

**Differentielle Genregulation und Untersuchung des
Sekretoms von *Bacillus anthracis* und
Bacillus cereus biovar *anthracis***

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

M.Sc. Constanze Gummelt

Berlin, 2021

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2017 bis Juni 2021 im Zentrum für biologische Gefahren und spezielle Pathogene in der Abteilung für hochpathogene mikrobielle Erreger (ZBS 2) am Robert Koch-Institut in Berlin angefertigt. Die Betreuung erfolgte durch Frau Dr. Silke Klee, Herrn Prof. Dr. Roland Grunow und Herrn PD Dr. Holger Scholz.

Gutachter:

1. Herr PD Dr. Holger Scholz

Robert Koch-Institut Berlin

Zentrum für Biologische Sicherheit (ZBS 2): Hochpathogene mikrobielle Erreger

Seestr. 10, 13353 Berlin

2. Frau Prof. Dr. Haike Antelmann

Freie Universität Berlin

Institut für Biologie – Mikrobiologie

Königin-Luise-Str. 12-16, 14195 Berlin

3. Herr Prof. Dr. Mitja Remus-Emsermann

Freie Universität Berlin

Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie

Königin-Luise-Str. 12-16, 14195 Berlin

Disputation am: 18.01.2022

Meinen Eltern gewidmet

Tagungsbeiträge

C. Cox, S. Dietrich, H. Liesegang, A. Thürmer, S. Dupke, R. Grunow, S. R. Klee

RNA-sequencing for transcriptome comparison between *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* biovar *anthracis*. Posterpräsentation, Medical Biodefense Conference, München, Oktober 2018

C. Cox, S. Dietrich, H. Liesegang, A. Thürmer, S. Dupke, R. Grunow, S. R. Klee

RNA-sequencing for transcriptome comparison between *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* biovar *anthracis*. Posterpräsentation, Biology of Anthrax Conference, Bari, September 2019

S. R. Klee, C. Cox, S. Dupke, O. Drechsel, S. Dietrich, P. Goossens, C. Akoua-Koffi, E. Couacy-Hymann, F. H. Leendertz, R. Grunow¹

Bacillus cereus biovar *anthracis* – insights into virulence and gene regulation. Posterpräsentation, International Symposium on Zoonoses Research, Berlin, Oktober 2019

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mit ihrer fachlichen sowie persönlichen Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Holger Scholz für die Übernahme des Erstgutachtens und für die Betreuung in den letzten Monaten bis zur Fertigstellung der Dissertation bedanken. Die anregenden Diskussionen, zielorientierten Ideen und konstruktiven Lösungsvorschläge haben maßgeblich zur Vollendung der Arbeit beigesteuert.

Frau Prof. Dr. Haike Antelmann danke ich für die Bereitschaft, die Betreuung und Erstellung des Zweitgutachtens im Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Roland Grunow danke ich für die Möglichkeit, im ZBS 2 des Robert Koch-Institutes zu promovieren und für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die er als Fachbereichsleiter bis zu seinem Ausscheiden übernommen hatte. Für seine jederzeit offene Tür, die stets hilfreiche Diskussionsbereitschaft und die bereitwillige Unterstützung der Konferenzteilnahmen bin ich ihm sehr verbunden.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Andrea Thürmer und dem gesamten Team von MF 2 für den fachlichen Rat bei der Durchführung der RNA-Sequenzierung und für die Unterstützung im Labor bei der Erstellung der cDNA-Bibliotheken und deren Sequenzierung. Für die erfolgreiche Kooperation im Rahmen der bioinformatischen Analysen der Transkriptomdaten danke ich Herrn Dr. Torsten Semmler und allen voran Silver Wolf, der für alle Probleme und Fragen ein offenes Ohr hatte, geduldig jegliche Unklarheit erläutert und versucht hat, jeden Wunsch in die Tat bzw. in eine Graphik, Diagramm oder Tabelle umzusetzen. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Jörg Döllinger und Andy Schneider von ZBS 6 für die Unterstützung, Durchführung und den regen Austausch bei den massenspektrometrischen Messungen und Analysen bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Michael Laue und den Kollegen von ZBS 4 für die hervorragenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen und für die Quantifizierung der Sporulationsstadien.

Allen voran widme ich diese Danksagung Frau Dr. Silke Klee und dem kleinen, aber feinen „DFG-Anthrax“ Team. Liebe Silke, ich danke dir für die ausgezeichnete Betreuung, deine unerschöpfliche Geduld und deinen unermüdlichen Einsatz bei der Bewältigung von Fragen und Problemen jeglicher Art. Mit deiner unglaublichen Fachkompetenz und ausgezeichneten Anleitung trägst du den größten Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit. Danke auch für die vielen lustigen Momente neben dem stressigen Arbeitsalltag. Dein Engagement und deine Aufmerksamkeit, vor allem im zwischenmenschlichen Bereich, hat mir die Promotionszeit wesentlich erleichtert.

Aber wie wäre meine Doktorandenzeit bloß ohne meine liebste Bürokollegin verlaufen, in der ich eine gute Freundin gefunden habe. Liebe Susann, für die unzähligen schönen Augenblicke während des Arbeitens im Büro als auch im Labor bin ich dir mehr als dankbar. Dazu zählen auch die aufregenden, lehrreichen, mehr als spaßigen und unvergesslichen Dienstreisen mit dir und Silke, die mir einen neuen Blick auf die Welt eröffnet haben. Du hast mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden, mich an schlechten Tagen aufgemuntert und ermutigt. Danke für deine Hilfe, ohne dich wäre diese Zeit nur halb so schön gewesen.

Liebe Sabine, dir gilt ein ganz besonders großes Dankeschön! Du hast mir immer helfend zur Seite gestanden und nur deinem unermüdlichen Einsatz und deiner exzellenten technischen Unterstützung ist es zu verdanken, dass diese Arbeit zum jetzigen Zeitpunkt und in dieser Form fertiggestellt werden konnte. Ich danke dir, Silke und Susann für eure nie endende Motivation und Aufmunterung in schwierigen Zeiten, die mich so manches Mal haben verzweifeln lassen. Mit eurer Hilfe waren auch die stundenlangen und komplizierten Arbeiten im S3-Labor so viel erträglicher und eine leicht zu nehmende Hürde meiner Doktorarbeit.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen von ZBS 2 danke ich für eine angenehme und bunte Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und guten Ratschläge sowie die zahlreichen interessanten und nützlichen Gespräche.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich in vielen Entscheidungen inspiriert und mir während dieser spannenden aber auch nervenaufreibenden Zeit maßlose Geduld entgegengebracht hat.

Lieber Rick, du bist mein Fels in der Brandung und jeden einzelnen Tag an meiner Seite. Ich danke dir für alles!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Die <i>Bacillus cereus</i> – Gruppe.....	5
1.2 <i>Bacillus cereus</i>	6
1.3 <i>Bacillus anthracis</i>	6
1.3.1 Epidemiologie und Ökologie.....	7
1.3.2 Pathogenese und Klinik.....	8
1.3.3 Bakteriologie und Diagnostik.....	10
1.3.4 Virulenzfaktoren von <i>Bacillus anthracis</i>	11
1.3.4.1 Die Anthrax-Kapsel.....	11
1.3.4.2 Die Anthrax-Toxine.....	11
1.3.5 Regulation der Virulenzfaktoren.....	13
1.3.5.1 Der globale Regulator AtxA.....	14
1.3.5.2 Der pleiotrope Regulator PlcR.....	17
1.3.6 Bioterroristische Relevanz.....	18
1.4 <i>Bacillus cereus</i> biovar <i>anthracis</i>	19
1.4.1 Herkunft und Verbreitung der afrikanischen <i>Bacillus</i> -Isolate.....	19
1.4.2 Einordnung innerhalb der <i>B. cereus</i> -Gruppe und Taxonomie.....	21
1.4.3 Morphologische und molekulargenetische Charakterisierung.....	22
1.4.4 Virulenz und zweiter Kapseltyp.....	23
1.4.5 Das spezifische Antigen pXO2-60.....	24
1.5 Untypische pathogene Vertreter der <i>B. cereus</i> -Gruppe.....	24
1.6 Bakterielle Endosporen.....	25
1.7 Methoden zur Analyse der Genexpression.....	29
1.8 Zielstellung der Arbeit.....	31
2 Material und Methoden.....	32
2.1 Bakterienstämme.....	32

2.2	Chemikalien, Nährmedien und Wachstumsbedingungen	33
2.3	Enzyme und molekularbiologische Kits	36
2.4	Mikrobiologische Methoden	37
2.4.1	Stammhaltung	37
2.4.2	Sterilkontrollen.....	37
2.4.3	Wachstumskurven	37
2.4.4	Herstellung von Kulturüberständen und bakteriellem Zellmaterial.....	38
2.4.5	Wachstumsbedingungen für die RNA-Sequenzierung	39
2.4.6	Sporulationsexperimente	39
2.4.7	Mikrobiologische Färbungen.....	40
2.4.8	Elektronenmikroskopie	40
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	41
2.5.1	Isolierung genomischer DNA aus Bakterien.....	41
2.5.2	PCR-Techniken	41
2.5.2.1	Oligonukleotide und Primerdesign.....	41
2.5.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.5.2.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.5.2.4	Real-Time PCR	45
2.5.3	RNA-Techniken	47
2.5.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien	47
2.5.3.2	DNase-Behandlung von RNA.....	48
2.5.3.3	Herstellung komplementärer DNA (cDNA) aus RNA	49
2.5.4	Fluorometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	51
2.5.5	RNA-Sequenzierung.....	51
2.5.5.1	Qualitätskontrolle von RNA	52
2.5.5.2	Abreicherung von rRNA	52
2.5.5.3	Herstellung von cDNA-Bibliotheken.....	53
2.5.5.4	Sequenzierung von cDNA-Bibliotheken.....	55
2.5.5.5	Bioinformatische Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten	55
2.6	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	57

2.6.1	Antikörper und Antigene	57
2.6.2	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE).....	57
2.6.3	Silberfärbung	59
2.6.4	Kapsel­färbung mit Alcianblau	59
2.6.5	Western Blot.....	60
2.6.6	Immunfärbung und Detektion mittels Chemilumineszenz.....	60
2.6.7	Massenspektrometrische Analyse	61
2.6.7.1	Ansäuerung von Probenmaterial und Neutralisation von Proteinlysaten.....	62
2.6.7.2	Trypsin-Verdau von Proteinen.....	63
2.6.7.3	Entsalzung von Peptidgemischen.....	63
2.6.7.4	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) ..	64
2.6.7.5	Bioinformatische Analyse der Proteomdaten.....	65
2.7	Software und Internet-Datenbanken	66
3	Ergebnisse	67
3.1	Transkriptomanalyse.....	67
3.1.1	Auswahl der Zielstämme und Kultivierungsbedingungen	67
3.1.2	Ermittlung des Untersuchungszeitpunktes	68
3.1.3	Quantitäts- und Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA.....	70
3.1.4	Überprüfung der Genexpression zum Untersuchungszeitpunkt	72
3.1.5	Korrelation der biologischen Replikate bei der RNA-Sequenzierung.....	74
3.1.6	Differentielle Genexpressionsanalyse	75
3.1.6.1	Bestimmung differentiell exprimierter Gene.....	76
3.1.6.2	Verteilung der differentiell exprimierten Gene auf das Chromosom und die Plasmide	77
3.1.6.3	Stammspezifische und -übergreifende Verteilung der differentiell exprimierten Gene.....	78
3.1.6.4	Analyse der hochregulierten Gene unter CO ₂ -Bedingung.....	80
3.1.6.5	Analyse der herunterregulierten Gene unter CO ₂ -Bedingung	87
3.1.7	Verifizierung der RNA-Sequenzierungsdaten	88
3.2	Sekretomanalyse	91

3.2.1	Wachstum in R-Minimalmedium und auf R-Minimalmedium Agar.....	91
3.2.2	Nachweis der Toxine in den Kulturüberständen.....	94
3.2.3	Kapselnachweis mittels Alcianblaufärbung	96
3.2.4	Identifizierung von sekretierten Proteinen der <i>Bcbva</i> -Stämme.....	98
3.3	Analyse der Sporulation.....	104
3.3.1	Untersuchung der Genexpression und Genregulation bei der Sporenbildung.....	104
3.3.1.1	Auswahl der Zielstämme und Zeitpunkte für die RNA-Extraktion.....	104
3.3.1.2	Auswahl der Zielgene.....	106
3.3.1.3	Relative Quantifizierung der Genexpression	108
3.3.2	Untersuchung der Sporenbildung im Elektronenmikroskop.....	115
3.3.2.1	Bestimmung und Quantifizierung von Sporulationsstadien.....	115
4	Diskussion.....	120
4.1	Transkriptomanalyse.....	121
4.1.1	Experimentelles Design der RNA-Sequenzierung.....	121
4.1.2	Differenzielle Genexpressionsanalyse	125
4.1.2.1	Anzahl und Verteilung differentiell exprimierter Gene zwischen den untersuchten Stämmen und auf genetischen Elementen.....	128
4.1.2.2	Genexpression bekannter Virulenzfaktoren unter CO ₂ -Bedingung	129
4.1.2.3	Spezies-spezifische Hochregulation von Genen unter CO ₂ -Bedingung	134
4.1.2.4	Herunterregulierte Gene unter CO ₂ -Bedingung	135
4.2	Sekretomanalyse	137
4.2.1	Verwendung von R-Minimalmedium für die MS-Analyse	137
4.2.2	Spezifisch sekretierte Proteine der untersuchten <i>Bcbva</i> -Stämme.....	139
4.3	Analyse der Sporulation.....	142
4.3.1	Relative Quantifizierung der Genexpression anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.....	142
4.3.2	Analyse der Expression und Regulation ausgewählter Sporulationsgene.....	144
4.3.2.1	Vergleich der Genexpression zwischen den untersuchten Stämmen innerhalb einer Spezies.....	145
4.3.2.2	Vergleich der Genexpression zwischen den untersuchten <i>Bcbva</i> - Wildtypisolaten und den <i>Bcbva</i> -Sporulationsmutanten.....	146

4.3.2.3 Vergleich der Genexpression zwischen den untersuchten <i>B. anthracis</i> - und <i>Bcbva</i> -Stämmen.....	148
5 Ausblick.....	153
Abbildungsverzeichnis.....	CLV
Tabellenverzeichnis.....	CLVII
Literaturverzeichnis	CLX
Anhang.....	CLXXVII
Selbstständigkeitserklärung.....	CLXXXIX

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
α	alpha
β	beta
γ	gamma
Ab	Antikörper (<i>antibody</i>)
abs.	absolut
<i>acpA</i>	<i>anthrax capsule activator</i>
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser (<i>Aqua bidestillata</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AS-Lsg.	Aminosäure-Lösung
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
<i>atxA</i>	<i>anthrax toxin activator</i>
B	Belgien
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Bcbva</i>	<i>Bacillus cereus</i> biovar <i>anthracis</i>
BclA	<i>Bacillus-collagen-like-protein of B. anthracis</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CAA	2-Chloracetamid
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CDS	kodierende DNA-Sequenz (<i>coding sequence</i>)
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
CuSO ₄	Kupfersulfat
D	Deutschland
DEG	differenziell exprimiertes Gen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ödemfaktor (<i>edema factor</i>)
ELISA	<i>enzyme-linked-immuno-sorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
etc.	<i>et cetera</i>
EtOH	Ethanol
F	Frankreich
FA	Formaldehyd
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FeSO ₄	Eisensulfat
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GA	Glutardialdehyd
h	Stunde (<i>hour</i>)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Bertani
LF	Letalfaktor
LFQ	Markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung (<i>Label-Free Quantitation</i>)
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
Lsg.	Lösung
M	molar

m	milli
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mM	Millimolar
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MnSO ₄	Mangan(II)-sulfat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunden
MS	Massenspektrometrie
MS ²	Meter pro Quadratsekunde
MW	Molekulargewicht
n	nano
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat (= Natriumbikarbonat)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
ng	Nanogramm
nL	Normalliter
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
NZ	Neuseeland (<i>New Zealand</i>)
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PA	Protektives Antigen
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pFA	Paraformaldehyd
<i>plcR</i>	<i>phospholipase C regulator</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PVDF	Poly-Vinylidene-di-Fluorid
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase-PCR

RG	Risikogruppe
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase oder <i>Real Time</i>
s	Sekunde oder siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
sog.	sogenannte
<i>sp.</i>	<i>Species</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Th	Thomson (Einheit)
TMP	Trockenmagermilchpulver
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TPM	<i>transcripts per million</i>
U	<i>unit</i>
u.a.	unter anderem
UK	Großbritannien (<i>United Kingdom</i>)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>United States of America</i>)
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
V	Volt
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
x	mal
z.B.	zum Beispiel
ZBS	Zentrum für biologische Gefahren und spezielle Pathogene
ZnSO ₄	Zinksulfat

Zusammenfassung

Seit den Untersuchungen von Robert Koch ist *Bacillus anthracis* als der Erreger von Milzbrand bekannt. Die verschiedenen Stämme sind genetisch sehr ähnlich und besitzen spezifische chromosomale Marker sowie zwei Virulenzplasmide, pXO1 und pXO2, die die Synthese von Toxinen bzw. Kapsel kodieren. Es war darum eine Überraschung, als ab 2001 der neuartige Erreger *Bacillus cereus* biovar *anthracis* (*Bcbva*) aus Menschenaffen und anderen Säugetieren isoliert wurde, die in Regenwaldgebieten der Elfenbeinküste (Stamm CI) und anderen afrikanischen Ländern, u.a. in Kamerun (Stamm CA), an einer Milzbrand-ähnlichen Erkrankung verstorben waren. *Bcbva* kombiniert den chromosomalen Hintergrund von *Bacillus cereus* mit den beiden Virulenzplasmiden von *B. anthracis* und weist auf bakteriologischer Ebene Merkmale beider Spezies auf. Sowohl in *B. anthracis* als auch in *Bcbva* wird die Expression von Toxin- und Kapselgenen durch den pXO1-kodierten globalen Regulator AtxA kontrolliert und unter wirtsähnlichen Wachstumsbedingungen, die durch Bikarbonatzusatz im Medium und CO₂-haltige Atmosphäre simuliert werden können, hochreguliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Primärisolate *Bcbva* CI und CA mittels Genexpressionsanalysen und einer Sekretomanalyse näher charakterisiert und mit zwei Vertretern von *B. anthracis* (Laborstamm *B. anthracis* Vollum und Wildisolat *B. anthracis* Dobichau) verglichen, wobei vor allem die Untersuchung der Virulenzmechanismen im Vordergrund stand. Es wurde eine Transkriptomanalyse (RNA-Sequenzierung) zum Vergleich der globalen Genexpression unter Umgebungsbedingungen und wirtsähnlichen Bedingungen mit jeweils drei biologischen Replikaten pro Stamm durchgeführt. Dabei wurden 24 Gene mit einem mindestens vierfachen Expressionsanstieg unter CO₂-Bedingung bei allen vier Stämmen detektiert, darunter bekannte hochregulierte Virulenzgene wie die Kapselgene, wodurch die Validität der Ergebnisse bestätigt wurde. Plasmidgene wurden in CO₂-Atmosphäre fast ausschließlich hoch- anstatt herunterreguliert, wobei die Anzahl pXO2-lokalisierter Gene die der pXO1-lokaliserten überstieg. Die Zahl der differentiell exprimierten Gene lag im Falle der hochregulierten Gene bei den *Bcbva*-Stämmen und bei *B. anthracis* Dobichau deutlich höher als bei *B. anthracis* Vollum. Für 41 Gene, darunter mehrere Gene für ABC-Transporter, wurde nur bei den beiden *Bcbva*-Stämmen, aber nicht bei *B. anthracis*, ein mindestens vierfacher Expressionsanstieg gezeigt. Hier gilt es zukünftig beispielsweise über die Herstellung von Deletionsmutanten zu klären, ob es sich bei den in *Bcbva* hochregulierten Genen um Virulenzfaktoren handelt. Die Analyse deckte weiterhin gravierende Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an hoch- und herunterregulierten Genen zwischen den beiden *Bcbva*-Isolaten auf, die auf eine verschiedenartige Genregulation unter wirtsähnlichen Bedingungen hindeuten. Dies sollte in Untersuchungen mit weiteren Isolaten

von *Bcbva* CI und CA überprüft werden, und mit Hilfe einer AtxA-Deletionsmutante könnte festgestellt werden, ob wirklich alle differentiell exprimierten Gene über AtxA reguliert werden. Die massenspektrometrische Sekretomanalyse nach Anzucht unter wirtsähnlichen Bedingungen ermöglichte die Identifizierung von 33 potentiell diskriminierenden Proteinen, die spezifisch im Überstand der untersuchten *Bcbva*-Stämme vorkamen. Hierzu zählte auch das pXO2-60 Protein, ein bekanntes *Bcbva*-spezifisches Antigen, dessen Nachweis die generierten Daten verifizierte. Es konnte allerdings kein weiteres *Bcbva*-spezifisches Antigen eindeutig detektiert werden. Obwohl teilweise geringe Sequenzidentitäten zu *B. anthracis* vorliegen, besitzen alle Proteine eine fast identische Proteinsequenz zu Homologen aus anderen Spezies innerhalb der *B. cereus*-Gruppe und ihr Vorkommen ist weit verbreitet. Es bleibt offen, ob die betreffenden Proteine bei diesen Spezies ebenfalls sekretiert werden.

Die Untersuchung der Genexpression während der Sporulation erfolgte mittels qPCR ausgewählter Sporulationsgene. Dafür wurde RNA zu Beginn der stationären Wachstumsphase sowie ein und zwei Stunden danach isoliert, und die Genexpression über relative Quantifizierung gegen ein konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die hierarchisch ablaufende Genexpression während der Sporulation bei *Bcbva* und *B. anthracis* vergleichbar ist und dem allgemeinen Wissensstand über die Versporung des Modellkeims *B. subtilis* entspricht. Die Initiation der Sporenbildung erfolgte in der vorliegenden Arbeit bei den untersuchten *Bcbva*-Stämmen eine Stunde früher, was auf eine tendenziell schnellere Reaktion auf nährstofflimitierende Umwelteinflüsse bei *Bcbva* im Vergleich zu *B. anthracis* schließen lässt. *Bcbva* besitzt im Gegensatz zu *B. anthracis* eine Insertion im Gen für den Sigmafaktor σ^K . Das dafür notwendige Ausschneiden der Insertion aus dem *sigK*-Gen scheint jedoch keinen limitierenden Einfluss auf die Kinetik der Versporung zu nehmen. Elektronenmikroskopisch wurde die schnellere Initiation der Sporenbildung bei *Bcbva* bestätigt, aber es konnten keine morphologischen Unterschiede der einzelnen Sporulationsstadien zwischen den beiden Spezies festgestellt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Genregulation bei den untersuchten Stämmen von *Bcbva* und *B. anthracis* weitgehend ähnlich abläuft, aber auch einige gravierende Unterschiede aufweist. Inwieweit das auf die verschiedenen „Habitate“ der Erreger zurückzuführen ist, bedarf weiterer Klärung. Dafür stellt diese Arbeit eine sehr gute Grundlage dar.

Summary

Bacillus anthracis is known to us as the causative agent of anthrax since Robert Koch's times. The different strains are genetically very similar and carry species-specific chromosomal markers and two virulence plasmids, pXO1 and pXO2. The plasmids are encoding proteins that are involved in the synthesis of toxins and capsule. Surprisingly, since 2001 the novel pathogen *Bacillus cereus* biovar *anthracis* (*Bcbva*) was recovered from samples taken from great apes and other mammals that had died of an anthrax-like disease in rainforest areas of African countries, notably Côte d'Ivoire (strain ID CI) and Cameroon (strain ID CA). *Bcbva* combines the chromosomal background of *Bacillus cereus* with the two virulence plasmids of *B. anthracis* displaying bacteriologic characteristics of both species. The expression of the toxin and capsule genes is controlled by the pXO1-encoded global regulator AtxA and is upregulated under host-mimicking culture conditions in medium containing bicarbonate and CO₂ in *B. anthracis* as well as *Bcbva*.

In the work presented here, primary *Bcbva* isolates (IDs CI and CA) were characterized in detail by applying gene expression and secretome analysis. The results were compared to results obtained for two classical *B. anthracis* species: the laboratory strain *B. anthracis* Vollum and a wild isolate *B. anthracis* Dobichau. The primary focus was on investigating virulence mechanisms. The global gene expression was examined by transcriptome analysis (RNA sequencing) comparing gene expressions shown by strains grown under ambient and host-mimicking conditions. Per bacterial strain, three biological replicates were used in the experiments. For a total of 24 genes, a minimum of a fourfold increased gene expression was detected in all strains under CO₂ growth conditions. Among them, known up-regulated virulence genes such as capsule genes were found, which confirmed the validity of the results. Additionally, it was observed that plasmid encoded genes were almost exclusively up- instead of down-regulated in CO₂ atmosphere. Interestingly, the upregulation of the number of pXO2-localized genes was more predominant than the number of upregulated pXO1-encoded genes. Thereby, the number of differentially expressed upregulated genes was considerably higher in both *Bcbva* strains and in *B. anthracis* Dobichau than in *B. anthracis* Vollum. Increased expression (> fourfold) of 41 genes, including several genes associated to ABC transporters, was exclusively observed in the *Bcbva* strains. These findings need further investigations in order to clarify whether the genes upregulated in *Bcbva* are virulence factors. This could be achieved through the analysis of deletion mutant strains. The conducted study also revealed major differences in the number of up- and down-regulated genes of both *Bcbva* isolates, suggesting different gene regulation under host-mimicking conditions. To underpin these results, further investigations are of utmost importance by increasing the number of *Bcbva*

isolates from Côte d'Ivoire and Cameroon. To analyze an AtxA-deletion mutant could be helpful to find out if all differentially expressed genes are indeed exclusively regulated by AtxA.

