAT
4001 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC
CTTTTTATTT GTTTATCCCC AAGGCGCGTG TAAAGGGGCT TTTCACGGTG
4051 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATT AACCTA TAAAAATAGG
GACTGCAGAT TCTTTGGTAA TAATAGTACT GTAATTGGAT ATTTTTATCC
4101 CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTTCAC
GCATAGTGCT CCGGGAAAAGC AGA
```

Abb. 50: Vollständige Sequenz des Vektors pQE60plyG (LEMNITZER, 2005)

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank geht als erstes an Herrn PD Dr. W. Beyer, der durch intensive Betreuung, fachliche Diskussionen und Anregungen einen beträchtlich Teil zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Außerdem möchte ich ihm und Herrn Prof. Dr. R. Böhm vom Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim für die Bereitstellung des Themas, der Räumlichkeiten und der Arbeitsmaterialien danken.

Ich möchte ebenfalls ganz herzlich Frau Dr. Ulrike Hahn (PhD) für die fachliche, moralische und freundschaftliche Unterstützung danken, da sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Großer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Bauerfeind vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität Giessen, der sich bereit erklärt hat, diese Arbeit zu betreuen. Seine fachlichen Anregungen und sein Interesse sowie seine Unterstützung und Geduld vor allen auf dem Weg der Fertigstellung der Arbeit waren eine große Hilfe.

Für die tatkräftige Einarbeitung und angenehme Zusammenarbeit im Labor danke ich besonders Elisabeth Blaschke und Sabine Hoche. Außerdem danke ich den Diplomanden Frederik Lemnitzer und Philipp Lang und dem Mitarbeiter Michael Beller, die zum Entstehen einzelne Abschnitte dieser Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus geht mein Dank an alle übrigen Mitarbeiter, Doktoranden und Diplomanden des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene, die während der praktischen Arbeiten und auch danach dafür gesorgt haben, dass mir die Zeit in sehr guter Erinnerung bleibt.

Außerdem danke ich dem Bundesministerium der Verteidigung FüSan I 1 für die Finanzierung des Projektes, die diese Arbeit erst möglich gemacht hat.

Dankbar bin ich ebenso allen Freunden und Kollegen, die mich über die gesamte Zeit hinweg durch ständiges Nachfragen auch zur Fertigstellung der Arbeit angetrieben haben.

Zuletzt geht mein ganz besonderer Dank an meine Familie. Allen voran meinen Eltern Monika und Berthold Boll, die mein gesamtes Leben hinter mir gestanden und die Entscheidung für ein Studium unterstützt haben. Außerdem an meine Schwestern Bianca und Marion, bei denen ich ebenfalls immer Rückhalt gefunden habe. Ganz lieben Dank auch an Mario, der alle meine Stimmungsschwankungen ertragen hat und mich auch in den Durststrecken moralisch unterstützt hat. Ohne Euch wäre ich nicht da, wo ich heute bin!

## 11 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Kerstin Boll



*édition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

**ISBN: 978-3-8359-6025-1**



9 783835 196025 1