The secretome analysis after cultivation under host-mimicking conditions using mass spectrometry allowed the identification of 33 potentially discriminatory proteins that were specifically present in the supernatant of the *Bcbva* strains. The identification of pXO2-60, a known *Bcbva*-specific antigen, validated the generated data. However, additional *Bcbva*-specific antigens were not unequivocally recognized. Although some minor sequence identities to *B. anthracis* are present, all proteins have an almost identical protein sequence to homologues from other species within the *B. cereus* group and their occurrence is widely spread. It remains open if the proteins are also secreted by these species.

To complement these analyses, the expression of selected genes during sporulation was assessed by qPCR. For this purpose, RNA was isolated at the beginning of the stationary growth phase and one and two hours later, respectively. Gene expression was analyzed by relative quantification against a constitutively expressed housekeeping gene. It could be highlighted that the hierarchical gene expression during sporulation in *Bcbva* was comparable to *B. anthracis*. This is also consistent with information acquired about the mechanism of sporulation in the model bacterium *B. subtilis*. Initiation of sporulation occurred one hour earlier in the *Bcbva* strains studied in the present work, suggesting a tendency for a faster response to nutrient-limiting environmental conditions in *Bcbva* than in *B. anthracis*. *Bcbva*, unlike *B. anthracis*, has an insertion in the gene encoding the sigma factor σ^K . However, the necessary excision of the insertion from the *sigK* gene does not seem to have a limiting effect on the kinetics of sporulation. Electron microscopy confirmed the faster initiation of sporulation in *Bcbva*, but no morphological differences of the individual sporulation stages between the two species could be seen.

The present work shows that gene regulation in *Bcbva* and *B. anthracis* is highly similar. Yet, also distinct differences were found. The extent to which this observation is due to the different "habitats" of the pathogens requires further clarification. The generated data provide a very good basis for additional investigations.

1 Einleitung

1.1 Die *Bacillus cereus* – Gruppe

Mikroorganismen der *Bacillus cereus*-Gruppe sind Gram-positive, sporenbildende Bakterien, die der Familie der *Bacillaceae* angehören und ubiquitär in der Umwelt vorkommen. Die heterogene Gruppe aerober, fakultativ anaerober, stäbchenförmiger Bakterien umfasste bis zum Jahr 2016 neun eng verwandte Spezies: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis* und *B. wiedmannii* [1-4]. Im Jahr 2017 wurden neun weitere Spezies innerhalb der *B. cereus*-Gruppe neu beschrieben [5], die sich bislang nur durch Methoden der Gesamtgenomsequenzierung voneinander und von den anderen etablierten Spezies abgrenzen. Alle Genome zeichnen sich durch einen niedrigen GC-Gehalt aus. Über die eigentlichen Speziesbeschreibungen hinaus existieren bislang kaum Daten zu diesen neuen Vertretern. Mit Ausnahme von *B. cytotoxicus*, der am stärksten divergierenden Spezies der Gruppe, sind die Genome der anderen bekannten Vertreter der *B. cereus*-Gruppe hoch konserviert [6, 7], obwohl sie sich phänotypisch zum Teil deutlich voneinander unterscheiden und verschiedene ökologische Nischen besiedeln. Das pathogene Potenzial der einzelnen Spezies variiert ebenfalls sehr stark. *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* und *B. weihenstephanensis* werden als apathogen bzw. schwach pathogen angesehen, wohingegen *B. thuringiensis* ein Insektenpathogen darstellt. Letzteres produziert intrazelluläre Proteinkristalle, die für ein breites Spektrum von Insektenlarven toxisch sind und somit auch industriell als biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel in der Umwelt eingesetzt wird [8, 9]. *B. cereus* gilt als humanpathogen, da das Bakterium als häufige Lebensmittelkontaminante Vergiftungen hervorrufen kann sowie für eine Vielzahl lokaler und systemischer Infektionen verantwortlich ist. Die wohl virulenteste Spezies der *B. cereus*-Gruppe ist der ätiologische Erreger des Milzbrandes, *B. anthracis*. Milzbrand ist eine der ältesten bekannten und eine weltweit verbreitete Zoonose, die aber in vielen Industrienationen nur noch sehr selten auftritt. Die meisten der relevanten genetischen Informationen, die für die verschiedenen Pathotypen innerhalb der *B. cereus*-Gruppe verantwortlich sind, werden auf Plasmidebene gespeichert, was in der Vergangenheit zu Debatten über die Kriterien für die taxonomische Zuordnung der verschiedenen Spezies geführt hat [10, 11].

Im Folgenden werden, aufgrund ihrer Verwandtschaft zu dem neuartigen Erreger *Bacillus cereus* biovar *anthracis*, die beiden Spezies *B. cereus* und *B. anthracis* näher beschrieben.

1.2 *Bacillus cereus*

B. cereus ist ein aerobes bis fakultativ anaerobes, bewegliches Bakterium, dessen natürliches Umweltreservoir u.a. aus verrottender organischer Substanz, Süß- und Meerwasser, Gemüse sowie dem Darmtrakt von Invertebraten besteht, von denen Boden und Nahrungsmittel kontaminiert werden können [12]. Aufgrund der Fähigkeit zur Ausbildung adhäsiver Endosporen, die äußerst resistent gegenüber Umwelteinflüssen sind, ist *B. cereus* nur schwer aus Lebensmittelverarbeitungsanlagen zu entfernen. Der Verzehr kontaminierter Produkte kann schwere Magen-Darm-Erkrankungen bei den Verbrauchern zur Folge haben. Es werden dabei zwei Erkrankungsformen unterschieden. Eine, die sich durch Erbrechen zeigt (emetische Erkrankung) und eine, die mit Durchfall einhergeht (Diarrhoetyp). Die Ursache liegt in der Produktion unterschiedlicher Arten von Toxinen. Das Erbrechen steht in Verbindung mit dem sogenannten Cereulid. Dabei handelt es sich um ein kleines, hitzestabiles Peptid, dessen Gene auf einem 270 kb großen Plasmid lokalisiert sind [13]. Die Durchfall-Erkrankungen werden durch hitzelabile Enterotoxine hervorgerufen. Die drei Toxine, die mit dem Diarrhoetyp assoziiert werden, sind die porenbildenden Zytotoxine Hämolysin BL (Hbl), nicht hämolytisches Enterotoxin (Nhe) und Zytotoxin K (CytK) [14]. Neben diesen Toxinen produziert *B. cereus* zahlreiche weitere Virulenzfaktoren wie Hämolysine, Phospholipasen oder Proteasen, die chromosomal kodiert sind. Viele dieser Gene sind auch in anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe wie *B. thuringiensis* und *B. anthracis* zu finden, werden bei Letzterem aber nicht oder in nur geringem Maße exprimiert [15, 16]. Zusätzlich zu Lebensmittelvergiftungen verursacht *B. cereus* eine Reihe von systemischen und lokalen Infektionen sowohl bei immungeschwächten als auch bei immunkompetenten Personen. Das Spektrum dieser Infektionen umfasst u.a. fulminante Bakteriämie, Meningitis oder Pneumonien [12, 17].

1.3 *Bacillus anthracis*

B. anthracis (*Ba*) ist der Verursacher des Milzbrandes (Anthrax). Bereits 1841 entdeckte Aloys Pollender die Bakterien im Blut erkrankter Schafe, allerdings gelang es erst Robert Koch 1876 die Bakterien außerhalb des Wirtstiers zu kultivieren und *B. anthracis* als Krankheitserreger zu beschreiben [18]. Louis Pasteur führte 1881 die erste erfolgreiche Immunisierung an landwirtschaftlichen Nutztieren unter Verwendung einer lebenden, durch Hitze abgeschwächten Kultur von *B. anthracis* durch und gilt damit zusammen mit William Greenfield als Pionier der Milzbrand-Impfung [19].

Der Name „Anthrax“, die englische Bezeichnung für Milzbrand, leitet sich vom griechischen Wort „anthrakos“ für Kohle ab und bezieht sich auf den charakteristischen schwarzen Schorf

beim menschlichen Hautmilzbrand. Der deutsche Begriff Milzbrand entstand aufgrund des typischen pathologischen Bildes einer durch Hämorrhagie dunkel verfärbten Milz.

1.3.1 Epidemiologie und Ökologie

Beim durch *B. anthracis* hervorgerufenen Milzbrand handelt es sich um eine zoonotische Erkrankung, die von Tieren auf Menschen übertragen wird. Die Erkrankung tritt bis heute noch immer endemisch bei Nutz- und Wildtieren auf, es können aber alle Säugetiere inklusive des Menschen erkranken [20]. Milzbrand kommt weltweit vor, jedoch bevorzugt in wärmeren Klimazonen (Südosteuropa, Südamerika, Afrika, Südostasien). In Europa kommt es sporadisch in Deutschland, Frankreich, Griechenland, Italien und auf dem Balkan zu Milzbrandinfektionen, in der Türkei treten Fälle endemisch auf (s. Abbildung 1).

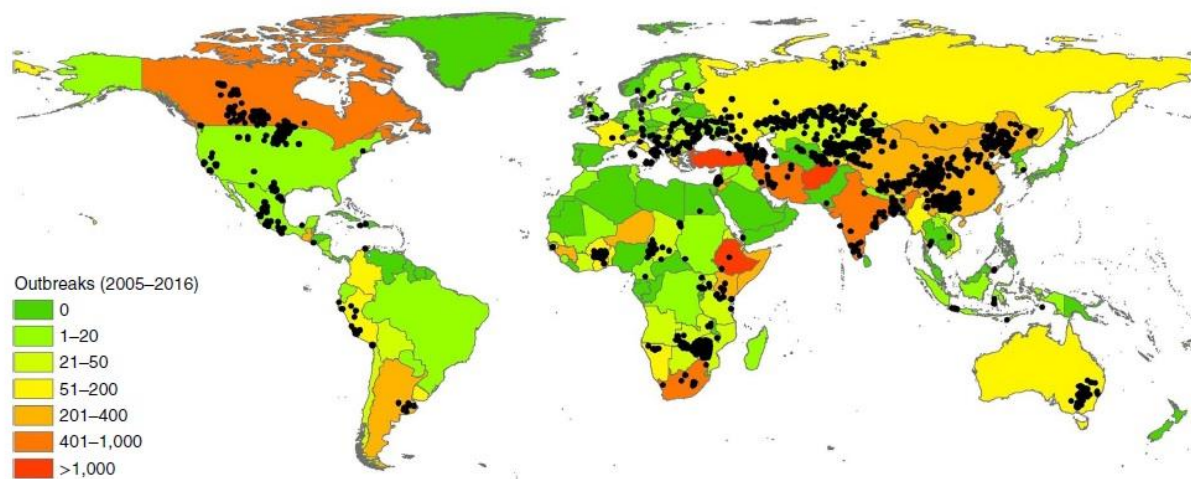


Abbildung 1: Vorkommen von Milzbrand

Schwarze Punkte stellen einzelne Ausbruchsorte dar.
Carlson © 2019 Nat Microbiol. 4(8): p. 1337-1343 [21]

In Deutschland wurden in den Jahren 2000 bis 2014 vier Milzbrandausbrüche bei Tieren angezeigt. Den letzten humanen Fall von Hautmilzbrand gab es 1994 in Deutschland, gefolgt von Infektionen mit Injektionsmilzbrand in den Jahren 2009 bis 2012 [22]. Ein hohes Infektionsrisiko tragen Personen, die mit infizierten Tieren oder kontaminierten tierischen Produkten wie Fleisch, Knochen, Wolle, Haut oder Fell in Berührung kommen. So sind Infektionen mit *B. anthracis* unter Arbeitern in Wollfabriken keine Seltenheit. Zudem traten 2006 und 2008 in Großbritannien Fälle von Lungenmilzbrand beim Menschen durch die Verarbeitung von Tierfellen zur Bespannung von Trommeln auf [23]. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist hingegen sehr unwahrscheinlich.

B. anthracis-Sporen können sich als Umweltkeime im Erdboden befinden, vor allem in Gegenden mit ausgeprägter Viehzucht und an Standorten von Gerbereien, wo sie über viele Jahre überdauern [22]. Pflanzenfressende Nutz- und Wildtiere sind primär durch die Aufnahme

des Erregers betroffen und an seiner Weiterverbreitung beteiligt. Nach der Aufnahme von Sporen durch Grasen oder Äsen erfolgt die Infektion des Wirtstiers durch Keimung der Sporen zu vegetativen Zellen, die sich schnell als extrazelluläres Pathogen im Blutkreislauf vermehren und Virulenzfaktoren wie Kapsel und Toxine bilden. Die Replikation findet unter diesen Bedingungen über einen relativ kurzen Zeitraum von 20 bis 40 Generationen statt, bis der Tod des Wirtes eintritt oder es zur Beseitigung der vegetativen Bakterien durch therapeutische Wirkstoffe kommt [24]. Wenn das infizierte Tier stirbt, sporulieren die vegetativen Zellen mit Austreten der kontaminierten Körperflüssigkeiten bei Kontakt mit Sauerstoff [20]. Die Versporung wird dabei durch die eintretenden Fäulnisprozesse im Tierkadaver begünstigt, die bei den vegetativen Bakterien Stress durch Nährstoffmangel und ein lebensfeindliches Umgebungsmilieu induzieren (s. Abbildung 2) [25]. Die entstehenden Sporen können so den Boden ganzer Areale für lange Zeit kontaminieren. Eine Vermehrung von vegetativen Zellen im Boden findet vermutlich nicht statt.

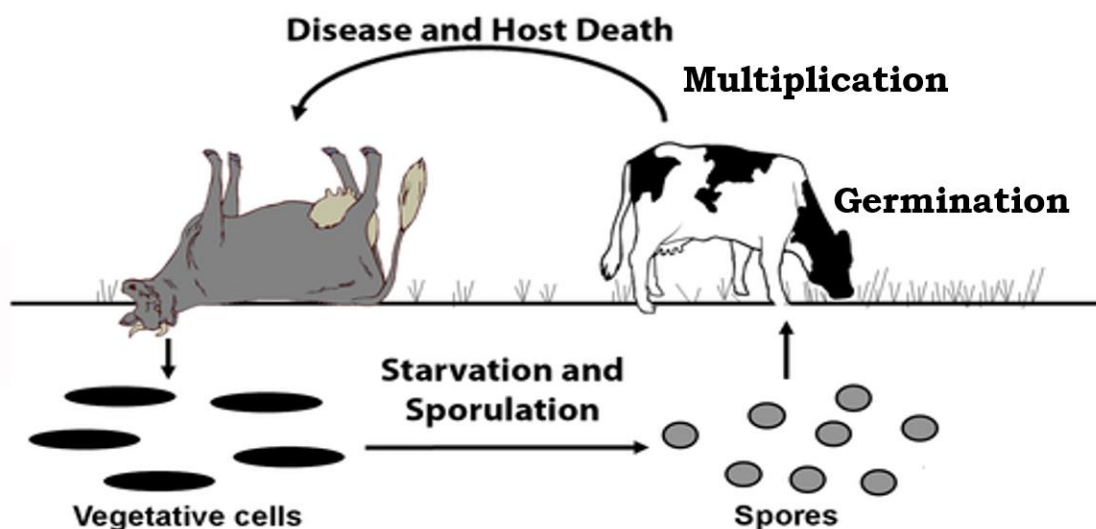


Abbildung 2: Lebenszyklus von *B. anthracis*
 modifiziert nach Schuch R, Fischetti VA, © 2009 PLoS ONE 4(8): e6532

1.3.2 Pathogenese und Klinik

Es gibt vier verschiedene Formen des Milzbrandes. Eine Infektion mit *B. anthracis* kann durch Aufnahme über Hautverletzungen hervorgerufen werden, wodurch sich der sog. Hautmilzbrand entwickelt. Das Einatmen von Sporen führt zu Lungenmilzbrand, wohingegen Magen-Darm-Milzbrand vor allem durch den Verzehr kontaminierter Fleischprodukte erkrankter Tiere entsteht. Bei der vierten Form wird *B. anthracis* über die Injektion einer kontaminierten Substanz übertragen, wodurch sich die Bezeichnung Injektionsmilzbrand ergab.

Hautmilzbrand ist mit ca. 95 % aller Infektionen mit *B. anthracis* weltweit die am häufigsten auftretende Form [26]. Durch direkten Kontakt mit betroffenen Tieren oder kontaminierten

Tierprodukten infizieren sich die Personen hauptsächlich an Händen, Armen, Hals und im Gesicht. An der Infektionsstelle entsteht eine schmerzlose Papel (Pustula maligna) mit Rötung und Schwellung, die sich innerhalb von 1-2 Tagen zu einem oder mehreren flüssigkeitsgefüllten Vesikeln entwickelt. Im Anschluss bilden sich an diesen Stellen mit schwarzem Schorf bedeckte nekrotische Geschwüre (Milzbrandkarbunkel). Diese sind ebenfalls nicht schmerzhaft, unbehandelt kann sich die Entzündung aber über die Lymphbahnen ausbreiten und zu einer Sepsis führen, wodurch Hautmilzbrand in 10-40 % der Fälle tödlich verläuft [27]. Bei rechtzeitiger Gabe von Antibiotika kann er allerdings gut behandelt und geheilt werden.

Gastrointestinaler Milzbrand entwickelt sich nach dem Konsum von kontaminiertem, halbgegartem Fleisch. Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich zwei bis fünf Tagen treten Symptome wie Übelkeit, blutigem Erbrechen bzw. blutigem Durchfall und Fieber auf, einhergehend mit starken Unterleibsschmerzen und gefolgt von Anzeichen einer Sepsis. Unbehandelt verläuft die Infektion in der Regel letal.

Nach Inhalation sporenhaltiger Aerosole oder Stäube kann es zur gefährlichsten Form der Infektion mit *B. anthracis* kommen, dem Lungenmilzbrand. Die Infektionsdosis ist in diesem Fall relativ hoch und beträgt schätzungsweise 8.000 bis 10.000 Sporen [28]. Nach einem Initialstadium mit grippeähnlichen Symptomen kommt es innerhalb von 1-3 Tagen nach Inhalation zu einem schweren Krankheitsbild mit atypischer schwerer Lungenentzündung und häufig einhergehender Meningitis. Der Patient stirbt nach nur wenigen Tagen an durch Sepsis hervorgerufenem Lungen-, Herz- und Kreislaufversagen. Aufgrund der raschen Progredienz und der Schwere der Erkrankung ist die frühzeitige Therapie besonders wichtig. Trotz Antibiotikabehandlung liegt die Letalität bei 50 %, unbehandelt liegt sie bei dieser Milzbrandform bei 100 %.

Seit dem Jahr 2000 ist eine neue Infektionsform der Krankheit bekannt, als in Norwegen ein Heroinkonsument an Injektionsmilzbrand verstarb [29]. Zwischen 2009 und 2010 wurden weitere Fälle von Milzbrand unter Drogenkonsumenten in Deutschland und dem Vereinigten Königreich gemeldet [30]. Injektionsmilzbrand resultiert daraus, dass sich die betroffenen Personen die mit Sporen kontaminierten Drogen subkutan, intramuskulär oder intravenös injizieren. In Bayern wurde im Juni 2012 über zwei neue Injektionsmilzbrandfälle berichtet [31, 32] und seitdem kamen weitere Fälle in Deutschland, Dänemark, dem Vereinigten Königreich sowie Frankreich hinzu, sodass bis August 2013 insgesamt 26 Menschen an Injektionsmilzbrand verstarben [30]. Molekulargenetische Untersuchungen ergaben, dass es sich hier um genetisch sehr verwandte Ausbruchsstämme handelte [30, 33]. Typisch für den Injektionsmilzbrand ist die Entwicklung einer ausgedehnten Haut-Weichgewebe-Infektion mit diffuser Beteiligung des subkutanen Fettgewebes, ausgedehntem Erythem, massiver

Ödembildung, Kompartmentsyndrom und einer nekrotisierenden Fasziiitis in der Region der Injektionsstelle. Die Letalität liegt bei 50 % [30].

Nach einer Milzbrandinfektion entwickelt sich in der Regel eine humorale Immunität, die im Wesentlichen auf Antikörpern gegen die Toxinkomponenten PA, LF und EF (s. 1.3.5) beruht. Über die Dauer der Immunität gibt es nur wenige Daten. Zudem entwickelt sich eine zelluläre (T-Zell-) Immunität mit Bildung eines proinflammatorischen Zytokinmusters.

1.3.3 Bakteriologie und Diagnostik

Vegetative Zellen von *B. anthracis* sind Gram-positive Stäbchen, die fakultativ anaerob wachsen und leicht eckige Enden besitzen. Die unbeweglichen Bakterien bilden *in vitro* lange Ketten, *in vivo* liegen sie hingegen eher einzeln vor. Die Zellen sind mit einer Länge von ca. 4 µm und einer Breite von 1 µm relativ groß. Im Wirtsorganismus und in Kultur bei erhöhter CO₂-Konzentration (5-10 %, sog. wirtsähnliche Bedingung) bildet *B. anthracis* eine Kapsel aus Poly-D-Glutaminsäure. Unter ungünstigen Lebensbedingungen werden Endosporen gebildet. Die freigesetzten Sporen sind elliptisch und haben eine Größe von ca. 1x2 µm. Sie keimen wieder zu vegetativen Zellen aus, sobald sie sich in einer geeigneten Umgebung befinden (z.B. Blut oder Nährmedium). *B. anthracis* ist anspruchslos und wächst innerhalb eines Tages aerob auf einfachen Kulturmedien. Die großen, weißlichen Kolonien zeigen auf Blutagar keine Hämolyse.

Im Gegensatz zu anderen Vertretern innerhalb der *B. cereus*-Gruppe handelt es sich bei *B. anthracis* um einen monophyletischen Klon, der durch folgende spezifische Merkmale charakterisiert ist. Es sind vier ins Chromosom integrierte Prophagen vorhanden sowie eine nonsense-Mutation im *plcR*-Gen an Nukleotid-Position 640, wodurch sich alle Vertreter von *B. anthracis* von anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe auf chromosomaler Ebene unterscheiden [10]. Zusätzlich zu diesen Kriterien ist das Vorhandensein von zwei Virulenzplasmiden, auf denen die Gene für die Anthraxspezifischen Toxine und die Kapsel lokalisiert sind, das Schlüsselement zur Beschreibung von *B. anthracis*.

Der Nachweis des Erregers kann mikroskopisch, molekularbiologisch und kulturell erfolgen. Um eventuelle Befunde abzusichern, sollte eine Kombination aus allen drei Verfahren angewendet werden. Mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) können aus klinischem Material oder aus Isolaten die Virulenzplasmide und chromosomale Gene nachgewiesen werden, um im schnelldiagnostischen Verfahren einen anderen Vertreter der *B. cereus*-Gruppe auszuschließen und *B. anthracis* bestätigen zu können. Es ist ebenfalls ein antikörperbasierter Antigennachweis (z.B. der Kapsel mittels IFT oder von PA mit cELISA) möglich. Der Nachweis spezifischer Antikörper im Serum spricht für eine akute oder abgelaufene Milzbrandinfektion.

1.3.4 Virulenzfaktoren von *Bacillus anthracis*

Voll virulente Stämme von *B. anthracis* besitzen zwei Plasmide, die dem Erreger seine Pathogenität verleihen: pXO1 (ca. 182 kb) und pXO2 (ca. 95 kb). Der GC-Gehalt liegt bei ca. 33 % und entspricht somit dem des Chromosoms [20]. Das Plasmid pXO1 enthält die Gene für die Toxin-Untereinheiten als Teil einer Pathogenitätsinsel, wohingegen auf pXO2 die Gene für die Synthese der Kapsel aus Poly- γ -D-Glutaminsäure (PDGA) lokalisiert sind. Vertreter von *B. anthracis*, denen eines der beiden Plasmide fehlt, sind weniger virulent, während plasmidlose Stämme avirulent sind, was durch Versuche in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden konnte [34].

1.3.4.1 Die Anthrax-Kapsel

Die für *B. anthracis* spezifische Kapsel besteht, im Gegensatz zu den meisten anderen bakteriellen Kapseln, nicht aus Polysacchariden, sondern aus einem Poly- γ -D-Glutaminsäure-Polypeptid. Sie ist auf dem Virulenzplasmid pXO2 kodiert und wird von vegetativen Zellen entweder *in vivo* im Körper oder *in vitro* auf bikarbonathaltigem Nährmedium unter CO₂-Zufuhr ausgebildet [35]. Anhand der Koloniemorphologie lässt sich die Fähigkeit zur Kapselbildung gut erkennen, da die Kolonien glatt bis mukös erscheinen. Stämme von *B. anthracis* ohne Kapselplasmid wachsen dagegen bei gleichen Anzuchtbedingungen mit deutlich rauer Kolonieoberfläche.

Für die Synthese und Verankerung der Kapsel ist ein Operon aus fünf Genen verantwortlich, *capBCADE*. Dessen Genprodukte interagieren miteinander und bestimmen die Länge der Glutaminsäure-Ketten und somit die Ausprägung der Kapsel [36, 37]. Die Kapsel von *B. anthracis* ist essentiell für vollständige Pathogenität, da sie die vegetative Bakterienzelle vor Komplement-vermittelter Phagozytose durch Makrophagen schützt und so zur Umgehung der Wirts-Immunabwehr beiträgt [38]. Dabei ist sie selbst durch ihren Aufbau nur schwach immunogen, was dem Bakterium hilft, die Immunüberwachung des Wirts zu umgehen [20, 39]. Die Eliminierung des pXO2-Plasmids bei *B. anthracis* führt zu einer so starken Attenuierung, dass das Bakterium zur Impfung verwendet werden kann. Dies geschieht seit Jahrzehnten erfolgreich mit dem Sterne Lebendimpfstoff, der für die Impfung von Nutztieren wie Rinder, Schafe, Pferde, Ziegen und Schweine in endemischen Milzbrandgebieten eingesetzt wird [40].

1.3.4.2 Die Anthrax-Toxine

B. anthracis produziert das Milzbrandtoxin aus drei plasmidkodierten Exotoxinkomponenten: Protektives Antigen (PA, 83 kDa), Letalfaktor (LF, 89 kDa) und Ödemfaktor (EF, 90 kDa). Die zu den Proteinen zugehörigen Strukturgene *pagA* (PA), *lef* (LF) und *cya* (EF) sind alle auf pXO1 lokalisiert. Für sich genommen ist keines der drei Komponenten toxisch, aber PA

interagiert mit jeweils einem der anderen Proteine, wenn sie ins umgebende Medium sekretiert werden. Die Paarungen von PA mit jeweils einem weiteren Faktor bilden höchst effektive Variationen der sog. AB-Toxine [41]. PA stellt hierbei die Zell-bindende B-Domäne und LF bzw. EF die enzymatisch aktive A-Domäne des jeweiligen Toxins dar. PA kann an LF binden und so das Letaltoxin bilden oder auch mit EF interagieren und die Bildung des Ödemtoxins zur Folge haben. Das Letaltoxin und das Ödemtoxin sind letztendlich verantwortlich für die lokale Ödembildung und die nekrotische Gewebeschädigung.

Der Prozess der Internalisierung des Milzbrandtoxins umfasst mehrere Schritte. Zunächst bindet PA in seiner vollen Länge (PA83) an die zellulären Oberflächenrezeptoren CMG2 und TEM8 [42, 43]. Nach der Bindung von PA83 an die Wirtszelle wird das bis dahin inaktive Monomer proteolytisch durch ein Mitglied der Furinfamilie der zellulären Proteasen aktiviert und in zwei Untereinheiten gespalten, von denen ein Fragment 20 kDa (PA20) und das andere 63 kDa groß ist (PA63) [44]. PA20 dissoziiert ins umgebende Medium und gibt so die Bindungsstelle für EF und LF frei. Das rezeptorgebundene PA63 oligomerisiert zu einem ringförmigen hepta-oktameren Komplex, die Präpore, an der bis zu vier Moleküle von LF und/oder EF kompetitiv binden können [45]. Der zusammengefügte Toxinkomplex wird anschließend über Endozytose von der Wirtszelle aufgenommen und in ein endosomales Kompartiment abgegeben. Dort bildet die Präpore unter dem Einfluss eines sauren pH-Werts einen Kationen-selektiven Membrankanal und die Translokation von LF und EF in das zytosolische Kompartiment wird eingeleitet [45]. Im Zytosol führen LF und EF ihre katalytische Wirkung aus. LF ist eine Zink-abhängige Metalloprotease, die den N-Terminus von Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Kinasen (MAPKK) spaltet, wodurch die Übertragung hochkomplexer Signalkaskaden wie Mitose, Genexpression oder Apoptose in der Wirtszelle effektiv gestört wird und es dadurch zum Tod von Makrophagen und dendritischen Zellen kommt [46-48]. Bei EF handelt es sich um eine Calmodulin-abhängige Adenylyl-Zyklase, die intrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt [49]. Der durch das Ödemtoxin verursachte dramatische Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels führt zur Öffnung von zellulären Membrankanälen, deren Aktivität durch den sekundären Botenstoff cAMP beeinflusst wird [50]. Als Folge verliert die Wirtszelle Flüssigkeit, was zur Ödembildung in Geweben führt und dem Toxin seinen Namen verleiht.

Abbildung 3 zeigt den schematischen Ablauf von Bildung, Bindung und Internalisierung des Milzbrandtoxins in die Wirtszelle.

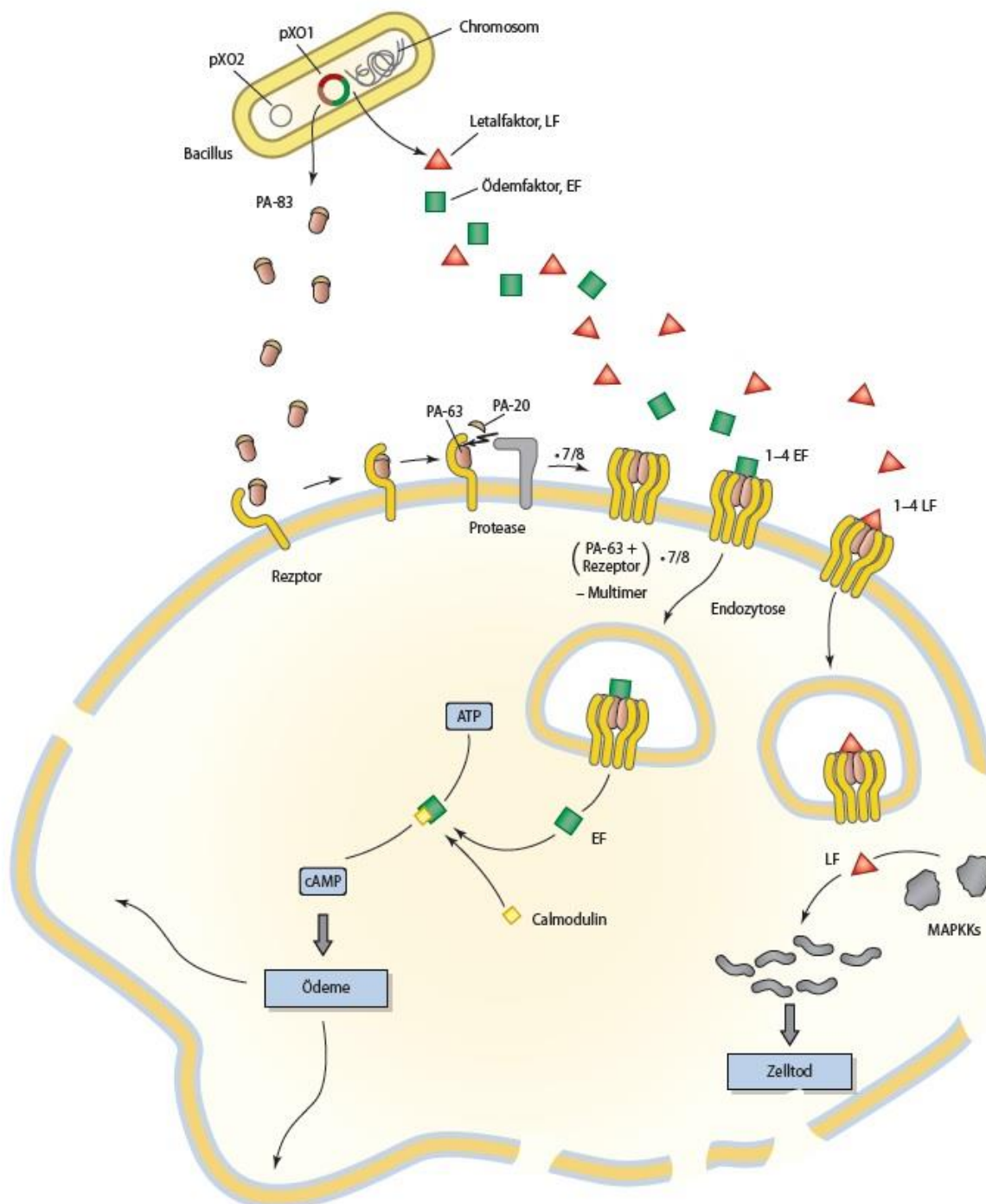


Abbildung 3: Wirkungsweise der *B. anthracis*-Toxine

Schematisches Modell der Wirkungsweise der von *B. anthracis* gebildeten Toxine protektives Antigen (PA), Ödemfaktor (EF) und Letalfaktor (LF).

ATP = Adenosintriphosphat, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, MAPKs = Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen

© Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 2020, S. Suerbaum et al. (Hrsg.), Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie [51]

1.3.5 Regulation der Virulenzfaktoren

Viele Umweltfaktoren wie Temperatur, Wachstumsphase und das Vorhandensein von Bikarbonat beeinflussen die Expression der Virulenzfaktoren von *B. anthracis*. Die Synthese von Kapsel und Toxinen ist Bestandteil eines komplizierten Regulationsmechanismus, der

auch durch das Milieu des Wirtsorganismus bestimmt wird. In vitro ist die Toxinproduktion optimal, wenn die Zellen bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre mit 0,8 % Natriumbicarbonat im Medium angezüchtet werden. Diese Bedingungen spiegeln die natürliche Umgebung im Wirtsorganismus wider, mit Glucose als Kohlenstoffquelle [52, 53]. Die verstärkte Produktion der plasmidkodierten Toxinkomponenten (PA, LF, EF) unter wirtsähnlichen Wachstumsbedingungen lässt sich auch in Sekretomanalysen bestätigen. *B. anthracis* sezerniert alle drei Toxinkomponenten aus der Zelle in den Kulturüberstand, in dem sie durch den spezifischen Nachweis im Immunoblot nachgewiesen werden können. Die Sekretome der unterschiedlich kultivierten Bakterien unterscheiden sich stark in ihrem Proteingehalt. Dies gilt sowohl für pXO1- und pXO2-, als auch für chromosomal kodierte Proteine [54-57].

Das höchste Transkriptionslevel des Kapseloperons tritt ebenfalls in Anwesenheit eines CO₂/Bicarbonat-Gleichgewichts auf, die Temperatur hat dabei jedoch keinen Einfluss auf die Ausbildung der Kapsel [58]. Die Transkription der Toxin- und Kapselgene steigt während des gesamten exponentiellen Wachstums und erreicht ein Maximum beim Übergang in die stationäre Phase [53]. Die Ursache hierfür unterliegt dem Einfluss des sog. „Übergangszustand-Regulators“ (*transition state regulator*) *abrB*, ein chromosomal lokalisiertes Gen, das die Expression der drei Toxingene reguliert und Teil des komplexen Regulationsnetzwerkes bei *B. anthracis* ist [59].

1.3.5.1 Der globale Regulator AtxA

Seit seiner Entdeckung als Transaktivator der Toxin-Synthese in *B. anthracis* vor mehr als 25 Jahren wurde festgestellt, dass der auf pXO1 kodierte globale Masterregulator AtxA (Anthrax toxin activator) Gene auf dem Chromosom und den Plasmiden pXO1 und pXO2 reguliert, einschließlich der Gene, die die Anthrax-Toxine und die Kapselsynthese kodieren (s. Abbildung 4) [53, 60]. AtxA ist ein 55,6 kDa großes Protein, das nur in *B. anthracis* und den wenigen *B. cereus*-Stämmen mit einem pXO1-Homolog inkl. der Pathogenitätsinsel zu finden ist [61, 62]. AtxA besitzt zwei Helix-Turn-Helix Domänen, deren Funktion typischerweise mit DNA-Bindung assoziiert ist. Obwohl es lange Zeit keinerlei Hinweise auf eine Bindung von AtxA an DNA-Sequenzen gab, konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Regulator an die 371 bp lange Promotorregion des *pagA*-Gens binden kann [63].

Das *atxA*-Gen wird von den chromosomal kodierten Transkriptionsfaktoren AbrB und SigH kontrolliert und unterliegt daher der Regulation durch den Phosphorelay der Sporenbildung. AbrB wird seinerseits von dem Hauptregulator der Sporulation Spo0A reguliert, der von verschiedenen Kinasen und Phosphatasen als Reaktion auf Wachstumssignale beeinflusst wird [59]. AtxA reguliert direkt die Expression der Toxingene *pagA*, *lef* und *cya* [52, 60, 64] sowie die Transkription der pXO2-lokalisierten Regulatorgene *acpA* und *acpB*, die wiederum

die Genexpression für die Kapselbildung aktivieren [65]. AcpA und AcpB gelten als Transkriptionsaktivatoren des *cap*-Operons, weshalb eine funktionelle Ähnlichkeit zwischen AtxA und AcpA vermutet wird. Allerdings gibt es einen bedeutenden Unterschied zwischen den beiden Regulatoren, da die *acpA*-Transkription im Gegensatz zur *atxA*-Transkription stark CO₂-abhängig ist [66, 67]. *AcpA* besitzt sowohl eine Transkriptionsstartstelle, die durch *atxA* reguliert wird, als auch eine *atxA*-unabhängige Startstelle [68]. Die Expression von *atxA* selbst ist konstitutiv und in Gegenwart von CO₂ und Bikarbonat lediglich 2,5-fach erhöht [68, 69]. Eine Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass auch *atxA* zwei voneinander unabhängige Transkriptionsstartstellen besitzt, von denen eine innerhalb eines Gens lokalisiert ist, das *atxA* vorgelagert ist und unabhängig von *atxA* transkribiert wird [70].

Obwohl bereits lange bekannt ist, dass vegetative Zellen von *B. anthracis* in Gegenwart von Bikarbonat und CO₂ bei 37 °C die größten Mengen an Toxinen und Kapsel produzieren, ist die Verbindung und der zugrundeliegende Mechanismus zwischen der AtxA- und der Bikarbonat/CO₂-abhängigen Genexpression weitgehend unklar. Die Deletion des *atxA*-Gens in *B. anthracis* führt in jedem Fall im Tierversuchsmodell zu einem Verlust der Virulenz und überlebende Mäuse weisen eine deutlich verringerte Bildung von Antikörpern gegen die drei Toxinkomponenten PA, LF und EF auf [71].

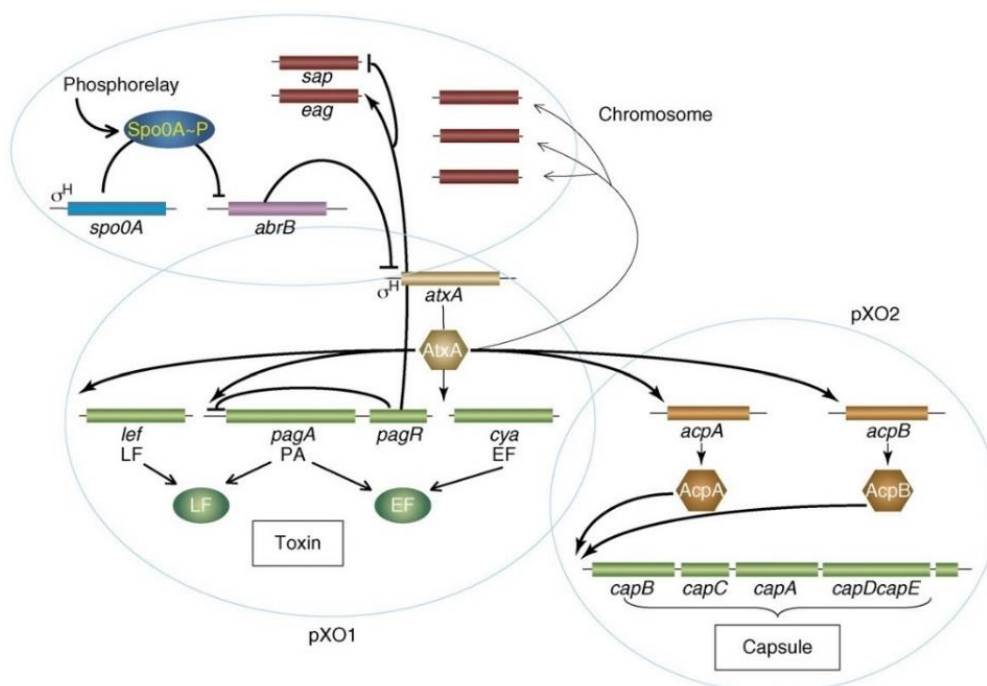


Abbildung 4: Zusammenspiel der Regulationswege für die Virulenzgenexpression bei *B. anthracis*

Perego und Hoch © 2008 Trends Microbiol. 16(5): p. 215-221 [74]

Die chromosomalen Gene, für die die AtxA-abhängige Regulation am besten charakterisiert ist, sind die chromosomalen S-Layer Gene *sap* und *eag*. AtxA aktiviert die Expression des *pagAR*-Operons, woraufhin das PagR-Protein an die Promotorregionen von *sap* und *eag*

bindet und die beiden Gene für die S-Layer Produktion sowohl negativ als auch positiv reguliert. PagR wiederum fungiert zusätzlich als negativer Regulator der *pagA* Expression [72, 73].

Zusätzlich zu seiner Rolle als globaler Masterregulator der Virulenzgen-Regulation kontrolliert AtxA in inverser Beziehung zur Toxinproduktion die Sporulation [75] (s. Abbildung 5). Unter Toxin-induzierenden Bedingungen wird die *atxA*-Expression durch den Übergangszustandsregulator AbrB unterdrückt, während AbrB unter Sporulationsbedingungen eine untergeordnete Rolle bei der Kontrolle von *atxA* spielt. Die Unterdrückung von *atxA* wird unter Toxin-induzierenden Bedingungen durch eine Rückkopplungsschleife über Spo0A und SigH aufgehoben. AtxA wird durch einen weiteren Faktor reguliert, ein nicht näher identifiziertes Repressorprotein, das an eine palindromische Sequenz bindet, die sich innerhalb der *atxA* 5'-untranslatierten Region befindet. Einmal exprimiert, reguliert AtxA positiv die Expression von *skiA* (sporulation kinase inhibitor), das auch als pXO2-0075 oder pXO2-61 bezeichnet wird und einen *atxA*-regulierten offenen Leserahmen auf dem Virulenzplasmid pXO2 darstellt. Dieser ORF ist dem *pXO2-60*-Gen vorgelagert, dessen Genprodukt spezifisch bei *Bcbva* sekretiert wird (s. 1.4.5). Die vorhergesagte Aminosäuresequenz des SkiA-Proteins hat Ähnlichkeit mit der Sensor-Domäne von Sporulations-Sensor-Histidin-Kinasen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von *skiA* die Sporulation unterdrückt [76]. SkiA ist ein negativer Regulator des *atxA*-Repressorproteins, was zu einer positiven Rückkopplungsschleife für die AtxA-Transkription führt. Das bedeutet, dass ein erhöhtes AtxA-Level zu einer erhöhten *skiA*-Transkription führt, wodurch es unter Toxin-induzierenden Bedingungen zu verzögerter und verminderter Sporulation kommt. Dabei spielt die Sensor-Histidin-Kinase BA2291 ebenfalls eine entscheidende Rolle, da sie unter Sporulationsbedingungen als Kinase indirekt den pleiotropen Sporulationsregulator Spo0A aktiviert, unter Toxin-induzierenden Bedingungen allerdings durch den Einfluss der *skiA*-Überexpression in eine Phosphatase umgewandelt wird. SkiA fungiert dabei als Phosphat-Senke, was einen negativen Einfluss auf die Sporulation zur Folge hat. Unter Sporulationsbedingungen scheint das *atxA*-Repressorprotein aktiver zu sein und reguliert die *atxA*-Expression negativ, was zu verminderten AtxA- und SkiA-Spiegeln und folglich erhöhter Sporulation führt. Beide Kulturbedingungen beinhalten auch externe Signale (Temperatur, Kohlenhydratverfügbarkeit, Redoxpotential), die die *atxA*-Expression nachweislich beeinflussen. Es wird vermutet, dass die erhöhte Expression eines bekannten AtxA-regulierten Sporulationsinhibitors, SkiA, ein Mechanismus ist, der von *B. anthracis* entwickelt wurde, um eine vorzeitige Sporulation während des Infektionsgeschehens zu verhindern.

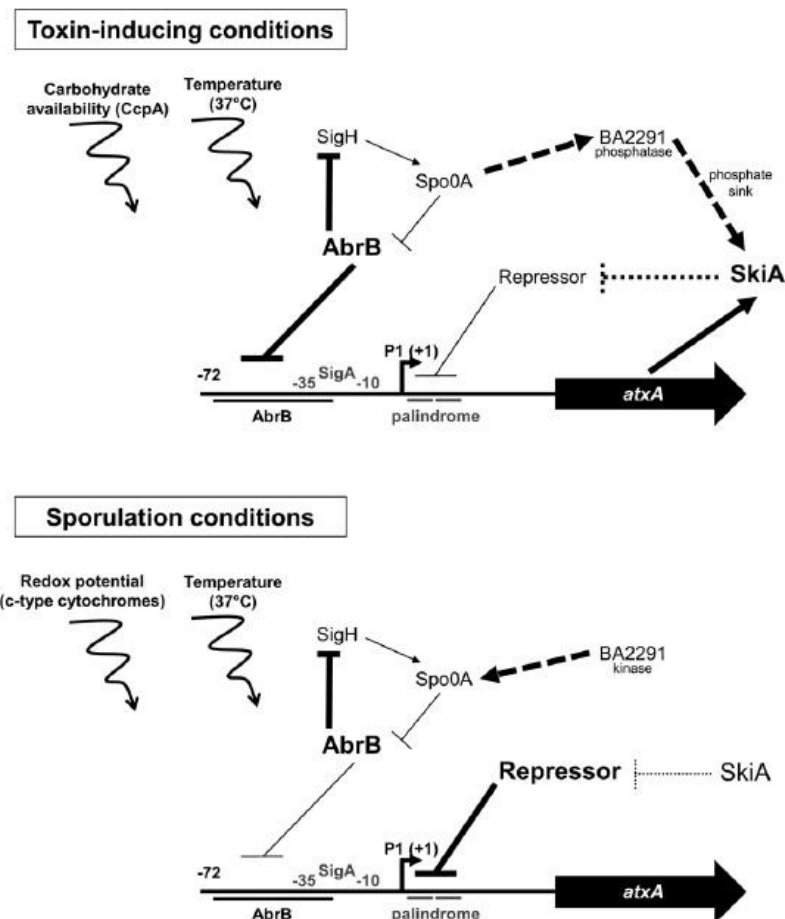


Abbildung 5: Modell für die Regulation der *atxA*-Genexpression unter Toxin-induzierenden und Sporulationsbedingungen

Dale © 2018 Front Microbiol. 9. p. 482

1.3.5.2 Der pleiotrope Regulator PlcR

In *B. cereus* und *B. thuringiensis* reguliert der pleiotrope Regulator PlcR (Phospholipase C Regulator) die Expression der meisten Virulenzfaktoren wie Enterotoxine, Hämolsine, Proteasen und Phospholipasen [77, 78]. Die Transkription von *plcR*, das im Chromosom lokalisiert ist, ist selbstinduzierend und beginnt kurz vor Eintritt in die stationäre Wachstumsphase [79]. PlcR benötigt für seine Funktion PapR. Dieses Protein bindet an PlcR und ist für dessen Aktivierung als Regulator notwendig. In *B. anthracis* verursacht eine Nonsense-Mutation an Nukleotid-Position 640 einen vorzeitigen Translationsstopp des *plcR*-Gens und macht diesen folglich inaktiv. Diese Mutation ist bei keinem anderen Vertreter der *B. cereus*-Gruppe vorhanden [77, 80]. Dementsprechend sekretiert *B. anthracis* keine signifikanten Mengen an abbauenden Enzymen und ist nicht hämolytisch [81]. Das extrazelluläre Proteom von *B. anthracis* ist stark reduziert im Vergleich zu *B. cereus*- und *B. thuringiensis*-Stämmen [82]. Es wird vermutet, dass die ausnahmslos bei allen Vertretern von *B. anthracis* vorkommende Mutation im *plcR*-Gen an einer Inkompatibilität zwischen dem gleichzeitigen Vorhandensein des *plcR*- und *atxA*-Regulons und der Sporulation liegt [58, 81].

Wohingegen *B. cereus* und *B. thuringiensis* für ihre Virulenz auf die PlcR-Aktivität angewiesen sind, werden bei *B. anthracis* die meisten Virulenzfaktoren auf den beiden Virulenzplasmiden kodiert und unabhängig von PlcR exprimiert. Wenn eine funktionelle *plcR*-Genkopie in *B. anthracis* integriert wird, sind die Stämme anschließend hämolytisch und exprimieren die zuvor gehemmten Gene *sfp* (kodiert die Serin-Protease) und *plcA* (kodiert die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C). Allerdings sind diese Stämme nicht mehr in der Lage zu sporulieren [81]. Diese Tatsache führt zur Annahme, dass bei *B. anthracis* ein Selektionsdruck auf eine *plcR*-Mutation vorhanden ist, da durch diese Mutation die Inkompatibilität mit *atxA* überwunden wird und eine Sporulation stattfinden kann [58]. Diese allgemein gültige Theorie kommt jedoch durch die Entdeckung des pXO1-tragenden Stammes *B. cereus* G9241 ins Wanken, da dieser Stamm sowohl *atxA* als auch ein intaktes *plcR*-Gen besitzt, was keinerlei Einfluss auf die Sporulationsfähigkeit hat. Ein modifizierter *B. anthracis* Sterne Stamm ist ebenso in der Lage, trotz eines intakten PlcR-PapR-Komplexes unvermindert zu sporulieren [83].

Die Toxizität von *B. anthracis* mit einem inserierten intakten *plcR*-Gen war im Tierversuch mit Mäusen nicht erhöht, was darauf hindeutet, dass das PlcR-Regulon keinen verstärkenden Effekt auf die Virulenz hat [81]. Daraus lässt sich schließen, dass PlcR zwar für die Pathogenität von *B. cereus*- und *B. thuringiensis*-Stämmen essentiell ist, für die von *B. anthracis* allerdings nicht benötigt wird [10].

1.3.6 Bioterroristische Relevanz

B. anthracis ist einer derjenigen Erreger, die für die biologische Kriegsführung und den Bioterrorismus eine potentielle Rolle spielen. Da der Erreger in betroffenen Ländern aus Tierkadavern relativ leicht zugänglich ist und sehr resistente Sporen bildet, die sich gut lagern und ausbringen lassen, wird *B. anthracis* als Biowaffe oder als bioterroristisch relevanter Erreger gefürchtet [84]. So kam es nach den Anschlägen vom 11. September 2001 in New York an der Ostküste der USA zu 22 Milzbrand-Infektionen, die sich bei 11 Personen über den lebensbedrohlichen Inhalationsweg entwickelten und in deren Folge fünf Todesfälle durch Lungenmilzbrand zu verzeichnen waren. Die Infektionsursache stellten Briefe dar, die mit der amerikanischen Post verteilt wurden und an mehrere Nachrichtensender und Senatoren adressiert waren. Sie enthielten hochreine *B. anthracis*-Sporen als weißes Pulver [85]. Der verwendete Ames-Stamm wurde auf das Labor der US-Armee in Fort Detrick zurückgeführt, jedoch bestehen weiterhin Zweifel an der Herkunft der Milzbrand-Sporen und mutmaßliche Täter konnten nicht eindeutig überführt werden [86].

Bereits im Ersten und Zweiten Weltkrieg wurde das Potential von *B. anthracis* als biologischer Kampfstoff in mehreren Ländern, darunter auch Deutschland, getestet [87]. Ein bekanntes Beispiel ist die britische Insel Guinard Island, auf der während des Zweiten Weltkriegs

Milzbrandbomben gezündet und Schafe artifizuell mit *B. anthracis* infiziert wurden, um die Eignung von Sporen als Biowaffe zu untersuchen. Die infizierten Schafskadaver und verbreiteten Sporen verseuchten den Boden der Insel über 40 Jahre, bis dieser letztlich mit Formaldehyd in großen Mengen Meerwasser dekontaminiert wurde [88, 89].

Die Centers for Disease Control and Prevention (CDC, USA) stufen aufgrund der Eignung von *B. anthracis* als bioterroristisches Agens diesen Vertreter der *B. cereus*-Gruppe in die Kategorie A der bioterroristisch relevanten Erreger und Toxine ein. Agenzien dieser Kategorie sind Bakterien, Viren und Toxine mit höchstem Gefährdungspotential, d.h. sie sind leicht zu verbreiten, verursachen eine hohe Morbidität sowie Mortalität und ein hohes Panikpotential, stellen eine hohe Belastung für das Gesundheitssystem dar und erfordern spezielle Vorbereitungen für das öffentliche Gesundheitswesen [90]. Nach der Biostoffverordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen wird *B. anthracis* der biologischen Risikogruppe 3 (RG 3) zugeordnet. Dazu zählen Organismen, die ernsthafte, auch lebensbedrohliche Erkrankungen hervorrufen können. Die Gefahr einer Verbreitung in der Bevölkerung kann bestehen, die im Fall von *B. anthracis* durch Sporenfreisetzung gegeben ist. Normalerweise sind für RG 3 Erreger effektive Behandlungsmaßnahmen durch eine rechtzeitige Antibiotikatherapie verfügbar.

1.4 *Bacillus cereus* biovar *anthracis*

1.4.1 Herkunft und Verbreitung der afrikanischen *Bacillus*-Isolate

In den Jahren 2001 und 2002 kam es in Regenwaldregionen des Tai Nationalparks in der Elfenbeinküste (CI) unter wilden Schimpansen (*Pan troglodytes verus*) zu mehreren Todesfällen, bei denen die Tiere vermeintlich an Milzbrand verendeten. Innerhalb weniger Stunden kam es zum Tod von scheinbar gesunden Tieren, die an einem akuten bakteriellen Infekt erkrankten [91]. Pathologische und histologische Untersuchungen zweier Kadaver zeigten Blutungen annähernd aller inneren Organe. Die Lunge war zusätzlich von Ödemen und Emphysemen gekennzeichnet. In Gewebeproben konnten Gram-positive, stäbchenförmige Bakterien nachgewiesen und auch rekultiviert werden [62], was auf eine akute Infektion als Todesursache hinwies [91]. Mittels Real-Time PCR konnte das Vorhandensein der *B. anthracis*-spezifischen Genmarker *capC* (Gen für Kapselsynthese) und *pagA* (Gen für Protektives Antigen) nachgewiesen werden, was zunächst auf eine Infektion mit *B. anthracis* schließen ließ [91].

In den Jahren 2004 und 2005 kam es im Dja Reservat in Kamerun (CA) zu weiteren Todesfällen dreier Schimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*) und eines Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). Molekulargenetische Untersuchungen aus Knochen und Muskelgewebe der gefundenen Kadaver führten ebenfalls zum Nachweis von *capC* und *pagA* [92]. Weitere

Analysen zeigten, dass die Stämme aus CI und CA beide Virulenzplasmide von *B. anthracis* besitzen, aber einen chromosomalen Hintergrund aufweisen, der eher auf einen anderen Vertreter der *B. cereus*-Gruppe schließen lässt. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden die gefundenen Isolate aus West- und Zentralafrika zunächst als *B. anthracis*-like [62] und später als *B. cereus variation anthracis* [93] bezeichnet. Auf Empfehlung des NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) und nach Rücksprache mit einem Mitglied des „Subcommittee on the taxonomy of the genus *Bacillus*“ wurde die Bezeichnung in *Bacillus cereus* biovar *anthracis* (*Bcbva*) geändert. Seit den ersten Funden aus dem Jahr 2001 wurden immer wieder entsprechende Isolate in toten Schimpansen, aber auch in anderen Tieren wie Waldantilopen, einem Elefanten, einer Ziege oder Aasfliegen in verschiedenen Ländern wie Liberia, der Zentralafrikanischen Republik (RCA) und der Demokratischen Republik Kongo (DRC) nachgewiesen [94-96] (s. Abbildung 6 C).



Abbildung 6: Herkunft und Verbreitung von *Bcbva*

Aufnahme eines an *Bcbva* verendeten Kadavers im Tai Nationalpark (A) und von dessen Nekropsie (B) sowie eine Karte der Fundstellen von *Bcbva*-Isolaten in Afrika (C).

A und B: Dr. Fee Zimmermann © Vortrag bei Bacillus ACT Conference 2015

C: Antonation © 2016 PLoS Negl Trop Dis. 10(9): p. e0004923

Während vom klassischen *B. anthracis* überwiegend weidende Pflanzenfresser in relativ trockenen Regionen (Savannen) befallen sind, wird *Bcbva* fast ausschließlich bei Wildtieren in Regenwaldgebieten nachgewiesen. Letztere stellen untypische Lebensräume dar, in denen das Auftreten von Milzbrand-Fällen nicht zu erwarten wäre. Bei den betroffenen Arten handelt es sich ebenfalls nicht um Weidetiere, womit die Frage nach den Verbreitungs- bzw. Infektionswegen von *Bcbva* aufkommt, die weitestgehend unklar sind (s. Abbildung 7). Ducker ernähren sich sowohl vom Boden als auch von Aas und könnten auf diese Weise Sporen aufnehmen. Dieses Szenario ist für Schimpansen und Mangaben ebenfalls denkbar, da sie, wenn auch nur gelegentlich, am Boden fressen. Es ist allerdings unklar, wie strikt arboreal lebende Affenarten mit *Bcbva* in Kontakt kommen. Wahrscheinlich werden die Sporen in diesen Fällen mit Blättern oder Früchten aufgenommen, die mit den Ausscheidungen von Aasfliegen kontaminiert sind, die sich von einem infizierten Kadaver ernährt hatten. Es könnte auch sein, dass die Affen die Fliegen direkt verzehren und sich so mit *Bcbva* infizieren. Diese Theorie wird durch den Nachweis von *Bcbva* in Fliegen, die in den Baumkronen gefangen

wurden, unterstützt [96]. Während am Boden die Kadaverablageplätze immer noch die wahrscheinlichsten Infektionsquellen darstellen, tragen Fliegen vermutlich zur *Bcbva*-Übertragung in den oberen Schichten des Regenwaldes bei. Andere mögliche Vektoren wie z.B. Termiten oder Stechinsekten sollten selbstverständlich ebenfalls in Betracht gezogen werden.

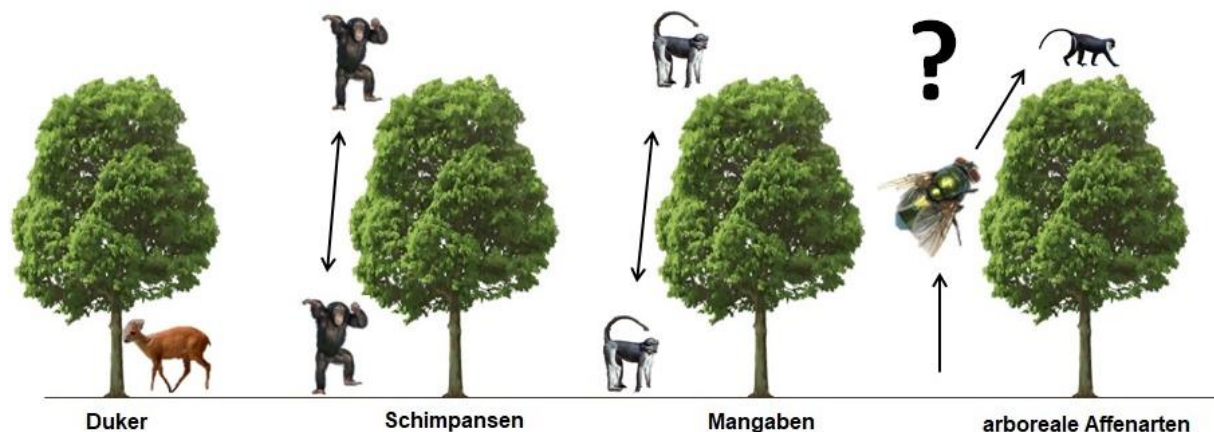


Abbildung 7: mögliche Übertragungswege von *Bcbva* bei den befallenen Tierarten
Dr. Fee Zimmermann © Vortrag bei Bacillus ACT Conference 2015

1.4.2 Einordnung innerhalb der *B. cereus*-Gruppe und Taxonomie

Die in CI und CA entdeckten Isolate werden aufgrund ihrer mikrobiologischen und molekulargenetischen Eigenschaften der *B. cereus*-Gruppe zugeordnet [93]. Die Bezeichnung *Bcbva* rührt daher, dass die Primärisolate eine Anthrax-ähnliche Infektion hervorrufen und im Tierversuch eine mit *B. anthracis* vergleichbare Letalität aufweisen [97]. Genomsequenzierungen ergaben, dass in den *Bcbva*-Isolaten zwei Virulenzplasmide vorliegen, die eine annähernd 100 % Sequenzhomologie zu den Virulenzplasmiden pXO1 und pXO2 von *B. anthracis* aufweisen. In einem Schimpansen-Isolat von der Elfenbeinküste wurde ein drittes, das 14 kbp große Plasmid pCI-14 identifiziert, dessen Funktion unbekannt ist [93]. Das Chromosom hingegen spricht eher für einen anderen Vertreter der *B. cereus*-Gruppe. Die Isolate aus CI und CA sind sich auf bakteriologischer Ebene sehr ähnlich und unterscheiden sich nur leicht in ihren biochemischen Charakteristika und den Antibiotikaresistenzen. Anhand von Vollgenomsequenzierungen mehrerer *Bcbva*-Isolate mittels Next Generation Sequencing konnten über SNP (*single-nucleotide polymorphism*)-basierte phylogenomische Analysen mit der Maximum-Likelihood-Methode die untypischen Isolate in einen Stammbaum eingruppiert werden (s. Abbildung 8). Dabei zeigte sich, dass die afrikanischen Isolate außerhalb des monophyletischen Genclusters von *B. anthracis* liegen. Sie bilden ein separates Gencluster, das von allen zuvor beschriebenen *B. anthracis*-Stämmen getrennt ist [93, 95]. Genetische Analysen bestätigten eine Abgrenzung zu *B. anthracis*, da sie weder die charakteristische

Mutation im *plcR*-Gen noch die vier Prophagen-Regionen im Chromosom besitzen, die für *B. anthracis* als monophyletischen Klon definiert werden [98]. Demnach werden die afrikanischen Isolate als Vertreter von *B. cereus* bezeichnet, deren Plasmide sie verwandtschaftlich zu *B. anthracis* einordnen.

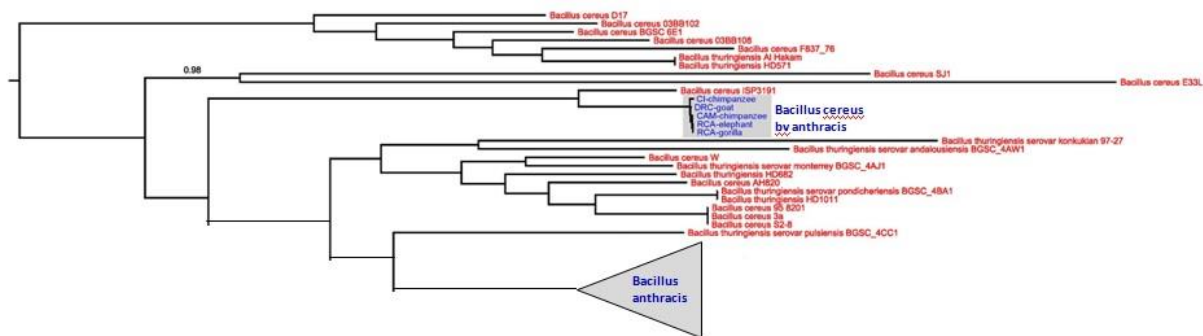


Abbildung 8: Phylogenetische Analyse von *B. cereus* bv *anthracis*

Maximum-Likelihood-Baum basierend auf Kernchromosom-SNP-Daten
modifiziert nach Antonation © 2016 PLoS Negl Trop Dis. 10(9): p. e0004923

1.4.3 Morphologische und molekulargenetische Charakterisierung

Auf mikrobiologischer und molekulargenetischer Ebene weisen die *Bcbva*-Stämme sowohl gravierende Unterschiede als auch bedeutende Gemeinsamkeiten zu Vertretern von *B. anthracis* auf.

Ebenso wie *B. cereus* sind Bakterien des *Bcbva* beweglich und elektronenmikroskopisch konnte eine peritriche Begeißelung nachgewiesen werden. Zusätzlich sind sie resistent gegenüber dem diagnostischen γ -Phagen [62]. Das *Bcbva*-Isolat aus CI ist sensitiv, die Isolate aus den anderen Ländern sind resistent gegenüber Penicillin [62]. In der Real-Time PCR konnte das Vorhandensein der Anthrax-spezifischen Markergene *capC* und *pagA* nachgewiesen werden, und im Southern Blot wurde gezeigt, dass die Marker tatsächlich auf den entsprechenden Plasmiden liegen [62]. Die Amplifikationssignale für den chromosomalen Marker *rpoB* mit der *B. anthracis*-spezifischen Sequenz sind für CI und CA verzögert, was ein charakteristisches Merkmal für *B. cereus*-Stämme ist. Zusätzlich fehlt den afrikanischen Isolaten der *B. anthracis*-spezifische Marker *dhp61* (in einer Prophagen-Region), wodurch eine Abgrenzung gegenüber *B. anthracis* in der Real-Time PCR möglich ist [99, 100]. Nach Anzucht in Bikarbonat-Medium in CO₂-Atmosphäre wurde in den Kulturüberständen der Isolate die Sekretion von PA, LF und EF nachgewiesen, und die Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern bestätigte die Bildung einer Kapsel aus Poly- γ -D-Glutaminsäure wie bei *B. anthracis* [62, 97].

Im Gegensatz zum typischen *B. anthracis* liegt bei *Bcbva* im *plcR*-Gen keine Nonsense-Mutation vor, sondern das Protein hat aufgrund einer Frameshift-Mutation im 3'-Bereich des Gens einen leicht veränderten C-Terminus und ist vier Aminosäuren länger als üblich [93].

Dadurch ist die Interaktion mit PapR gestört und folglich, wie bei *B. anthracis*, sind auch bei *Bcbva* die PlcR-regulierten Gene inaktiv, was sich durch fehlende Hämolyse- und Phospholipase-Aktivität bestätigt.

Im Genom der afrikanischen Isolate wurden sechs genomische Inseln mit Größen zwischen 12 und 22 kbp nachgewiesen, deren Funktion meist unklar ist. Auf einer genomischen Insel, als „Island IV“ bezeichnet, wurden u.a. Gene mit Homologien zu einem Restriktions-Modifikations-System gefunden. Die Sequenzen der genomischen Inseln sind weitgehend spezifisch für *Bcbva* und können zur Etablierung spezifischer PCR-Nachweise genutzt werden, mit denen die Bakterien von *B. anthracis* und anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe unterschieden werden können [93]. Bei *B. anthracis* liegen im Gencluster für die Flagellensynthese mehrere Mutationen vor, während diese Gene bei *Bcbva* intakt sind und somit die Beweglichkeit der Bakterien erklären können [93].

Über die Entstehung von *Bcbva* kann nur spekuliert werden, aber bisherige Daten deuten darauf hin, dass die Virulenzplasmide eines Vorgängers des heute weltweit verbreiteten *B. anthracis* durch horizontalen Gentransfer in einen *B. cereus*-Stamm übertragen wurden. Daraus entwickelte sich ein Cluster innerhalb der *B. cereus*-Gruppe, der getrennt von dem monophyletischen *B. anthracis*-Cluster existiert und möglicherweise besonders an die Bedingungen im tropischen Regenwald angepasst ist [95].

1.4.4 Virulenz und zweiter Kapseltyp

Die Expression der Kapsel- und Toxin-Gene ist bei *Bcbva* wie bei *B. anthracis* über AtxA reguliert und wird durch Wachstum in CO₂-Atmosphäre aktiviert. In Tierversuchen mit Mäusen und Meerschweinchen konnte eine vergleichbare Virulenz der beiden Bakterienspezies gezeigt werden [97]. Im Gegensatz zu *B. anthracis*, bei dem der Verlust des Kapselplasmids zu einer starken Attenuierung führt [20], ist die Virulenz bei *Bcbva* ohne Kapselplasmid pXO2 im Tierversuch nur leicht verringert [97]. Dies beruht auf der Tatsache, dass *Bcbva* die Fähigkeit zur Bildung einer weiteren Kapsel aus dem Polysaccharid Hyaluronsäure besitzt. Diese Hyaluronsäure-Kapsel (HA-Kapsel) wird vom *hasACB*-Operon kodiert und ist bei *B. anthracis* aufgrund einer Frameshift-Mutation im *hasA*-Gen verloren gegangen. Interessanterweise liegt das Gencluster auf dem Toxinplasmid pXO1 und die Synthese der HA-Kapsel wird, wie die Synthese der PDGA-Kapsel, über AtxA reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass *Bcbva* beide Kapseltypen gleichzeitig bildet. Es gibt weitere *B. cereus*-Stämme, bei denen die Gene für eine Hyaluronsäure-Kapsel über PCR oder Sequenzierung nachgewiesen werden konnten, wobei in diesen Stämmen die Expression der Gene bislang nicht verifiziert ist [101]. Die Synthese einer Hyaluronsäure-Kapsel konnte bisher nur bei *Bcbva* und einem weiteren Stamm der *B. cereus*-Gruppe, *B. cereus* G9241, beschrieben werden [102] (s. 1.5).

1.4.5 Das spezifische Antigen pXO2-60

Obwohl es bisher keine Berichte über humane Infektionen mit *Bcbva* gibt, besteht doch eine Gefährdung der Menschen in den betroffenen Regionen durch den Umgang mit bzw. den Verzehr von infiziertem „Bush Meat“. Da sowohl *B. anthracis* als auch *Bcbva* an der Elfenbeinküste vorkommen, ist der Nachweis spezifischer Antikörper für die Durchführung von retrospektiven Seroprävalenzstudien notwendig. Serologische Analysen basierend auf Antikörpern gegen PA oder LF können jedoch nicht zwischen einer Immunantwort gegen *B. anthracis* oder *Bcbva* unterscheiden. Das auf dem Virulenzplasmid pXO2 kodierte Protein pXO2-60 stellt ein *Bcbva*-spezifisches Antigen dar, da es nur in Kulturüberständen von *Bcbva*-Stämmen nachgewiesen werden konnte [103]. Ein 39 aa Signalpeptid wird vom Precursor-Protein abgespalten und das reife 33,5 kDa Protein pXO2-60 wird in den Kulturüberstand sekretiert. Bei *B. anthracis* kommt es aufgrund eines vorzeitigen Stoppcodons in der entsprechenden Sequenz des Signalpeptids nicht zu einer Proteinsekretion. Interessanterweise ist die Expression des *pXO2-60* Gens in *B. anthracis* unter induzierenden Bedingungen in einer *atxA*-Nullmutante 40-fach erhöht im Vergleich zum Wildtyp [104], was auf eine CO₂-abhängige Regulation der Genexpression hindeutet. Ähnliche Ergebnisse wurden für *Bcbva* erzielt, da die Sekretion von pXO2-60 nur nach Wachstum in CO₂-Atmosphäre und nicht unter Umgebungsbedingungen erfolgt [103].

Die Funktion von pXO2-60 im Bakterium ist unklar. Es wird jedoch, basierend auf *in silico* Strukturanalysen, spekuliert, dass das Protein zur Aerolysin-Familie der porenbildenden Toxine gehört [105].

Die spezifische Sekretion von pXO2-60 für *Bcbva* indiziert, dass das Protein ein potenzielles Antigen zur Detektion von Antikörpern gegen das Bakterium darstellt. Die Immunogenität von pXO2-60 konnte in Tierversuchen an Mäusen gezeigt und die Spezifität der Immunantwort mit humanen Kontrollseren bestätigt werden [103]. Eine großflächig angelegte retrospektive Seroprävalenzstudie mit humanen Seren von der Elfenbeinküste ergab, dass die kombinierte PA/pXO2-60 Western Blot-Analyse ein geeignetes Instrument zum zuverlässigen Nachweis von Antikörpern gegen *Bcbva* beim Menschen darstellt, was auf eine Infektion oder Exposition mit diesen Milzbrand-verursachenden Bakterien hinweist [106].

1.5 Untypische pathogene Vertreter der *B. cereus*-Gruppe

In der Vergangenheit haben mehrfach untypische pathogene Nicht-*B. anthracis*-Mitglieder der *B. cereus*-Gruppe, basierend auf plasmidkodierten Virulenzfaktoren, schwere Milzbrand-ähnliche Erkrankungen verursacht.

1994 wurde ein *B. cereus* Stamm (G9241) in den USA aus dem Blut und Sputum eines Patienten isoliert, der an einer schweren Lungenentzündung litt, die in vielerlei Hinsicht dem

Inhalationsmilzbrand ähnelte [61]. Das Bakterium besitzt ein 191 kb großes Plasmid, das zu 99,6% identisch mit dem *B. anthracis*-spezifischen Toxinplasmid pXO1 ist. Obwohl keine Homologe der pXO2-kodierten Kapselgene gefunden wurden, liegt in *B. cereus* G9241 ein Polysaccharidkapsel-Cluster auf einem zweiten Plasmid vor. Wie auch bei *Bcbva* besitzt *B. cereus* G9241 auf dem pXO1-Homolog zusätzlich die Gene für die Hyaluronsäure-Kapsel [102]. Weitere Fälle von milzbrandähnlichen Erkrankungen, die durch *B. cereus*-Stämme mit pXO1-Homologen und verschiedenen Arten von Kapseln verursacht werden, sind seither beobachtet worden [107]. Im Jahr 2003 verursachte *B. cereus* 03BB102 eine tödlich verlaufende Lungenentzündung. Dieser Stamm besitzt ein Plasmid, das sowohl die Gene für das Milzbrandtoxin als auch die Gene für die Kapselsynthese *capABC* trägt [108, 109].

In einer Veröffentlichung über die Charakterisierung von *B. anthracis*-Isolaten aus Rindern in Koza, Kamerun, wurde der Erreger JF3964 beschrieben, der genetische Merkmale von *B. cereus* mit den beiden *B. anthracis*-Virulenzplasmiden kombiniert, was durch eine Southern-Blot-Analyse bestätigt wurde [110]. Das Isolat JF3964 konnte in phylogenetischen Analysen basierend auf MLVA-Resultaten dem gleichen Cluster wie *Bcbva* zugeordnet werden. Weitere phänotypische Eigenschaften, wie z.B. Penicillinresistenz oder Unempfindlichkeit gegenüber dem γ -Phagen, stimmen mit *Bcbva*-Stämmen überein. Das Vorkommen beider für *B. anthracis* charakteristischen Virulenzplasmide in einem nicht-*B. anthracis*-spezifischen genetischen Hintergrund wurde bisher nur in *Bcbva*, dem Isolat JF3964 und dem *B. cereus*-Stamm BC-AK, der 2016 aus einem Känguru in China isoliert wurde, beobachtet [101].

1.6 Bakterielle Endosporen

Die Gram-positiven Bakterien der Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* besitzen die Fähigkeit zur Bildung von Endosporen. Dabei handelt es sich um innerhalb der Mutterzelle gebildete Dauerformen, die eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse wie Hitze, Chemikalien, UV-Strahlung oder Austrocknung besitzen. Sie werden immer dann gebildet, wenn die vegetative Zelle physiologischem Stress wie Nährstoffmangel oder einer hohen Zelldichte ausgesetzt ist. Durch Sporulation gelingt es den Bakterien, teilweise über Jahrzehnte als metabolisch inaktive Ruhestadien zu überdauern.

Endosporen zeichnen sich im Kern durch einen niedrigen Wassergehalt und einer enormen Menge an Dipicolinsäure (DPA), welche chelatiert mit zweiwertigen Calcium-Ionen vorliegt, aus, was für ihre Thermobeständigkeit wichtig ist [111]. Der niedrige Wassergehalt des Sporenkerns ist wahrscheinlich der Hauptgrund für die minimale Stoffwechselaktivität der Sporen [112]. Zudem besitzen Endosporen kleine säurelösliche Sporenproteine (small acid-soluble spore proteins, SASP), die an die DNA der Spore binden und sie so gegenüber

verschiedenen DNA-schädigenden Substanzen wie Chemikalien, UV-Bestrahlung und Hitzebehandlung schützen [111, 113].

Die Versporung einer Kultur von *B. anthracis* setzt bei Nährstoffmangel oder in Sporulationsmedium bei 37 °C bereits nach wenigen Stunden ein und ist nach maximal drei bis sechs Tagen vollständig abgeschlossen, wobei bereits nach 24 Stunden freie Sporen unter dem Mikroskop sichtbar sind. Die Sporen sitzen meist mittelständig und treiben die Mutterzelle nicht auf. Nach Freisetzung der Sporen stirbt die Mutterzelle ab.

Die Spore wird von der äußeren und inneren Sporenhülle („Coat“) und dem Cortex umgeben (s. Abbildung 9). Im Inneren der Spore liegt der Kern („Core“), der das Chromosom enthält. Er wird von einer Membran umgeben, die von einer weiteren, aus Peptidoglycan bestehenden Schicht, dem sog. Cortex umhüllt ist [114]. Die beiden Sporenhüllen bestehen hauptsächlich aus Proteinen und stellen die Barriere gegenüber chemischen Agenzien (z.B. Desinfektionsmittel) oder enzymatischem Abbau (z.B. durch Lysozym) dar [115].

Im Gegensatz zu Sporen von *B. subtilis* besitzen Bakterien der *B. cereus*-Gruppe zusätzlich ein Exosporium, eine ballonartig um die Sporenhülle liegende Struktur, für deren Aufbau weit über 100 Proteine verantwortlich sind, die in der Mutterzelle synthetisiert werden [116]. Die Funktion des Exosporiums ist noch nicht abschließend geklärt, es scheint aber eine Rolle bei der Wechselwirkung mit der Umwelt zu spielen. Die Oberfläche des Exosporiums wird von einem Haar-ähnlichen Flor bedeckt, der hauptsächlich aus dem Collagen-ähnlichen Glycoprotein BclA besteht [114].

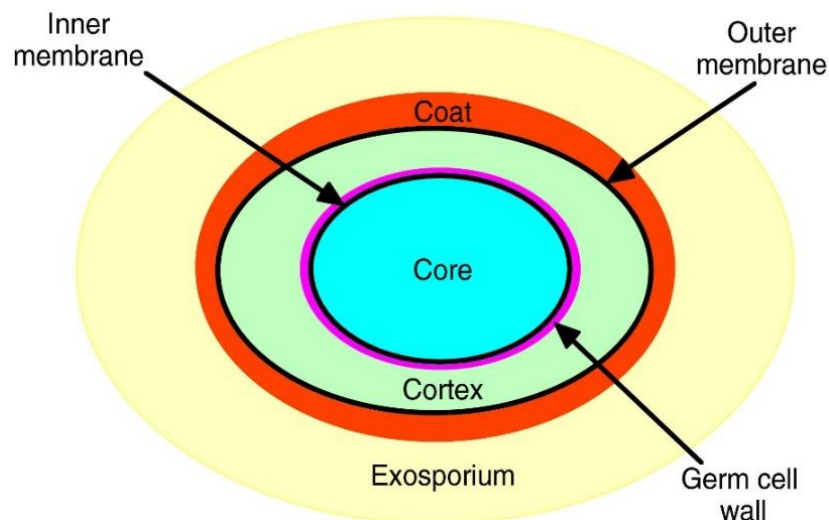


Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer bakteriellen Spore

Setlow © 2018 J. Appl. Microbiol. 126(2): 348-358

Die Sporenkeimung, die die Umwandlung einer ruhenden, metabolisch inaktiven Dauerform in einen metabolisch aktiven Organismus darstellt, ist ein hochkomplexer Prozess in verschiedenen Stufen, der mit dem Vorhandensein geringster Konzentrationen von Keimungsinduktoren beginnt. Die Bindung dieser Moleküle an spezifische

Keimungsrezeptoren an der inneren Sporenmembran führen zu einer Signalkaskade, die den Keimungsprozess in Gang setzt. Dabei wird die äußere Sporenhülle durch enzymatische Abbauprozesse für Ionen, weitere Nährstoffe und Wasser permeabel gemacht. Anschließend wird der Cortex hydrolysiert, die Spore wächst zur vegetativen Zelle aus und bildet eine neue Zellwand [112].

Der Ablauf der Endosporenbildung von der vegetativen Zelle bis zur reifen Endospore ist wie die Sporenkeimung ein komplexer Prozess und wurde vor allem am Modelkeim *B. subtilis* 168 untersucht [117]. Unter wachstumslimitierenden Bedingungen wird der Sporulationsprozess in den vegetativen Zellen eingeleitet. Der Metabolismus wird während der Sporenbildung minimiert und die zeitliche Abfolge der Expression der mRNAs, die für die Entwicklung der Spore verantwortlich sind, durch eine Kaskade von Sigma-Faktoren koordiniert [118]. Die Bildung der Spore wird in mehrere Entwicklungsstadien unterteilt (s. Abbildung 10) [115]. Der Übergang vom vegetativen Wachstum, bei dem der Sigma-Faktor σ^A aktiv ist, zur Sporulation wird im Wesentlichen durch den übergeordneten Regulator Spo0A bestimmt. Die Aktivierung von Histidinkinasen (u.a. KinA, KinB und KinC), die auf unterschiedliche Stressfaktoren reagieren, führt zu einer Phosphorylierung jenes Haupt-Transkriptionsfaktors, dessen Phosphorylierungszustand seine Aktivität steuert und der für die Regulation der Genexpression relevant ist. Im ersten Stadium der Sporulation verdoppelt sich das Chromosom, um sich im späteren Verlauf auf die Mutterzelle und die sog. Vorspore zu verteilen. Diese morphologische Differenzierung resultiert aus der asymmetrischen Teilung der Mutterzelle im zweiten Stadium, wobei sich das zunächst mittig lokalisierte Septum zu einem der Zellpole verschiebt. Es unterscheidet sich von dem Septum der symmetrischen Zellteilung durch eine dünnere Schicht Peptidoglykan.

In der Vorspore kommt es zur Aktivierung von σ^F , das zuvor durch den anti-sigma Faktor SpoIIAB inaktiviert wird. Der pleiotrope Regulator SpoVG beeinflusst durch positive Regulation SpoIIIE, das auch bei der Verschiebung des Septums eine ausschlaggebende, aber noch nicht vollständig verstandene Rolle spielt. SpoIIIE dephosphoryliert daraufhin SpoIIAA, das wiederum zur Freisetzung von SpoIIAB führt. σ^F reguliert die Expression von SpoIIR in der Vorspore. Das Protein wird in den Intermembranraum zwischen Mutterzelle und Vorspore sekretiert und aktiviert dort SpoIIGA, das die Aktivierung des zweiten σ -Faktors σ^E in der Mutterzelle auslöst. Durch die im dritten Stadium folgende Transkription des σ^E -Regulons werden in der Mutterzelle die Gene für die Regulatorproteine SpoIIID und GerR aktiviert und es erfolgt die Expression der für das Engulfment nötigen Proteine. Bei diesem Schritt wird die Vorspore vollständig von der Mutterzelle umschlossen, wodurch sich eine Doppelmembran um die Vorspore bildet. Durch einen Reißverschlussmechanismus werden die Mutterzelle und die Vorspore voneinander getrennt, indem die Membranen voneinander geteilt werden und die Vorspore nun am Ende des Engulfments („late sporulation“) frei im Cytosol der Mutterzelle

liegt. Der Abschluss des vierten Stadiums führt zur Aktivierung von σ^G in der Vorspore, der die Protease SpoIVFB reguliert und diese wiederum das inaktive Precursor Protein σ^K in der Mutterzelle aktiviert. Durch die Aktivität von σ^K werden etwa 100 Gene aktiviert, darunter einige, die für Proteine der Sporenhülle kodieren sowie das Regulatorgen *gerE* [119]. Produkte der σ^K - und σ^E -kontrollierten Gene synthetisieren den Cortex (u.a. MurF) und setzen die Sporenhülle zusammen (u.a. CotD, CotE, CotZ), bevor die reife, dormante Spore im Stadium der Mutterzell-Lyse freigesetzt wird.

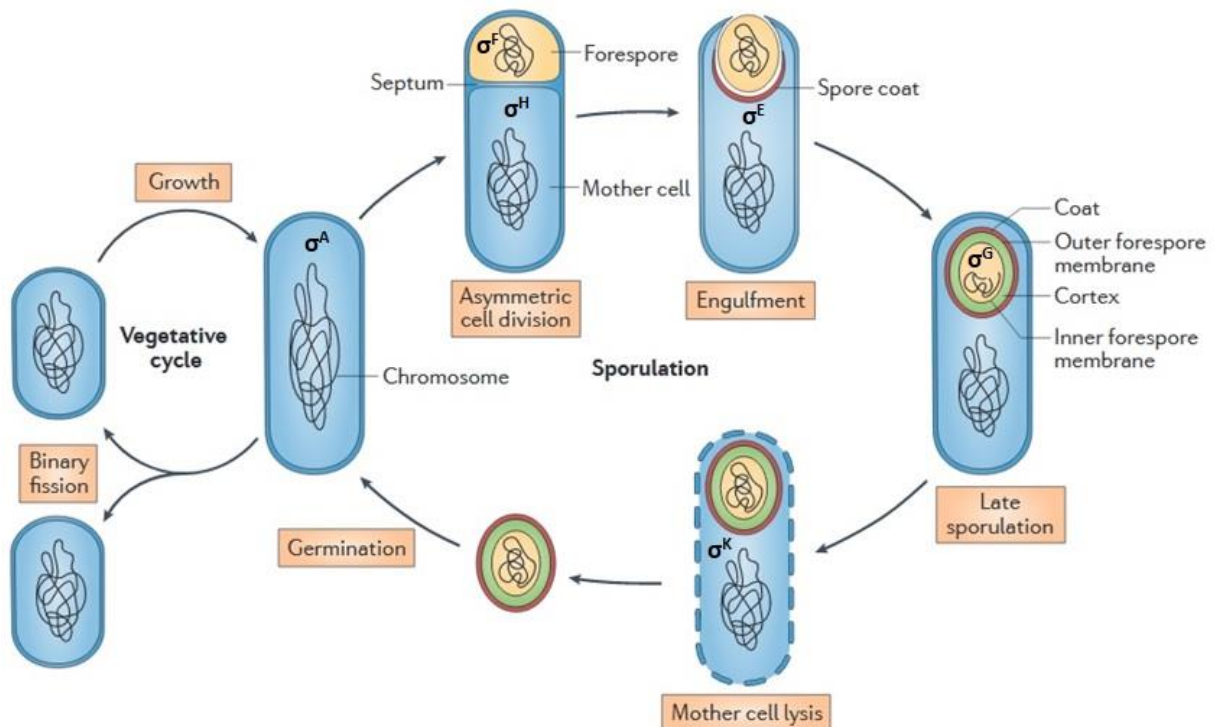


Abbildung 10: Lebenszyklus von *Bacillus* mit Keimung, vegetativem Wachstum und den morphologischen Veränderungen im Sporulationsprozess

Die sigma-spezifischen Transkriptionsfaktoren sind an diesen Prozessen beteiligt. modifiziert nach McKenney © 2013 Nat Rev Microbiol. 11(1): p. 33-44 [120]

Eine Schlüsselstelle bei der Sporulation nimmt der Sigma-Faktor σ^K ein. Im *sigK*-Gen von *B. subtilis* ist ein 48 kbp großes *skin*-Element inseriert [121], bei dem es sich vermutlich um ein Phagen-ähnliches Element handelt, da die Mehrzahl seiner Gene für Phagenproteine kodiert. Bevor das Gen transkribiert wird, wird das *skin*-Element durch einen reziproken, ortsspezifischen Rekombinationsvorgang im Bereich eines invertierten Repeats ausgeschnitten [122], bei dem die kodierenden Bereiche des *sigK*-Gens verknüpft werden und die Insertion in Form eines zirkulären Moleküls aus dem Chromosom entfernt wird [123]. Die dafür verantwortliche Rekombinase SpoIVCA wird ebenfalls auf dem *skin*-Element kodiert. Da der Rekombinationsvorgang nur in der Mutterzelle stattfindet, erhält die Spore ein *sigK*-Gen, in dem das *skin*-Element noch vorhanden ist. Der Regulator SpoIIID aktiviert die Transkription der *spoIVCA*- und *sigK*-Gene [124], wodurch ein σ^K Precursor-Protein gebildet wird.

Anschließend wird das inaktive Pro- σ^K durch die membrangebundene Protease SpoIVFB aktiviert, die durch σ^G in der Vorspore aktiviert wird [115].

Anhand von Vollgenom-Sequenzierungen stellte sich heraus, dass *Bcbva* wie *B. subtilis* im essentiellen Sporulationsgen *sigK* eine 22 kb große Insertion besitzt, die während des Sporulationsvorganges mit Hilfe einer Rekombinase ausgeschnitten wird. Die Insertion ist jedoch an einer anderen Stelle im Gen inseriert und die Sequenz deutet nicht auf ein Phagen-ähnliches Element hin. Neben der Rekombinase werden durch die Insertion auch ein Restriktions-/Modifikationssystem und mehrere hypothetische Proteine kodiert [93]. Eine Analyse der Genom-Datenbank ergab, dass nur beim Stamm *B. cereus* AH820 ebenfalls eine *sigK*-Insertion vorkommt. Im Gegensatz dazu besitzen alle anderen Stämme der *B. cereus*-Gruppe inkl. *B. anthracis* diese Insertion im *sigK*-Gen nicht.

Um die Sporulation anzuregen, ist vermutlich nicht die Zufuhr von Sauerstoff notwendig, sondern eine Reduktion des CO_2 -Partialdruckes, wie sie z.B. nach dem Öffnen des Kadavers eines an Milzbrand verendeten Tieres auftritt [125]. Die Sporulation ist unter anaeroben im Vergleich zu aeroben Bedingungen verringert [126]. Es ist bekannt, dass die Inkubationsbedingungen zur Herstellung der Sporen (z.B. flüssiges vs. festes Medium, anaerob vs. aerob) einen Einfluss auf die Widerstandsfähigkeit der Sporen (Tenazität) gegenüber Hitze, UV-Strahlung oder chemische Agenzien haben [126, 127].

1.7 Methoden zur Analyse der Genexpression

Die Messung der Expression von Genen eines Organismus in verschiedenen Geweben unter verschiedenen Bedingungen bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten gibt Aufschluss darüber, wie Gene reguliert werden und kann Details über die Biologie jenes Organismus offenbaren. Die Genexpressionsanalyse kann sowohl für einzelne RNA-Transkripte als auch für das ganze Transkriptom angewendet werden und ermöglicht qualitative und quantitative Aussagen über die Aktivität der Gene. Der Informationsgehalt eines Organismus ist in der DNA seines Genoms gespeichert, die bei Prokaryoten während der Transkription in mRNA umgeschrieben wird, wobei nur benötigte DNA-Abschnitte abgelesen werden und das Transkriptom (Gesamtheit aller RNA-Spezies einer Zelle zu einem gegebenen Zeitpunkt) bilden. Darauf folgt die Translation der synthetisierten RNA in Proteine oder die direkte Funktion als regulatorische RNA. Somit stellt die mRNA ein Bindeglied zwischen dem Genom und der Umsetzung der genetischen Information dar.

Auf dem Gebiet der Transkriptomanalyse finden heutzutage zwei Schlüsseltechniken Anwendung: Microarrays, die einen Satz vorgegebener Sequenzen quantifizieren, und die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq), die mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung alle Sequenzen erfasst. Bei Microarrays handelt es sich um eine hybridisierungsbasierte Methode, die zwar relativ kostengünstig ist, aber Limitierungen im Bereich von hohen Hintergrundsignalen oder

Sättigungen bedingt durch Kreuzhybridisierungen aufweist. Dagegen stellt die RNA-Sequenzierung eine sequenzbasierte Methode dar, die im Vergleich zu Microarrays die Betrachtung differentieller Expressionen in einem viel breiteren dynamischen Bereich, die Untersuchung von DNA-Variationen (SNPs, Insertionen, Deletionen) und sogar die Entdeckung neuer Gene oder alternativer Spleißvarianten mit nur einem Datensatz ermöglicht [128]. Genexpressionsanalysen individueller RNA-Transkripte wurden jedoch schon mehrere Jahrzehnte vor der Verfügbarkeit jener Transkriptomtechniken durchgeführt. Eine der wichtigsten Methoden, die auch heute noch verbreitet angewandt wird, stellt der Northern-Blot dar. Die Quantifizierung einzelner Transkripte durch Nylonmembran-Arrays und später quantitativer reverser Transkriptase-PCR (qRT-PCR) waren bzw. sind bis heute ebenfalls beliebte Methoden, mit denen allerdings nur ein winziger Teilbereich eines Transkriptoms erfasst werden kann [129]. Folglich blieb die Art und Weise, wie ein Transkriptom als Ganzes exprimiert und reguliert wird, unbekannt, bis Hochdurchsatz-Sequenzierungstechniken entwickelt wurden. Dennoch werden die älteren Verfahren weiterhin als Kontrollverfahren für neuere Methoden angewendet.

1.8 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, vergleichende Analysen des neuartigen Erregers *Bacillus cereus* biovar *anthracis* und dem klassischen *B. anthracis* unter wirtsähnlichen Bedingungen und unter Sporulationsbedingungen durchzuführen, um Ähnlichkeiten und Unterschiede hinsichtlich der Pathogenitätsmechanismen dieser beiden Milzbranderreger zu identifizieren.

Dafür sollte zunächst eine vergleichende Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung nach Kultivierung unter zwei verschiedenen Wachstumsbedingungen (Umgebungsbedingung vs. wirtsähnliche Bedingung) erfolgen, die einen umfassenden Überblick auf der Grundlage der globalen Genexpression liefert und es ermöglicht, die Bedeutung verschiedener regulierter Gene detaillierter beurteilen zu können. Die Anzucht unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen sollte dabei mögliche Umwelteinflüsse widerspiegeln, um deren Einfluss auf den Metabolismus und besonders die Virulenzmechanismen der Bakterien zu berücksichtigen. Von besonderem Interesse war hierbei die Genexpression bei Wachstum in CO₂-Atmosphäre mit Bikarbonat, da unter diesen Bedingungen die Bakterien bekanntermaßen die größten Mengen an Virulenzfaktoren produzieren (u.a. Toxine und Kapsel).

Die Analyse des Proteoms komplettiert neben den Transkriptomanalysen das Gesamtbild eines Organismus auf molekularer Ebene, weshalb in dieser Arbeit zusätzlich die Gesamtheit aller Proteine der Zellen aus Koloniematerial (Gesamtproteomanalyse) und die Gesamtheit aller sekretierten Proteine aus Kulturüberständen (Sekretomanalyse) von *Bcbva* und *B. anthracis* untersucht werden sollten. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in beiden Fällen ebenfalls unter induzierenden Bedingungen, um die biologischen Prozesse im Wirt weitestgehend zu simulieren. Die Analysen des Sekretoms sollten zur Identifikation weiterer *Bcbva*-spezifischer Proteine führen, die als potentielle Antigene fungieren und zukünftig neben pXO2-60 in spezifischen serologischen Assays für den Nachweis von anti-*Bcbva* Antikörpern zum Einsatz kommen könnten.

Ein weiterer Fokus der Arbeit sollte auf der Untersuchung der Sporenbildung liegen. Die Expression und Regulation ausgewählter Sporulationsgene sollte mittels quantitativer reverser Transkriptase-PCR näher betrachtet und die Analysen durch elektronenmikroskopische Aufnahmen des Sporulationsvorganges ergänzt werden.

Die Identifizierung von Ähnlichkeiten und Unterschieden von *Bcbva* zum klassischen *B. anthracis* soll dazu beitragen, wichtige evolutionäre und ökologische Fragen bezüglich dieses neuartigen Erregers zu klären und langfristig das durch diese hoch pathogenen Bazillen verursachte Risiko für Wildtiere, Haustiere und Menschen besser einschätzen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme und deren Eigenschaften sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 1: verwendete Bakterienstämme

Stamm	relevante Eigenschaften / Plasmide	Herkunft und Referenz	RG
<i>B. anthracis</i> Vollum (= ATCC 14578)	Wildtyp / pXO1 ⁺ , pXO2 ⁺	W. Beyer [130], Universität Hohenheim, D	RG 3
<i>B. anthracis</i> 14RA5914 Dobichau	Wildtyp / pXO1 ⁺ , pXO2 ⁺	Isolat Milz (Kuh), Mandy Elschner [131], Friedrich-Löffler-Institut, D	RG 3
<i>B. anthracis</i> Sterne (34F2)	Impfstamm / pXO1 ⁺ , pXO2 ⁻	W. Beyer [130], Universität Hohenheim, D	RG 2
<i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> „CI“	Wildtyp / pBCXO1 ⁺ , pBCXO2 ⁺ (Plasmide homolog zu pXO1 und pXO2), pCI-14	Isolat Milz (Schimpanse „Leo“), ZBS 2, RKI [91, 93], D	RG 3
<i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> „CI-H“	$\Delta hasA$ (keine HA-Kapsel) / pBCXO1 ⁺ , pBCXO2 ⁺	Deletionsmutante aus CI, Institut Pasteur Paris [97], F	RG 3
<i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> „CI-12“	<i>spo0A</i> -Sporulationsmutante / pBCXO1 ⁺ , pBCXO2 ⁺	Subklon aus CI, ZBS 2, RKI, D	RG 3
<i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> „CI-R“	keine PDGA-Kapsel / pBCXO1 ⁺ , pBCXO2 ⁻	Subklon aus CI, ZBS 2, RKI, D	RG 3
<i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> „CA“	Wildtyp / pBCXO1 ⁺ , pBCXO2 ⁺	Isolat Knochen (Schimpanse), ZBS 2, RKI [62, 91, 95], D	RG 3
<i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> „CA-H“	$\Delta hasA$ (keine HA-Kapsel) / pBCXO1 ⁺ , pBCXO2 ⁺	Deletionsmutante aus CA, Institut Pasteur Paris [97], F	RG 3
<i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> „CA-2“	<i>spoVG</i> -Sporulationsmutante / pBCXO1 ⁺ , pBCXO2 ⁺	Subklon aus CA, ZBS 2, RKI, D	RG 3
<i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> „CA-R“	keine PDGA-Kapsel / pBCXO1 ⁺ , pBCXO2 ⁻	Subklon aus CA, Institut Pasteur Paris [97], F	RG 3
<i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> „CAR-H“	$\Delta hasA$ (keine HA- und PDGA-Kapsel) / pBCXO1 ⁺ , pBCXO2 ⁻	Deletionsmutante aus CA, Institut Pasteur Paris [97], F	RG 2

2.2 Chemikalien, Nährmedien und Wachstumsbedingungen

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (s. Tabelle 2) und Nährmedien (s. Tabelle 3) aufgeführt.

Tabelle 2: verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acrylamidlösung	Carl Roth, Karlsruhe, D
Agarose MEE0 Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Merck Chemicals, Darmstadt, D
2-Chloracetamid	Merck Chemicals, Darmstadt, D
DEPC-Wasser	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe, D
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, D
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glutardialdehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, D
Histidin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Lecitin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogenkarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe, D
SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, D
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trifluoressigsäure (Uvasol® for Spectrometry)	Merck, Darmstadt, D

Tris(2-carboxyethyl)phosphin	Merck, Darmstadt, D
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tryptone Soya Broth	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, D
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tween 80	Carl Roth, Karlsruhe, D

Tabelle 3: verwendete Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
Luria Bertani (LB)-Medium [132]	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l H ₂ O _{bidest.} ; pH 7,0
Luria Bertani (LB)-Agar [132]	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar ad 1 l H ₂ O _{bidest.} ; pH 7,0
Columbia-Blutagar [133]	39 g Columbia Blutagar-Basis 23 g Pepton 1 g Stärke 5 g NaCl 15 g Agar ad 1 l H ₂ O _{bidest.} ; pH 7,0
Brain Heart Infusion (BHI)	37 g Bacto™ Brain Heart Infusion ad 1 l H ₂ O _{bidest.}
Medium G [134]	2,0 g Hefeextrakt 0,025 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0,5 g K ₂ HPO ₄ 0,2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,05 g MnSO ₄ x 4 H ₂ O 2,0 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 µl 5 % (w/v) ZnSO ₄ x 7 H ₂ O 100 µl 5 % (w/v) CuSO ₄ x 5 H ₂ O 100 µl 0,5 % (w/v) FeSO ₄ x 7 H ₂ O ad 1 l H ₂ O _{bidest.} ; pH 7,1
R-Minimalmedium [135]	Aminosäure-Lsg. (2x): 260 mg Glycin 30 mg CaCl ₂ x 2 H ₂ O 3,6 mg MnSO ₄ x H ₂ O 4 mg Thiamin HCl 70 mg MgSO ₄ x 7 H ₂ O 5,6 mg Uracil

	<p>8,4 mg Adeninsulfat 920 mg Lysin 920 mg Leucin 480 mg Threonin 736 mg Asparaginsäure 172 mg Prolin 500 mg Arginin HCl ad 2 l H₂O_{bidest}; autoklavieren 15 min 121 °C</p> <p>1 M KK₂-Puffer: 500 mL 1M K₂HPO₄ 50 mL 1M KH₂PO₄ pH 8,0 einstellen</p> <p>R-Minimalmedium: 500 ml AS-Lsg (2x) 50 ml KK₂-Puffer 5 mL Glukose 50 % (w/v) 4 g NaHCO₃ 140 mg Tryptophan 100 mg Cystein ad 1 l H₂O_{bidest}; sterilfiltrieren</p>	<p>576 mg Tyrosin 692 mg Valin 680 mg Isoleucin 292 mg Methionin 2,45 mg Natriumglutamat 220 mg Histidin HCl 940 mg Serin</p>
R-Minimalmedium-Agar	<p>500 ml AS-Lsg (2x) 15 g Agar 450 ml VE-Wasser autoklavieren 15 min 121 °C KK₂-Puffer und Zusätze sterilfiltrieren 50 ml KK₂-Puffer 5 mL Glukose 50 % (w/v) 4 g NaHCO₃ 140 mg Tryptophan 100 mg Cystein Lösungen unter sterilen Bedingungen zusammenfügen</p>	
TSB/3-fach Enthemmer / Neutralisationsmedium [136]	<p>30 g Tryptone Soya Broth 30 g Histidin 9 g Lecitin 90 ml Tween 80 ad 1 l H₂O_{bidest}, autoklavieren 20 min 121° C</p>	

Alle Nährmedien, außer der TSB/3-fach Enthemmer (Neutralisationsmedium), wurden von der Nährbodenzentrale des Robert Koch-Institutes bereitgestellt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert sowie bei 4 °C aufbewahrt. Nährmedien mit Natriumbikarbonat (außer R-Minimalmedium und R-Minimalmedium-Agar) wurden kurz vor Versuchsansatz mit der

entsprechenden Menge der 8 % sterilfiltrierten Natriumbikarbonat-Stammlösung versetzt, sodass eine Endkonzentration von 0,8 % Natriumbikarbonat im Medium vorlag.

Die Kultivierung der bakteriellen Zellen erfolgte in BHI-, R-Minimalmedium oder Medium G bzw. auf LB-, R-Minimalmedium- oder Columbia Blutagar-Platten bei 37 °C. Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm (rounds per minute) schüttelnd inkubiert, sofern nicht anders angegeben. Unter wirtsähnlichen Bedingungen wurden die Kulturen zusätzlich zur Supplementierung mit Natriumbikarbonat in Gegenwart von 5 % CO₂ inkubiert.

2.3 Enzyme und molekularbiologische Kits

In der folgenden Tabelle sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme, Systemlösungen und Kits aufgelistet.

Tabelle 4: verwendete Enzyme und Kits

Enzym/Kit	Hersteller
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Agilent HS RNA Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DNase I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
DNeasy® Blood & Tissue Kit	QIAGEN, Hilden, D
Lysozym	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina®	New England Biolabs, Ipswich, USA
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce™ Silver Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteinase K	QIAGEN, Hilden, D
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Ribo-Zero® rRNA Removal Kit (Gram-Positive Bacteria)	Illumina, San Diego, USA
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden, D
RNeasy MinElute Cleanup Kit	QIAGEN, Hilden, D
RNA HS Assay Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
SYBR® Green I PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
DreamTaq Green DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
TaqMan® Environmental Mastermix 2.0	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Trypsin Gold (Mass Spectrometry Grade)	Promega, Fitchburg, USA

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Stammhaltung

Aufgrund der begrenzten Lebensfähigkeit von Bakterien in Nährmedien oder auf Agarplatten und der möglichen Sporenbildung wurden zum längeren Aufbewahren von Bakterienstämmen Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 0,8 ml einer Übernachtskultur mit 0,2 ml sterilem Glycerin (100 %) gemischt und bei -80 °C eingefroren. Zudem wurden die Bakterienstämme mit Hilfe des Cryobank-Systems Mast Diagnostica (Reinfeld) archiviert. Die Bakterienkulturen sind bei diesem System an Keramikkügelchen gebunden und werden bei -80 °C gelagert. Die Archivierung erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls.

2.4.2 Sterilkontrollen

Um Probenmaterial aus dem Labor der Sicherheitsstufe 3 ausschleusen und in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 weiter bearbeiten zu können, wurde stets eine Sterilkontrolle durchgeführt. Je nach Inaktivierungsverfahren wurde jeweils ein Zehntel des Probenvolumens des auszuschleusenden Materials in LB-Flüssigmedium oder in TSB/3-fach Enthemmer gegeben und für 48 Stunden bzw. 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Material mit einem Volumen bis zu 100 µl wurde dabei in 2 ml Medium inkubiert. Material mit einem Volumen über 100 µl wurde hingegen in 10 ml Medium inkubiert. Von diesen Anreicherungen wurden anschließend 100 µl auf Columbia-Blutagar oder LB-Agar ausgestrichen und für weitere 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. War danach kein lebendes Erregermaterial nachweisbar, wurde das Probenmaterial aus dem Sicherheitslabor ausgeschleust.

2.4.3 Wachstumskurven

Die Aufzeichnung der Wachstumskurven erfolgte über die Dichtebestimmung mittels Photometer (Eppendorf Biophotometer® Plus, Hamburg, D). Die Kultivierung der Bakterien fand zunächst auf Columbia Blutagar statt, wobei für jeden Versuch die Stämme erneut aus der Kryokultur ausgeimpft wurden. Nach Inkubation bei 37 °C ü.N. wurde am nächsten Tag eine 3 ml LB- oder BHI-Vorkultur in 15 ml Rundboden-Röhrchen (TPP, Trasadingen, CH) mit einer frisch gewachsenen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die 20 ml Hauptkulturen mit den entsprechenden Medien (BHI-, R-Minimalmedium oder Medium G) wurden entweder mit einer 1:25 Verdünnung der jeweiligen Vorkultur inokuliert oder mit der entsprechenden Menge an Vorkultur auf eine Optische Dichte bei Licht der Wellenlänge 600 nm (OD_{600}) von 0,03-0,05 eingestellt. Die Bebrütung fand bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd in einem 125 mL-Erlenmeyerkolben mit Belüftungsdeckel (Corning, über VWR, Darmstadt, D) statt. Je nach Versuchsansatz wurden die Kulturen in atmosphärischem

Sauerstoff oder mit einer Kombination aus 0,8 % Natriumbikarbonat und 5 % CO₂ angezogen. Ab dem Zeitpunkt des Beimpfens der Hauptkultur (t_0) wurde stündlich über einen Zeitraum von 6-8 Stunden die OD₆₀₀ mit 100 µl der Bakterienkultur im Vergleich zum Leerwert (nicht beimpftes Medium) in einer Einmal-Küvette (Eppendorf UVette® 220 nm – 1.600 nm, Hamburg, D) gemessen. Bei der Aufzeichnung der Wachstumskurve in R-Minimalmedium wurde zusätzlich die OD₆₀₀ nach 24 Stunden gemessen, da die Bakterien, bedingt durch das proteinfreie Medium, langsamer wachsen und die stationäre Phase nach 8 Stunden noch nicht erreicht werden kann.

2.4.4 Herstellung von Kulturüberständen und bakteriellem Zellmaterial

Für die Herstellung von Kulturüberständen von *Bacillus* wurden die Stämme zunächst in Vorkultur gebracht, indem 3 ml R-Minimalmedium mit einer frischen, auf Columbia Blutagar gewachsenen Einzelkolonie beimpft wurden. Nach schüttelnder Inkubation ü.N. bei 37 °C wurden 800 µl der Bakteriensuspension in 40 ml R-Minimalmedium (1:25) mit 0,8 % Natriumbikarbonat überimpft und für weitere 20 Stunden in 250 ml-Erlenmeyerkolben mit Belüftungsdeckel (Corning, über VWR, Darmstadt, D) bei 37 °C kombiniert mit 5 % CO₂ schüttelnd inkubiert. Die Ernte der Kulturüberstände (KÜS) erfolgte durch die Zentrifugation der gesamten Bakteriensuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Carl Roth, Karlsruhe, D) für 60 min bei 4 °C und 16000 x g im Festwinkelrotor (Eppendorf Rotor FA-45-6-30, Hamburg, D). Nach Überführen der Überstände in frische Zentrifugenröhrchen wurden diese mittels 50 ml-Spritzen (Omnifix, Braun, Melsungen, D) und aufschraubbaren Filteraufsätzen (Schleicher & Schuell, Dassel, D) zunächst durch 0,45 µm und danach nochmals durch 0,22 µm sterilfiltriert. Nach Abnahme von Kulturmaterial für Sterilkontrollen in LB-Medium (s. 2.4.2) wurden alle Ansätze zu je 5 ml aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

Für den Kapselnachweis mittels Alcianblaufärbung wurden zusätzlich sterilfiltrierte Überstände von resuspendiertem Koloniematerial hergestellt. Die Stämme wurden zunächst von Columbia Blutagar auf R-Minimalmedium-Agar überimpft und ü.N. bei 37 °C kombiniert mit 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde eine Öse Koloniematerial in 500 µl PBS resuspendiert und die Suspension für mind. 20 min bei 12000 x g (Tischzentrifuge Eppendorf, Hamburg, D) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in 0,22 µm Sterilfiltern (Merck Millipore Ultrafree™-MC, Darmstadt, D) für 4 min bei 12000 x g sterilfiltriert [97]. Das entstandene Pellet wurde zur schonenden Inaktivierung zunächst mit 1 ml 4 % Paraformaldehyd (pFA) versetzt, um bakterielles Zellmaterial für den Kapselnachweis mittels Tuschefärbung herzustellen. Nach Inkubation bei 4 °C ü.N. wurde der Ansatz bei 12000 x g für 15 min zentrifugiert, das pFA vollständig abgenommen und das Pellet mit 1 ml 10 % Formaldehyd (FA) versetzt. Die Inaktivierung erfolgte schüttelnd bei 400 rpm (Eppendorf ThermoMixer® C, Hamburg, D) ü.N. bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde der Ansatz erneut bei 12000 x g für 20 min

zentrifugiert, das FA vollständig abgenommen und das Pellet in 1,1 ml PBS resuspendiert. Abschließend wurden die Sterilkontrollen in TSB/3-fach Enthemer durchgeführt.

2.4.5 Wachstumsbedingungen für die RNA-Sequenzierung

Zur Untersuchung der Transkriptome von *Bcbva* und *B. anthracis* wurde die Methode der RNA-Sequenzierung (s. 2.5.5) angewandt. Die Bakterien wurden dafür unter zwei verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert und anschließend eine RNA-Extraktion (s. 2.5.3.1) durchgeführt.

Für das Experiment wurden die zu untersuchenden Stämme in flüssigem BHI-Medium angezüchtet. Zuerst wurde eine bakterielle Vorkultur in 4 ml BHI-Medium aus einer frisch auf Columbia-Blutagar gewachsenen Einzelkolonie erstellt und für 14 bis 18 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit 800 µl dieser Vorkultur wurden anschließend 20 ml BHI-Medium (1:25 Verdünnung) angeimpft und die Optische Dichte gemessen, um eine gleiche Start-OD der Kulturen zu gewährleisten. Pro Stamm wurden jeweils drei Kulturen bei „Umgebungsbedingung“ (37 °C, als O₂-Bedingung bezeichnet) und drei Kulturen unter „wirtsähnlicher Bedingung“ (BHI mit 0,8 % Natriumbikarbonat und 37 °C kombiniert mit 5 % CO₂, als CO₂-Bedingung bezeichnet) inkubiert, sodass pro Stamm für die zwei Wachstumsbedingungen jeweils drei biologische Replikate untersucht werden konnten. Nach 4,5 Stunden Wachstum wurde von jeder Kultur ein 3 ml Aliquot entnommen und bei 12000 x g für 10 min pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde aus dem Bakterienpellet die RNA extrahiert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da er den Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase markiert und zuvor über die Aufzeichnung von Wachstumskurven (s. 2.4.3) unter den gleichen Kultivierungsbedingungen ermittelt wurde.

2.4.6 Sporulationsexperimente

Um die Sporulation von *Bcbva* im Vergleich zu *B. anthracis* zu untersuchen, wurden Sporulationsexperimente in Medium G mit anschließender RNA-Extraktion durchgeführt. Bei der Analyse sollten verschiedene Gene, die in den unterschiedlichen Stadien der Versporung exprimiert werden, mittels quantitativer reverser Transkriptase-PCR genauer betrachtet werden. Für die Sporulationsexperimente wurden die zu untersuchenden Stämme in flüssigem Medium G angezogen. Zuerst wurde stets eine bakterielle Vorkultur in 4 ml LB-Flüssigmedium aus einer frisch auf Columbia-Blutagar gewachsenen Einzelkolonie erstellt und für 14 bis 18 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 40 ml Medium G bis auf eine OD₆₀₀ von 0,03 - 0,05 beimpft und diese weiter bei 37 °C inkubiert. Ab dem Zeitpunkt, an dem die Kultur in die stationäre Wachstumsphase eintritt, wurde jede Stunde über einen Zeitraum von insgesamt 3 Stunden (3 Zeitpunkte) jeweils ein 3 ml Kulturaliquot entnommen und bei 12000 x g für 10 min pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde aus dem

Bakterienpellet die RNA extrahiert. Der Zeitpunkt, an dem die erste RNA-Extraktion erfolgte, wurde zuvor über die Aufzeichnung von Wachstumskurven (s. 2.4.3) unter den gleichen Bedingungen ermittelt. Pro Stamm wurden jeweils drei Kulturen inkubiert, sodass pro Stamm und pro Zeitpunkt jeweils drei biologische Replikate hätten untersucht werden können.

Zusätzlich sollten zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für elektronenmikroskopische Aufnahmen genommen werden, um die einzelnen Stadien der Versporung bildlich darzustellen. Dafür wurden 1 ml Kulturaliquots nach 2 h, 4 h bis 9 h und 24 h Wachstum genommen (8 Zeitpunkte) und bei 1500 x g für 15 min schonend pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 250 µl 2,5 % Glutardialdehyd (GA) in 0,05 M HEPES resuspendiert und die Zellen ü.N. fixiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien erneut pelletiert (1500 x g, 15 min) und das Pellet mit 250 µl 20 % FA / 0,1 % GA versetzt. Der Ansatz wurde zur Inaktivierung ü.N. inkubiert. Nach erfolgten Sterilkontrollen in TSB/3-fach Enthemer wurden die Proben ausgeschleust und bis zur Übergabe an die Abteilung ZBS 4 „Spezielle Licht- und Elektronenmikroskopie“ des Robert Koch-Institutes bei 4 °C gelagert.

2.4.7 Mikrobiologische Färbungen

Zur Beurteilung der Morphologie der Zellen unter dem Lichtmikroskop wurden bei den Sporulationsexperimenten Gram-Färbungen mit dem Färbeset der Firma Merck (Darmstadt, D) nach Angaben des Herstellers angefertigt. Zusätzlich wurden Färbungen nach Rakette durchgeführt, um den Grad der Versporung zu bestimmen. Hierbei erfolgt die Anfärbung der Sporen in einer 5 %-igen Malachitgrünlösung (Carl Roth, Karlsruhe, D) bei 90 °C für 45 min mit nachfolgender Gegenfärbung in 3 %-iger Safraninlösung (Carl Roth, Karlsruhe, D) für 2 min. Reife Sporen erscheinen bei dieser Färbemethode im Lichtmikroskop grün, vegetative Zellen hingegen rosa. Für die Präparatherstellung wurden 10 µl der jeweiligen Flüssigkultur auf einen Mikroskopie-Objektträger getropft. Nach vollständigem Eintrocknen des Materials wurde es durch Eintauchen in 10 %-iger FA-Lösung auf dem Objektträger fixiert, eine Einwirkzeit von mindestens 12 Stunden diente hierbei gleichzeitig zur Inaktivierung des Kulturmaterials.

2.4.8 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen (EM) Untersuchungen und Analysen (Quantifizierung von Sporulationsstadien, s. 3.3.2.1) wurden in der Abteilung ZBS 4 „Spezielle Licht- und Elektronenmikroskopie“ des Robert Koch-Institutes von Dr. Michael Laue und Kollegen durchgeführt. Hier wurde das Inaktivierungsfixans (20 % FA / 0,1 % GA) nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 2000 x g oder 5000 x g entfernt und das Pellet mit Agarose 1:2 überschichtet und resuspendiert. Die daraus herausgeschnittenen Agaroseblöcke wurden mit Osmiumtetroxid (1 % in H₂O_{bidest}) und Uranylacetat (2 % in H₂O_{bidest}) versetzt. Anschließend

erfolgte eine stufenweise Dehydrierung der Proben mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe und eine Einbettung in LR White Harz (Science Services, München, D) durch Polymerisation bei 60 °C ü.N. Die Proben wurden im Anschluss mit dem Ultramikrotom (UC-7, Leica, Nußloch, D) geschnitten und mit Uranylacetat und Blei-Citrat gegengefärbt. Die Analyse und Bildaufnahme erfolgte bei 120 kV mithilfe des Transmissionselektronenmikroskops (Tecnai12 Biotwin, FEI) und einer SSCCD Kamera („slow-scan charge-coupled-device“, Megaview III, Osis).

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien

Die Isolierung genomischer DNA aus bakteriellen Erregern erfolgte für die Herstellung einer DNA-Standardreihe zur Testung von Primerpaaren hinsichtlich ihrer Amplifikate und Amplifikationseffizienz mit Hilfe des DNeasy[®] Blood & Tissue Kits von Qiagen (Hilden, D). Dafür wurde über Nacht gewachsenes Koloniematerial von einer Columbia-Blutagarplatte mit einer Impföse in ein frisches Eppendorf Gefäß mit 200 µL Lysispuffer, versetzt mit 20 µL Lysozym (200 mg/µL), überführt und resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden der Mixtur 25 µL Proteinase K und 200 µl AL-Puffer zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 70 °C erfolgte die Zugabe von 200 µL 100 % Ethanol (EtOH). Alle weiteren Schritte wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in zwei Schritten mit je 75 µl EB-Puffer eluiert. Die Sterilfiltration wurde mit 0,22 µm Sterilfiltern für 4 min bei 12000 x g durchgeführt. Die Sterilkontrollen erfolgten mit 10 % des Probenvolumens in LB-Medium.

Zur Herstellung der DNA-Standardreihe wurde mit der isolierten, genomischen DNA eine 1:10-Verdünnungsreihe (20 µL genomische DNA + 180 µL H₂O) mit sieben Verdünnungsstufen hergestellt.

2.5.2 PCR-Techniken

2.5.2.1 Oligonukleotide und Primerdesign

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Gene für Expressionsanalysen hinsichtlich der Sporulation und der Transkriptomanalysen untersucht. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide und deren jeweilige Anwendung sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 5: untersuchte Gene und verwendete Oligonukleotide

Gen / Locus Tag	Genfunktion	Oligonukleotid	Verwendung
<i>pagA</i> [99]	Protektives Antigen	pag-seq6	cDNA-Synthese
		PA-S	qRT-PCR
		PA-R	qRT-PCR
		PA-TM	qRT-PCR
<i>capB</i> [95]	Kapsel-Biosynthese Protein	capB-cDNA	cDNA-Synthese
		capB-S	qRT-PCR
		capB-R	qRT-PCR
		capB-TM	qRT-PCR
<i>hasA</i>	Hyaluronsäure- Biosynthese Protein	hasA-cDNA	cDNA-Synthese
		hasA-S	qRT-PCR
		hasA-R	qRT-PCR
		hasA-TM	qRT-PCR
<i>pXO2-60</i>	hypothetisches Protein	pXO2-60-cDNA	cDNA-Synthese
		pXO2-60-S	qRT-PCR
		pXO2-60-R	qRT-PCR
		pXO2-60-TM	qRT-PCR
<i>rpoB</i>	β -Untereinheit RNA-Polymerase	rpoB-1856-for	qRT-PCR
		rpoB-1941-rev	qRT-PCR
		rpoB-TM	qRT-PCR
BACI_pCIXO200870	CAAX amino terminal protease family protein	BACI_pCIXO200870_for	qRT-PCR
		BACI_pCIXO200870_rev	qRT-PCR
<i>hupA</i>	DNA-bindendes Protein	BACI_c23220_for	qRT-PCR
		BACI_c23220_rev	qRT-PCR
<i>cysH</i>	Adenosin-phosphosulfat-Reduktase	BACI_c14620_for	qRT-PCR
		BACI_c14620_rev	qRT-PCR
<i>cstA1</i>	carbon starvation protein	BACI_c18140_for	qRT-PCR
		BACI_c18140_rev	qRT-PCR
BACI_c28060	hypothetisches Protein	BACI_c28060_for	qRT-PCR
		BACI_c28060_rev	qRT-PCR
<i>sigK</i>	sporulations-spezifischer Sigmafaktor	sigK-for	qRT-PCR
		sigK-1	qRT-PCR
<i>sigB</i>	genereller Sigmafaktor der Stressantwort	sigB-for	qRT-PCR
		sigB-rev2	qRT-PCR
<i>sigG</i>	sporulations-spezifischer Sigmafaktor	sigG-for	qRT-PCR
		sigG-rev2	qRT-PCR
<i>spolIID</i>	Regulator der Mutterzell-Genexpression	spolIID-for	qRT-PCR
		spolIID-rev4	qRT-PCR

<i>spoVG</i>	sporulations-spezifisches Regulatorprotein	spoVG-for2	qRT-PCR
		spoVG-rev2	qRT-PCR
BACI_c43240 (Rekombinase)	DNA integration / recombination/ inversion protein	4160-for3	qRT-PCR
		4160-rev5	qRT-PCR
<i>cotD</i>	Protein der Sporenhülle	cotD-for	qRT-PCR
		cotD-rev2	qRT-PCR
<i>cotZ1</i>	Protein der Sporenhülle	cotZ-for	qRT-PCR
		cotZ-rev2	qRT-PCR
<i>spolIE</i>	sporulations-spezifische Serin-Phosphatase	spolIE-for	qRT-PCR
		spolIE-rev	qRT-PCR
<i>sigE</i>	sporulations-spezifischer Sigmafaktor	sigE-for	qRT-PCR
		sigE-rev	qRT-PCR
<i>sigF</i>	sporulations-spezifischer Sigmafaktor	sigF-for	qRT-PCR
		sigF-rev	qRT-PCR
<i>sasP1</i>	DNA-schützendes Protein	sasP-for	qRT-PCR
		sasP-rev	qRT-PCR
<i>murF</i>	Protein des Sporencortex	murF-for	qRT-PCR
		murF-rev	qRT-PCR

Die verwendeten Primer und Sonden wurden in der Forschungsgruppe ZBS 2 mithilfe des Programms GenScript Real-Time PCR Primer and Probes Design Tool generiert (für die Real-Time PCR: www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool; für die konventionelle PCR: <https://www.genscript.com/tools/pcr-primers-designer>). Falls die Primer eigenhändig ausgesucht wurden, wurden bei dem Design die Faktoren GC-Gehalt (möglichst 50 %), Schmelztemperatur und Oligonukleotidlänge (20-25 nt) mitberücksichtigt. Die Herstellung der Primer und Sonden erfolgte auf Bestellung bei der Firma Metabion (Metabion, Martinsried, D).

2.5.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt eine *in vitro* Technik zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden, dar. Der Reaktionszyklus besteht aus der DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung (Annealing) und Primer-Extension. Die PCR-Reaktion zählt zu den wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die konventionelle PCR-Methode zur Primer-Testung verwendet. Für alle Reaktionsansätze wurden Reagenzien der Firma Fermentas (St. Leon-Roth, D) verwendet, die Amplifikationsreaktionen fanden in vollautomatischen Thermocyclern

(Eppendorf Mastercycler Egradient, Hamburg, D) statt. Der Reaktionsansatz und die Thermocycler-Bedingungen sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 6: Reaktionsansatz und Thermocycler-Bedingungen für die konventionelle PCR

Reaktionsansatz		Temperaturprofil		
5 µl	10 x DreamTaq Green Puffer (inkl. MgCl ₂)	94 °C	5 min	1 x
5 µl	dNTP-Mix (2 mM) (25 mM)	94 °C	30 s	
0,25 µl	DreamTaq Green DNA Polymerase (5 U/µl)	55 °C	30 s	35 x
1 µl	Forward-Primer (10 µM)	72 °C	30 s	
1 µl	Reverse-Primer (10 µM)			
1 µl	Template-DNA	72 °C	5 min	
ad 50 µl	H ₂ O (RNase- und DNase-freies H ₂ O)	4 °C	∞	

2.5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Verwendete Puffer und Reagenzien:

10 x TBE	108 g TRIS Base
	55 g Borsäure
	40 ml EDTA 0,5 M (pH 0,8)
	ad 1 l H ₂ O _{bidest}
GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus	100 µl DNA Ladder (0,5 – 1 µg)
	100 µl 6 x TriTrack DNA Loading Dye
	400 µl H ₂ O _{bidest}

Nukleinsäuren lassen sich entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld in einer Gelmatrix auftrennen. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür Agarosegele mit einer Konzentration von 1,5 % (w/v) verwendet. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 0,5 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE). Die Agarose wurde in 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht und mit Serva DNA Stain Clear G (Serva, Heidelberg, D) versetzt. Anschließend wurde die Agarose in die Gelvorrichtung gegossen. Nach dem Abkühlen des Agarosegels wurde dieses in eine mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Horizontalelektrophorese-Apparatur (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D) gelegt. Die Taschen des Agarosegels wurden jeweils mit 5 µl der PCR-Produkte beladen. Als DNA-Größenstandard diente der Marker GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus von Fermentas. Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit konstanter Spannung bei 100 V für 60 min.

Die Sichtbarmachung und Dokumentation der zu untersuchenden DNA-Fragmente in Agarosegelen erfolgte im UV-Durchlicht (254 nm) mit dem Molecular Imager ChemiDoc XRS

System (Bio-Rad, München, D), die Auswertung mit der ImageLab 6.0 Software. Durch das Mitführen eines Größenstandards konnte eine Zuordnung der DNA-Fragmente getroffen werden.

2.5.2.4 Real-Time PCR

Die Methode der quantitativen PCR (qPCR) dient ebenfalls der Vervielfältigung und dem Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen. Sie beruht auf demselben Prinzip wie die konventionelle PCR, erlaubt aber zusätzlich die Echtzeit-Quantifizierung der amplifizierten DNA durch den Einsatz einer fluoreszierenden DNA-Sonde bzw. eines DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge an vorhandenem PCR-Produkt.

In dieser Arbeit wurde entweder eine TaqMan-Sonde oder der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I eingesetzt. Der SYBR Green I Farbstoff ist ein unspezifischer Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) interkaliert, während die TaqMan-basierte Detektion eine fluorogene Sonde verwendet, die für die Zielgene spezifisch ist (s. Abbildung 11). Die Sonde besitzt am 5'-Ende einen „reporter“-Farbstoff (FAM) und einen „quencher“-Farbstoff (TAMRA) am 3'-Ende. Der fluoreszierende „reporter“ wird dabei nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) kontinuierlich durch die Strahlungsenergie des „quenchers“ inhibiert. Nach der Anlagerung der Sonde und der Primer an dessen komplementäre DNA-Sequenz beginnt die Polymerisierung mithilfe der Taq-DNA-Polymerase. Die Polymerase spaltet die gebundene Sonde durch ihre 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, was zur Separation des „quenchers“ vom „reporter“-Farbstoff führt, sodass das Fluoreszenzsignal des „reporters“ detektierbar wird. Die Intensität des Signals ist dabei proportional zur Menge der vorhandenen Ziel-DNA und ermöglicht durch Mitführen einer Standardreihe quantitative Aussagen über die in der Reaktion vorhandene DNA-Menge.

Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff lagert sich im Gegensatz zur DNA-Sonde unspezifisch in die DNA ein. Durch die Bindung ändert sich deren Absorptionsspektrum und die Intensität des Fluoreszenzsignals nimmt zu. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete SYBR Green I Farbstoff bindet an alle neu synthetisierten, doppelsträngigen DNA-Moleküle. Die Real-Time PCR wurde mit dem ABI7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, D) durchgeführt. Die Auswertung wurde mit der zugehörigen Gerätesoftware ABI7500 System Software (Version 1.4) vorgenommen.

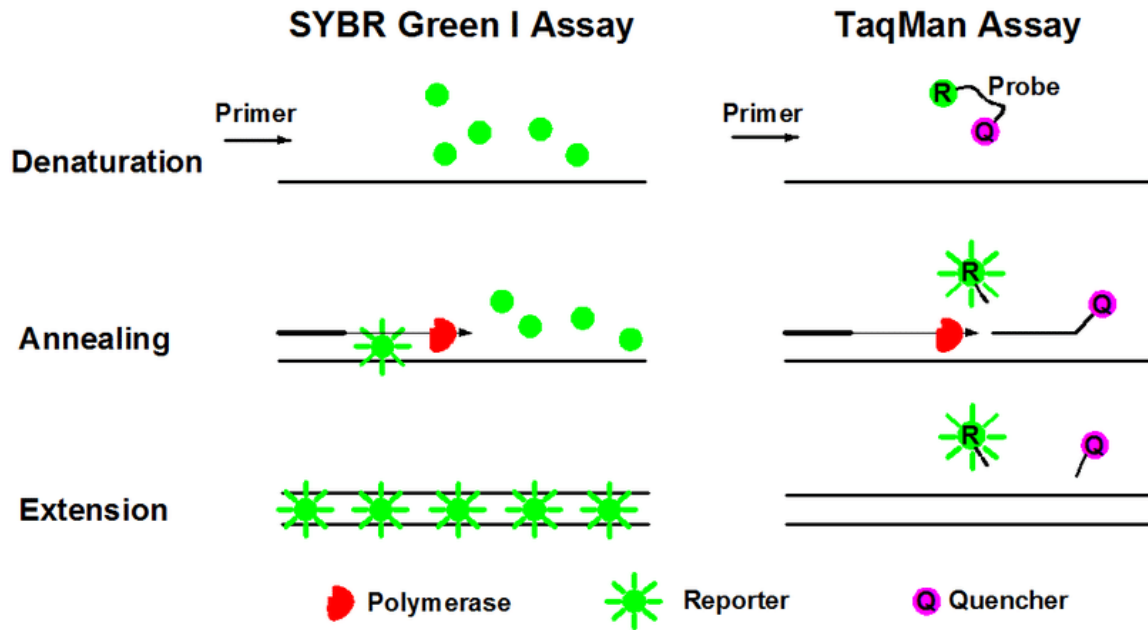


Abbildung 11: Funktionsprinzip der Real-Time PCR

Schematischer Ablauf einer Real-Time PCR-Reaktion mit einer fluoreszierenden DNA-Sonde und dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Probe = Sonde
 Cao © 2020 Molecules 25(3): p. 706 [137]

Die Reaktionsansätze und die Thermocycler-Bedingungen sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 abgebildet.

Tabelle 7: PCR-Ansätze und Thermocycler-Bedingungen der Real-Time PCR mit einer fluoreszierenden DNA-Sonde

Reaktionsansatz	Temperaturprofil	
6,25 µl TaqMan® Environmental Mastermix 2.0	95 °C	10 min
0,25 µl Sonde (10 µM)	95 °C	15 s 40 x
0,75 µl Sense-Primer (10 µM)	60 °C	30 s
0,75 µl Antisense-Primer (10 µM)		
16 µl Wasser		
1 µl Template cDNA bzw. behandelte RNA		

Tabelle 8: PCR-Ansätze und Thermocycler-Bedingungen der Real-Time PCR mit SYBR Green I

Reaktionsansatz	Temperaturprofil	
12,50 µl SYBR® Green I	50 °C	2 min
0,75 µl Sense-Primer (10 µM)	95 °C	10 min
0,75 µl Antisense-Primer (10 µM)	95 °C	15 s 40 x
10 µl Wasser	60 °C	30 s
1 µl Template cDNA		

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der Genexpression variabel regulierter Zielgene und als Kontrollverfahren zur Verifizierung der RNA-Sequenzierung die Methode der relativen Quantifizierung eingesetzt [138]. Hierbei werden die Expressionsergebnisse der Zielgene mittels eines Referenzgens normiert. Bei dem Referenzgen sollte es sich um ein nicht reguliertes Haushaltsgen handeln, dessen Expression einheitlich und konstant sein muss. Als Ergebnis wird die Expressionsrate im Verhältnis zum Haushaltsgen ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode zur Untersuchung der Genregulation im zeitlichen Verlauf der Sporulation angewandt. Dies erfolgte mithilfe der Festlegung eines Kalibratorwertes, der in diesem Fall der Expression des zu untersuchenden Zielgens zum Zeitpunkt des Beginns der stationären Phase entsprach. Zur Verifizierung der Ergebnisse aus der RNA-Sequenzierung diente als Kalibratorwert die Expression des zu untersuchenden Zielgens unter nicht-induzierenden Bedingungen (O_2 -Bedingung).

Die Berechnung der Expressionsrate erfolgte mit nachfolgender Formel nach der sog. $\Delta\Delta Ct$ -Methode [139].

1. Normalisierung des Zielgens gegen die endogene Kontrolle (Haushaltsgen)

$$\text{Formel 1} \quad Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{endogene Kontrolle}} = \Delta Ct$$

2. Normalisierung gegen den Kalibrator

$$\text{Formel 2} \quad \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kalibrator}} = \Delta\Delta Ct$$

3. Bestimmung der Expressionsrate

$$\text{Formel 3} \quad 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.5.3 RNA-Techniken

2.5.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien

Verwendete Puffer:

Lysepuffer 2 % SDS (w/v)
 16 mM EDTA
 20 mM NaCl
 ad 100 ml H_2O_{bidest} , pH 8,0

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gram-positiven Bakterien wurde eine Kombination aus Lysepuffer, Phenol/Chloroform und kommerziellen Aufreinigungssäulen des RNeasy® Mini Kits verwendet, modifiziert nach Bergman *et al.* [140] und Jahn *et al.* [141].

Je nach Zielstellung wurden 3 ml Flüssigkultur nach unterschiedlichen Wachstumsperioden (s. 2.4.5 und 2.4.6) bei 12000 x g für 10 min pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde

das Bakterienpellet in 1,5 ml kochendem Lysepuffer resuspendiert und weitere 4 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurden 45 µl 3 M Natriumacetat beigefügt und der Ansatz auf Eis überführt. Für die Extraktion von Nukleinsäuren wurden 1,5 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und erst durch Umdrehen vorsichtig gemischt, und anschließend gründlich geschüttelt. Durch die Zugabe von Phenol-Chloroform werden die bei der Zellyse freigesetzten RNasen ebenfalls schnell inaktiviert. Nach 15 min Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation von 20 min bei 4 °C und 12000 x g. Die freigesetzten Proteine sammelten sich nach der Zentrifugation in der unteren organischen Phase des Chloroforms, während Nukleinsäuren mit der wässrigen oberen Phase abgenommen werden konnten. Der wässrige Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Ansäuerung sowie Stabilisierung der Nukleinsäuren mit je 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 mM EDTA versetzt, um schließlich durch Zugabe von 2,5 Volumenteile eiskaltem EtOH (100 %) die Nukleinsäuren zu präzipitieren. Der Ansatz wurde erneut durch Umdrehen gemischt und über Nacht bei -80 °C inkubiert. Im nächsten Arbeitsschritt folgte zur Pelletierung der gefällten Nukleinsäuren eine 25-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g, nach der der Überstand sehr gründlich abgenommen wurde, ohne dabei das entstandene Pellet zu beschädigen. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und sowohl 700 µl RLT-Puffer aus dem RNeasy® Plus Mini Kit als auch 500 µl 100 % EtOH hinzugegeben. Nach gründlichem Durchmischen durch Auf- und Abpipettieren wurden jeweils 700 µl des Lysats zur endgültigen Reinigung der RNA auf zwei RNeasy Mini Säulen überführt. Alle nachfolgenden Aufreinigungsschritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der RNA erfolgte mit jeweils 60 µl RNase-freiem Wasser, wobei die Eluate von zwei Säulen einer Aufreinigung zum Schluss gepoolt wurden. Die Lagerung der RNA fand stets bei -80 °C statt.

2.5.3.2 DNase-Behandlung von RNA

Nach erfolgter RNA-Isolierung wurde ein DNase I-Verdau durchgeführt, um eventuell vorhandene DNA-Reste aus der Präparation zu entfernen, die zu falsch positiven Transkriptionsnachweisen führen könnten.

Hierfür wurden 1 – 2 µg der RNA-Präparation für 30 min mit 12 µl DNase I und 12 µl DNase-Puffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) bei 37 °C inkubiert (s. Tabelle 9). Im Anschluss wurde die Probe für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die DNase I-Aktivität zu inhibieren. Ebenso erfolgte die Zugabe von 6 µl 50 mM EDTA, wodurch die Magnesium-Ionen abhängige DNase-Aktivität durch Komplexierung des EDTA mit den im Puffer enthaltenen Magnesium-Ionen zusätzlich gestoppt wird. Die behandelten RNA-Proben (bRNA) wurden vor der weiteren Verwendung auf möglicherweise verbliebene DNA-Verunreinigungen in der qPCR untersucht (s. 2.5.2.4). Bei Vorhandensein von DNA in den Proben wurden diese erneut mit DNase I

behandelt, bis keine Rest-DNA in den Präparationen nachgewiesen werden konnte. Erst danach wurde die RNA für die nachfolgenden Arbeitsschritte zur cDNA-Synthese bzw. RNA-Sequenzierung verwendet.

Tabelle 9: Allgemeiner Ansatz für den DNase I-Verdau von RNA-Präparationen

Reaktionsansatz	Temperaturprofil	
1-2 µg Gesamt-RNA 12 µl 10x DNase-Puffer 12 µl DNase I (1 U/µl) ad 48 µl DEPC-Wasser	37 °C	30 min
6 µl 50 mM EDTA	65 °C	10 min

2.5.3.3 Herstellung komplementärer DNA (cDNA) aus RNA

Für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus bakterieller mRNA wurden je nach Zielstellung entweder spezifische Primer für die jeweiligen Zielgene (s. Tabelle 5) und die M-MLV Reverse Transkriptase (Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) verwendet, oder die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe des SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kits über die Verwendung von *random* Hexamer-Oligonukleotiden und der SuperScript™ II Reversen Transkriptase.

Bei der M-MLV handelt es sich um eine Reverse Transkriptase, die drei verschiedene, hintereinander geschaltete enzymatische Schritte durchführt. In der ersten Reaktion bindet sie an einer einzelsträngigen RNA (ssRNA) und synthetisiert daraus ein RNA-DNA-Hybridmolekül mit Hilfe ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, das in einem zweiten Schritt durch die Exoribonuklease-Aktivität der M-MLV wieder hydrolysiert wird. Dadurch entstehen zwei einzelsträngige DNA- und RNA-Moleküle. Bei der letzten Reaktion wird die einzelsträngige DNA (ssDNA) zu doppelsträngiger DNA (dsDNA) komplementiert.

Für die Synthese von cDNA wurden 100 ng der mit DNase I-behandelten RNA zusammen mit 2 µl 10 µM spezifischen cDNA-Primern (s. Tabelle 5) auf ein Gesamtvolumen von 20 µl vermischt und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 20 µl des in Tabelle 10 aufgelisteten Synthesemixes (alle Reagenzien Fermentas, St. Leon-Roth, D) versetzt. Es folgte eine 60-minütige Inkubation bei 42 °C. Die gewonnene cDNA wurde anschließend sofort auf Eis übertragen bzw. bei 4 °C gelagert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die cDNA-Synthese mit spezifischen Primern für die gezielte Überprüfung der Genexpression ausgewählter Gene bei der Transkriptomanalyse durchgeführt, bevor die RNA in weiterführenden Arbeitsschritten bei der RNA-Sequenzierung verwendet wurde (s. 2.5.5).

Tabelle 10: Allgemeiner Ansatz für die cDNA-Synthese von RNA-Präparationen mit spezifischen Primern

Reaktionsansatz	Temperaturprofil	
100 ng bRNA 2 µl cDNA Primer (10 µM) ad 20 µl DEPC-Wasser	65 °C	10 min
4 µl 5x RT-Puffer 1 µl RiboLock RNase-Inhibitor 2 µl 10 mM dNTP-Mix 1 µl M-MLV RT 1 µl 100 mM DTT 11 µl DEPC-Wasser	42 °C	60 min
	danach sofort auf Eis überführen	

Bei der Synthese von cDNA mit Random Primern werden kurze einzelsträngige Oligonukleotide verwendet, die eine zufällige Sequenz aufweisen. Da sie in der Regel aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen, werden sie als „zufällige Hexamere“, also als *random* Hexamer-Oligonukleotide, bezeichnet. Im Gegensatz zu spezifischen Primern, durch deren Verwendung gezielt ein Transkript hergestellt wird, ermöglicht die zufällige Sequenz der Random Primer eine unspezifische Bindung der Oligonukleotide an jeder Stelle der meisten RNA-Typen. Somit wird der Großteil der Genprodukte abgedeckt, die in einer nachfolgenden PCR mit spezifischen PCR-Primern amplifiziert werden können.

Die Herstellung von cDNA mit dem Random Primer Kit fand in der vorliegenden Arbeit bei den Genexpressionsanalysen zur Sporulation (s. 3.3) und bei der Verifizierung der Transkriptomdaten (s. 3.1.7) Anwendung.

Es wurden 30 ng der mit DNase I behandelten RNA zusammen mit 1 µl 10 mM dNTP's und 1 µl 50 ng/µl Random Hexamers auf ein Gesamtvolumen von 10 µl vermischt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurden die Proben sofort für 1 min auf Eis inkubiert und mit 9 µl des in Tabelle 11 aufgelisteten Mastermixes versetzt. Es folgte eine 2-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase hinzugefügt und die Ansätze zunächst für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer 50-minütigen Inkubationszeit bei 42 °C und schließlich einer 15-minütigen Inaktivierungsphase bei 70 °C. Danach wurden die Proben sofort auf Eis überführt und als letzten Schritt mit 1 µl RNase H versetzt, wodurch der RNA-Strang enzymatisch abgebaut wird. Nach einer Inkubation von 20 min bei 37 °C wurde die gewonnene cDNA bis zur weiteren Analyse bei 4 °C gelagert.

Tabelle 11: Allgemeiner Ansatz für die cDNA-Synthese von RNA-Präparationen mit *random* Hexamer-Oligonukleotiden

Reaktionsansatz	Temperaturprofil	
30 ng bRNA 1 µl dNTP's (10 mM) 1 µl Random hexamers (50 ng/µl) ad 10 µl DEPC-Wasser	65 °C	5 min
für eine Reaktion (Mastermix ansetzen): 2 µl 10x RT-Puffer 4 µl MgCl ₂ (25 mM) 2 µl DTT (0,1 M) 1 µl RNase OUT (40 U/µl) pro Ansatz 9 µl hinzufügen	RT	2 min
1 µl SuperScript II RT	RT 42 °C 70 °C	10 min 50 min 15 min
1 µl RNase H	37 °C	20 min

2.5.4 Fluorometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der isolierten RNA bzw. DNA wurde am Fluorometer Qubit 4 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) gemessen. Dafür wurde das Qubit RNA HS Assay Kit mit einem Quantifizierungsbereich von 5 – 100 ng oder das Qubit dsDNA HS Assay Kit mit einem Quantifizierungsbereich von 0,2 – 100 ng nach Angaben des Herstellers verwendet. In der Reaktion binden zielselektive Farbstoffe an die Nukleinsäuren und emittieren daraufhin eine Fluoreszenz. Durch die Fluoreszenzmessung im Fluorometer kann so die Konzentration der Probe bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils 2 µl der zu untersuchenden RNA oder DNA in eine Messung eingesetzt.

2.5.5 RNA-Sequenzierung

Die Transkriptomanalyse mittels Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit dem Verfahren der RNA-Sequenzierung. Der allgemeine Ablauf dieser Methode umfasst nach der Anzucht der Bakterien (s. 2.4.5) die Extraktion der RNA (s. 2.5.3.1), die Abreicherung der rRNA, das Umschreiben der RNA in cDNA, die Sequenzierung der cDNA-Bibliothek und die Datenanalyse. Im Folgenden wird die Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte näher beschrieben.

2.5.5.1 Qualitätskontrolle von RNA

Die Qualitätsmessung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer oder dem Agilent 5300 Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Bei dem Bioanalyzer handelt es sich um ein Instrument, das zur Überprüfung der RNA-Integrität eine automatisierte Kapillar-Elektrophorese durch die Lab-on-Chip-Technologie durchführt. Mit Hilfe der Kapillar-Elektrophorese werden die einzelnen Fraktionen der ribosomalen RNA (5S, 16S, 23S), welche die größte RNA-Fraktion in einer Probe darstellt (85 – 90 Prozent), die mRNA sowie fragmentierte RNAs der Größe nach aufgetrennt, visualisiert und in einem Elektropherogramm sowie als „virtuelles Gelbild“ dargestellt. Zusätzlich zu dem 23S/16S rRNA-Verhältnis, das bei einer RNA-Probe von hoher Qualität generell bei 2,0 angesehen wird, generiert das System einen Zahlenwert von 1 bis 10, der RNA Integrity Number (RIN). Diese Zahl soll die Einstufung der RNA-Integrität vereinfachen. Dabei repräsentiert ein Wert von 10 eine intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA von sehr hoher Qualität, wohingegen eine 1 für komplett degradierte und fragmentierte RNA mit geringster Qualität steht.

Bei dem Fragment Analyzer handelt es sich um ein fluoreszenzbasiertes Kapillarelektrophoresesystem, das ähnlich wie der Bioanalyzer Qualitätsparameter für RNA Proben liefert. Die RNA-Integrität wird hierbei als RNA Quality Number (RQN) angegeben. Wohingegen im Bioanalyzer nur 11 Proben parallel untersucht werden können, kann der Fragment Analyzer bis zu 48 Proben gleichzeitig separieren.

Für die Messungen wurde das Agilent RNA 6000 Pico Kit oder das Agilent HS RNA Kit mit einem Quantifizierungsbereich von 50 – 5000 pg/µl nach Angaben des Herstellers verwendet, wobei jeweils 1 – 2 µl der zu untersuchenden RNA-Probe eingesetzt wurde. Ein erfolgreicher Lauf zeichnete sich durch die Erkennung aller Marker-Fragmente im Leiter-Elektropherogramm und die Erkennung des internen Markers in jedem Proben-Elektropherogramm aus. Weiterhin mussten die 16S und 23S rRNA-Peaks deutlich zu erkennen sein.

2.5.5.2 Abreicherung von rRNA

Der Hauptteil eines bakteriellen Transkriptoms setzt sich aus stabilen RNA-Spezies (rRNA, tRNA) zusammen und macht $\geq 95\%$ aus. Der mRNA-Anteil liegt dementsprechend nur bei etwa 5% des gesamten RNA-Gehaltes der Zelle. Daher stellt die Abreicherung der rRNA einen essentiellen Schritt bei der Vorbereitung der RNA zur Transkriptomsequenzierung dar, um eine ausreichende Abdeckung an mRNA-Sequenzen zu erhalten und die redundanten rRNA-Sequenzen zu minimieren. Die mRNA-Anreicherung in Prokaryoten ist ein anspruchsvoller Prozess, da sie im Gegensatz zu eukaryotischer mRNA am 3'-Ende nicht

polyadenyliert vorliegt, was die mRNA-Aufreinigung erschwert. Es wurden unterschiedliche Methoden zur Abreicherung von rRNA bzw. zur Anreicherung von mRNA bei Prokaryoten entwickelt, welche derzeit kommerziell bei diversen Unternehmen erhältlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Abreicherung von rRNA aus einer Gesamt-RNA-Lösung das Ribo-Zero® rRNA Removal Kit (Gram-Positive Bacteria) und die anschließende Aufreinigung der abgereicherten RNA mittels des RNeasy MinElute Cleanup Kits nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei dieser Methode wird zunächst die rRNA (23S, 16S und 5S rRNA) spezifisch an biotinylierte Fragmente hybridisiert, die zu stark konservierten Bereichen der rRNAs komplementär sind. Die Hybride (biotinylierte Fragmente:rRNA) werden im nächsten Schritt über die Biotinylierung an magnetische Beads gekoppelt und mit einem Magnetständer separiert und selektiv entfernt.

In den Reaktionsansatz wurde jeweils das maximale Volumen von 28 µl an RNA-Probe eingesetzt. Die Effizienz der Abreicherung wurde mit dem Agilent Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Pico Kit) überprüft.

2.5.5.3 Herstellung von cDNA-Bibliotheken

Die in Kapitel 2.5.5.2 hergestellte rRNA-depletierte RNA wurde im nächsten Schritt in cDNA umgeschrieben. Für die Herstellung der cDNA-Bibliotheken wurde das NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® nach Angaben des Herstellers verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte des Protokolls sind der Abbildung 12 zu entnehmen. In den Reaktionsansatz wurde jeweils 5 µl an rRNA-depletierter RNA-Probe eingesetzt.

Zunächst wird die RNA bei hoher Temperatur fragmentiert, da kürzere Fragmente geringere Sekundärstrukturen aufweisen und so später eine gleichmäßigere Read-Abdeckung in der Sequenzierung gewährleistet wird. Anschließend wird die fragmentierte RNA an *random* Hexamer-Primer hybridisiert, woraufhin die reverse Transkriptase den cDNA-Erststrang vom Primer aus entlang des RNA-Moleküls synthetisieren kann. Die Zugabe von Actinomycin D verhindert in diesem Schritt die Synthese des zweiten cDNA-Stranges. Als nächstes wird der RNA-Strang durch RNase H abgebaut und die Zweitstrangsynthese erfolgt. Dabei wird dUTP anstelle von dTTP eingebaut (dUTP Methode), wodurch die Strangspezifität gewährleistet wird. Anschließend werden phosphorylierte *blunt ends* am doppelsträngigen cDNA-Molekül mit einem Adeninrest am 3'-Ende erzeugt, um in nächsten Schritt die cDNA an die Adapter mit einem passenden Thyminüberhang zu ligieren. Der Uracil-enthaltende Strang wird nun selektiv über das USER Enzym (UDG + Endo VIII) entfernt. Zusätzlich öffnet das Enzym die Haarnadelschleifen-Struktur des NEB Next Adapters. Somit bleiben einzelsträngige und strangspezifische cDNA-Moleküle in der cDNA-Bibliothek übrig. Zum Schluss erfolgt eine PCR-Amplifikation mit geringer Zyklenzahl, damit die Unterschiede in den mRNA-Mengen sichtbar bleiben. Durch die PCR werden spezifisch die DNA Fragmente mit Adaptersequenzen

an beiden Enden vervielfältigt, wodurch sowohl die für die Sequenzierung nötige Menge an DNA bereitgestellt wird als auch P5- und P7-Sequenzen, die für den späteren Sequenzierungsvorgang essentiell sind, integriert werden können.

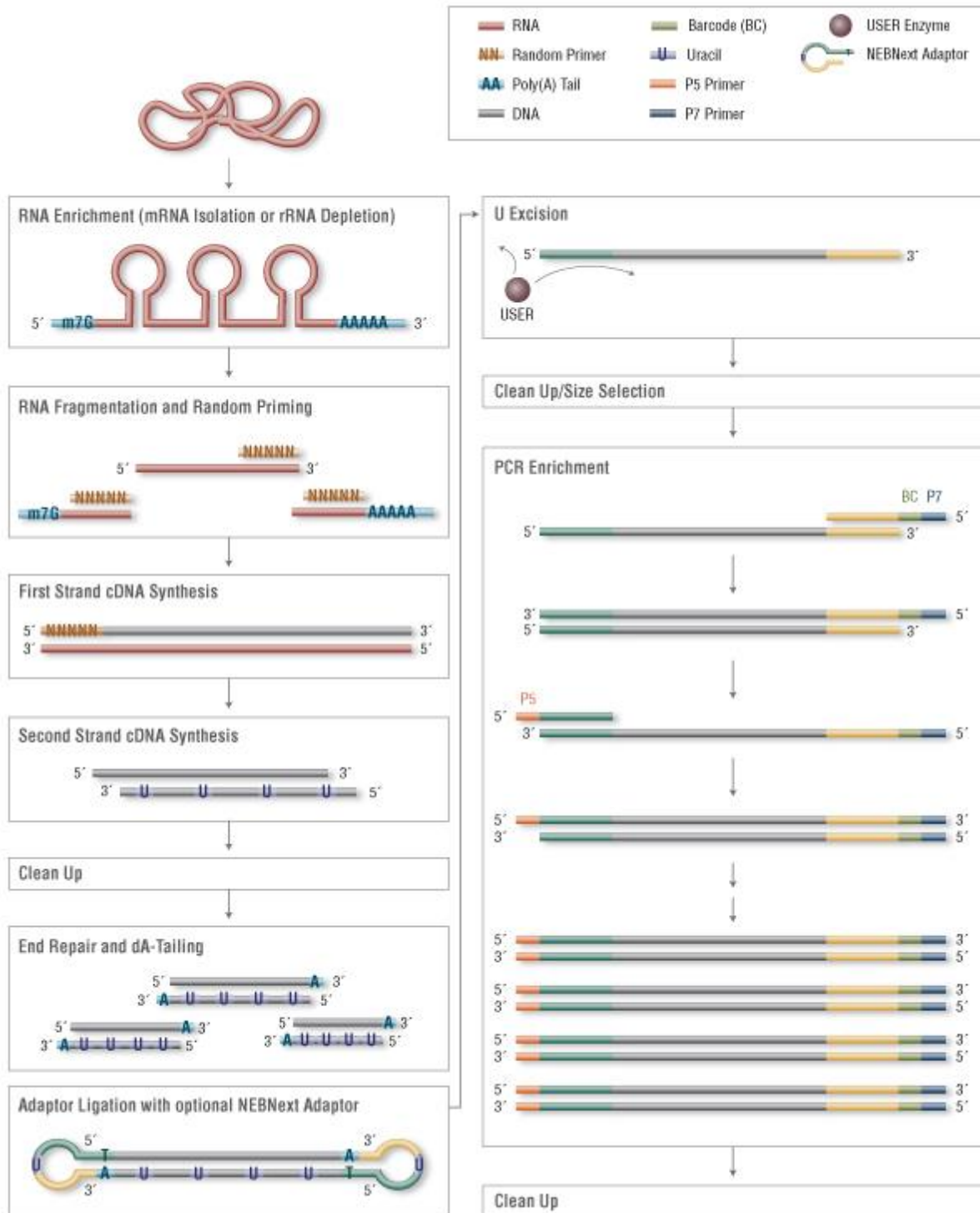


Abbildung 12: Workflow des NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kits (© New England Biolabs)

2.5.5.4 Sequenzierung von cDNA-Bibliotheken

Die Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken erfolgte in der Abteilung MF2 „Genomsequenzierung und Genomische Epidemiologie“ des Robert Koch-Institutes. Die cDNA-Bibliotheken wurden als Single-Read (50 - 75 bp Leselänge) auf einer HiSeq1500- oder NextSeq-Plattform (Illumina) mit einer Sequenziertiefe bis zu 400 Millionen Reads sequenziert.

2.5.5.5 Bioinformatische Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten

Die bioinformatischen Analysen wurden in der vorliegenden Arbeit von Silver Wolf aus der Abteilung MF2 „Genomsequenzierung und Genomische Epidemiologie“ des Robert Koch-Institutes mit der Smart Consensus Of RNA Expression (SCORE)-Pipeline durchgeführt [142] (s. Abbildung 13).

Die SCORE-Pipeline verwendet eine Auswahl an gängigen Tools für die Erkennung von differentiell exprimierten Genen (DEG's) und integriert diese Ergebnisse in einen visuell lesbaren Output. SCORE führt alle Schritte, von der Qualitätsbewertung bis zur Überrepräsentationsanalyse, für die Analyse von bakteriellen RNA-Seq-Daten durch.

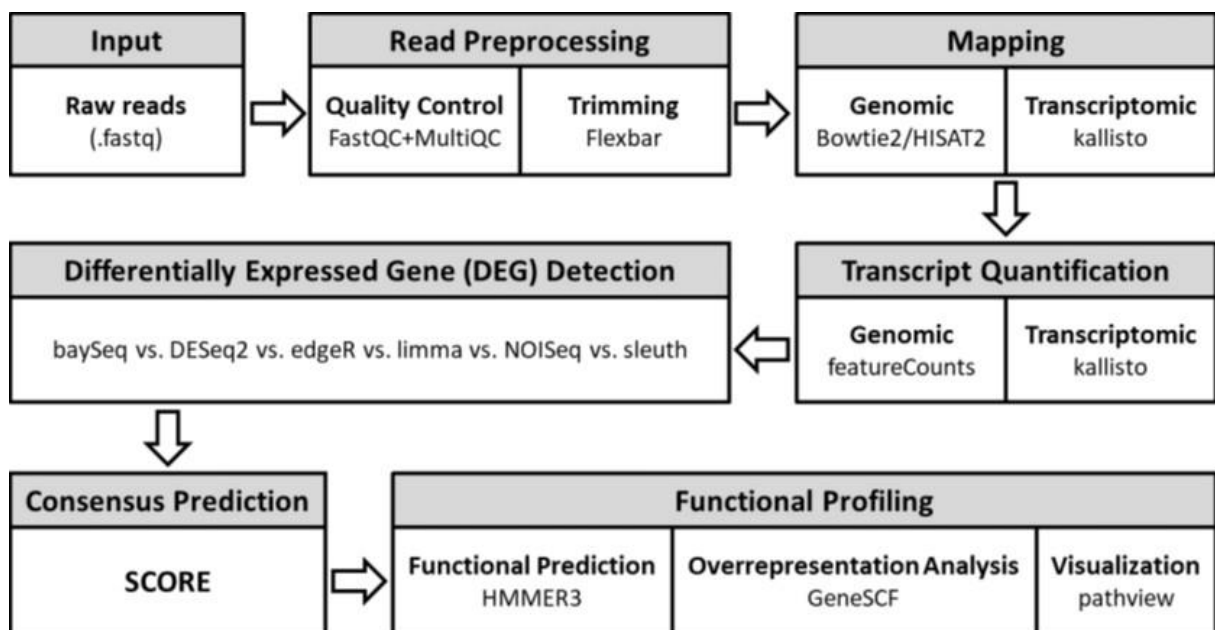


Abbildung 13: SCORE-Workflow

Wolf © 2021 Bioinformatics 37(3): p. 426-428

Die Qualitätskontrolle der Sequenzierungsdaten wurde dabei mit den Programmen FastQC und MultiQC durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Reads hinsichtlich der Qualität getrimmt, um möglichst viele Reads mit hoher Basenqualität anschließend zu mappen. Das Trimmen erfolgte mit dem Programm Flexbar und den Standardeinstellungen von SCORE für single end Reads, wobei Reads, welche nach dem Trimmen kürzer als 20 nt waren, verworfen

wurden. Das darauf basierende stammspezifische Mapping wurde gegen die folgenden Stämme durchgeführt: *B. anthracis* Stamm 14RA5914 Dobichau (NCBI Referenz Sequenz: NZ_CP023001.1) inklusive seiner Plasmide (NCBI Referenz Sequenz: NZ_CP023002.1 und NZ_CP023003.1), *B. anthracis* Stamm Vollum (NCBI Referenz Sequenz: NZ_CP007666.1) mit den beiden Plasmiden pXO1 und pXO2 (NCBI Referenz Sequenz: NZ_CP007664.1 und NZ_CP007665.1) sowie *Bcbva* Stamm CI (NCBI Referenz Sequenz: CP001746.1) inklusive der drei Plasmide (NCBI Referenz Sequenz: CP001747.1, CP001748.1 und CP001749.1). Das Genom des *Bcbva* CA Stammes wurde anhand von Illumina- und Minlon-Sequenzen mittels Unicycler hybrid-assembliert und anschließend mit Geneious annotiert, ist bislang jedoch noch nicht publiziert. Das Mapping der generierten RNA-Sequenzen auf das entsprechende Referenzgenom bzw. Plasmid wurde jeweils mittels Bowtie2 in Kombination mit kallisto ausgeführt.

Da die Anzahl der gemappten Reads eines Gens mit dessen Transkriptionsstärke korreliert, wird zur Bestimmung der differentiell transkribierten Gene aus RNA-Sequenzierungen die Anzahl der Reads pro Gen sowie dessen experimentelle Bedingung benötigt. Es wurden drei biologische Replikate pro Bedingung (O₂ vs. CO₂) durchgeführt und von diesen die Reads pro Transkript bestimmt. Basierend auf dem Read Mapping verwendet SCORE das Tool featureCounts für die Quantifizierung der Reads. Standardmäßig wurden gering exprimierte Gene (Cutoff: <10 Counts) verworfen, da es sich bei diesen höchstwahrscheinlich um falsch Positive, resultierend aus dem Sequenzierungs-Hintergrundrauschen oder fehlerhaftem Mapping, handelt, die die nachfolgende DEG-Analyse negativ beeinflussen würden.

Anschließend wurden mittels statistischer Verfahren die Reads normalisiert und geprüft, welche Gene in den zu untersuchenden Bedingungen differentiell exprimiert sind. SCORE verwendet dafür eine Auswahl an sechs verschiedenen Programmen: baySeq, DESeq2, edgeR, limma, NOISeq und sleuth. Als Ergebnis wurden für jedes Gen die relative Transkriptmenge (in normalisierten Reads) in Form von TPM-Werten (transcripts per million) sowie die Änderung der Transkriptmenge (FoldChange, FC) bezogen auf die Referenz als Logarithmus zur Basis 2 (log₂FoldChange, log₂FC) generiert. Als Kontrollbedingung wurde stets das Wachstum unter O₂ herangezogen.

Da für jedes Gen einzeln geprüft wird, ob es differentiell exprimiert ist und Organismen mehrere tausend Gene besitzen, reicht die einfache Prüfung auf statistische Signifikanz mittels p-Wert nicht aus. Um die sogenannte False Discovery Rate (FDR) zu korrigieren, werden zusätzliche statistische Tests durchgeführt. Der FDR-korrigierte bzw. angepasste p-Wert (adjusted p-value) stellt die statistische Signifikanz des log₂FC dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein angepasster p-Wert von 0,05 als statistische Signifikanzgrenze für differentiell exprimierte Gene angenommen. Darüber hinaus wurde zusätzlich nach dem FoldChange gefiltert, sodass nur Gene mit einem angepassten p-Wert <0,05 und einem FC von ≥ + 4 bzw.

≤ -4 als differentiell exprimiert gelten. Identifizierte DEG's wurden abschließend anhand von Venn-Diagrammen visualisiert.

2.6 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

2.6.1 Antikörper und Antigene

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper und Antigene für verschiedene immunologische Anwendungen können den nachfolgenden Tabellen entnommen werden.

Tabelle 12: verwendete Primärantikörper

Bezeichnung (Spezies)	Antigen	Anwendung (Verdünnung)	Herkunft / Quelle
M1.5 (Maus)	pXO2-60 <i>Bcbva</i>	WB (1:2000)	ZBS 2, RKI, Berlin, D
Clone 138 (Maus)	PA <i>B. anthracis</i>	WB (1:3500)	c = 3,5 mg/ml; Senova GmbH, Jena, D
pc134 (Kaninchen)	LF <i>B. anthracis</i>	WB (1:3500)	c = 1,7 mg/ml; ZBS 2, RKI, Berlin, D

Tabelle 13: verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Anwendung (Verdünnung)	Herkunft
goat α mouse-HRPO	WB (1:2000)	c = 0,8 mg/ml; Dianova, Hamburg, D
goat α rabbit-HRPO	WB (1:2000)	c = 0,8 mg/ml; Dianova, Hamburg, D

Tabelle 14: verwendete Antigene

Bezeichnung	Anwendung (Konzentration absolut)	Herkunft
rpXO2-60 <i>Bcbva</i>	WB (33 ng)	c = 164 μ g/ml; Eluat 3, ZBS 2, RKI, Berlin, D
rPA83 <i>B. anthracis</i>	WB (40 ng)	c = 1 mg/ml; List Biologicals, Campbell, USA
rLF <i>B. anthracis</i>	WB (40 ng)	c = 1 mg/ml; List Biologicals, Campbell, USA

2.6.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

verwendete Puffer:

4 x Laemmlipuffer	4 ml 10 % (w/v) SDS-Lösung
	2,3 ml H ₂ O _{bidest}
	4 ml Glycerin
	600 μ l 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	400 μ l 2-Mercaptoethanol
	200 μ l 5 % (w/v) Bromphenolblaulösung (in 2 % Natronlauge)

10 × SDS-PAGE Laufpuffer	250 mM Tris-Base
	1,92 M Glycin
	1 % (w/v) SDS
	ad 1 l H ₂ O _{bidest}

Für die Untersuchung und Darstellung von Proteinen wurden diese entsprechend ihrer molekularen Masse nach der Methode von Laemmli [143] getrennt. Das hierbei verwendete Detergenz, Sodiumdodecylsulfat (SDS), lagert sich gleichmäßig an Proteine an, wodurch diese stark negativ geladen und in Kombination mit Hitze vollständig denaturiert werden. In einem elektrischen Feld erfolgt anschließend die Auftrennung der einzelnen Proteine aus einem Gemisch nicht mehr nach ihrer jeweiligen Ladung, sondern gemäß ihrer Größe.

Das Acrylamidgel besteht aus einem Sammelgel, das zur gleichmäßigen Aufnahme der Proteine dient, und einem Trenngel, in dem die Proteine aufgetrennt werden. Durch eine Änderung des prozentualen Anteils von Acrylamid kann die Porengröße im Trenngel gesteuert werden, um die Trennung unterschiedlich großer Proteine zu optimieren. In der vorliegenden Arbeit wurden Sammelgele mit 5 % Acrylamidlösung und Trenngele mit 12 % Acrylamidlösung verwendet. Zur Herstellung zweier Gele, die jeweils aus Trenn- und Sammelgel bestehen, wurden die folgenden Komponenten miteinander gemischt.

Sammelgel (5 %):

Menge für 2-3 Gele

H ₂ O	2,9 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
Acrylamidlösung (30 %) [Rotiphorese Gel 30 (Roth)]	850 µl
10 % SDS	50 µl
TEMED	10 µl
25 % (w/v) Ammoniumpersulfatlösung (APS)	15 µl

Trenngel (12 %):

Menge für 2-3 Gele

H ₂ O	5,1 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,8 ml
Acrylamidlösung (30 %)	6,0 ml
10 % SDS	150 µl
TEMED	20 µl
25 % APS	20 µl

Für die SDS-PAGE wurden Minigelapparaturen (Biometra, Göttingen, D) mit 1 mm dicken „Spacern“ verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden vor Auftragung in einem Verhältnis von 2:1 mit 4 x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt und denaturiert. Als Molekulargewichtsmarker für die Elektrophorese wurden 4 µl des PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 kDa bis 170 kDa, Fermentas, St. Leon-Rot, D) verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 1 x SDS-PAGE Laufpuffer. Es wurde ein konstanter Strom von 25 mA pro Gel angelegt. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde das Gel entweder für einen Western Blot verwendet oder einer Silberfärbung unterzogen.

2.6.3 Silberfärbung

Fixierlösung: 300 ml Ethanol
 100 ml Essigsäure
 ad 1 l H₂O_{bidest}

Für die Sichtbarmachung der zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde die Silberfärbung mit dem Pierce™ Silver Stain Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei werden die Proteine zunächst durch die Fixierlösung im Gel denaturiert und fallen aus. Ein weiteres Wandern der Proteine ist damit unmöglich. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser wird das Gel in einer Silbernitratlösung inkubiert. Dadurch lagern sich Silberionen an die Proteine an. Überschüssiges Silber wird mit Wasser abgewaschen. Abschließend werden durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd die Silberionen zu elementarem Silber reduziert, welches die Stellen, an denen Proteine vorhanden sind, schwarz färbt.

Im Gegensatz zur Coomassie-Färbung zeichnet sich die Methode der Silberfärbung durch ihre hohe Sensitivität aus. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 - 1 ng pro Bande.

2.6.4 Kapselfärbung mit Alcianblau

Alcianblau-Färbelösung: 0,025 % (w/v) Alcianblau 8 GX
 40 % (v/v) Ethanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 50 % (v/v) H₂O_{bidest}

Fixierlösung/Entfärber: 10 % (v/v) Essigsäure
 40 % (v/v) Ethanol
 50 % (v/v) H₂O_{bidest}

Für die Sichtbarmachung der Kapsel der zuvor in einem 5 % Sammelgel ohne Trenngel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde Alcianblau 8 GX Farbstoff (Sigma-Aldrich,

St. Louis, USA) verwendet. Alcianblau färbt saure Proteoglykane und Polysaccharide sowie sulfatierte Glykosaminoglykane (wie z.B. Hyaluronsäure) selektiv cyan, sodass spezifisch die Poly-D-Glutaminsäure-Kapsel von *B. anthracis* und die Hyaluronsäure-Kapsel von *Bcbva* in einem Proteingel angefärbt werden können.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel über Nacht in Fixierlösung gelegt, die anschließend gegen eine 0,025 % Alcianblau-Färbelösung ausgetauscht wurde. Das Gel wurde unter vorsichtigem Schwenken für 30 min gefärbt und anschließend bis zur Sichtbarkeit der Kapselbanden durch Inkubation in Entfärbelösung entfärbt.

2.6.5 Western Blot

Blotpuffer: 50 mM Tris-Base
 39 mM Glycin
 0,037 % (w/v) SDS
 20 % Methanol

Der Western Blot erlaubt einen spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörperbindung und anschließender Sichtbarmachung durch Chemilumineszenz. Für den Proteintransfer vom SDS-Gel auf eine Membran wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membran (Immobilon P, Millipore, Schwalbach/Taunus, D) nach dem „Semi-dry“- Verfahren [144] mit einer Blotapparatur der Firma Biometra (Göttingen, D) verwendet. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben Proteine an der Membranoberfläche haften, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt.

Zunächst wurde die auf Gelgröße zugeschnittene Membran mit 100 % Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit dem Trenngel des SDS-Gels und zwei auf 9 x 7 cm zugeschnittenen dicken Whatman-Papieren (Fischer Scientific, Schwerte, D) kurz in Blotpuffer äquilibriert. Die einzelnen Lagen wurden anschließend luftblasenfrei wie folgt auf die Kathode geschichtet (aufsteigend von unten nach oben): Whatman-Papier, SDS-Trenngel, PVDF-Membran, Whatman-Papier. Der Transfer erfolgte 90 min bei konstanten 120 mA (ca. 6 V; steigend). Anschließend wurden die gesuchten Proteine immunologisch nachgewiesen.

2.6.6 Immunfärbung und Detektion mittels Chemilumineszenz

TBS-T: 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
 137 mM NaCl
 0,1 % (v/v) Tween 20

Nach dem Proteintransfer fand das Blocken bzw. das Absättigen freier Bindungsstellen auf der PVDF-Membran mit 10 % (w/v) Trockenmagermilchpulver (TMP, Carl Roth, Karlsruhe, D) in Waschpuffer TBS-T (Tris-buffered saline-Tween 20) bei 4 °C über Nacht statt.

Am darauffolgenden Tag wurde der in 3 % (w/v) TMP in TBS-T verdünnte primäre Antikörper mit der Membran für 60 min bei RT auf einem Schwenktisch inkubiert (s. Tabelle 12). Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für 10 min wurde der Spezies-spezifische Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper in 3 % (w/v) TMP in TBS-T eingesetzt (s. Tabelle 13). Die Inkubation erfolgte für 45 min bei RT auf dem Schwenktisch. Nach Wiederholung der vorherigen Waschschrte konnte die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung mittels Chemilumineszenz erfolgen.

Für die Detektion mittels Chemilumineszenz wurde das Pierce™ ECL Western Blotting Substrate Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Verfahren basiert auf der Oxidation von Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Bei der Reaktion wird Licht freigesetzt, das einen Röntgenfilm belichtet. Diese Methode stellt ein hochsensitives Nachweisverfahren zur Detektion von immobilisierten Antigenen dar.

Die in zwei Klarsichtfolien eingebettete Membran wurde bei RT für 1 min mit Substrat inkubiert und anschließend, abhängig von der Reaktionsstärke, in einem Zeitraum von wenigen Sekunden bis zu 15 min auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences, Amersham, UK) belichtet. Der Röntgenfilm wurde in einer automatischen Entwicklungsmaschine (AGFA curix 60, AGFA, Mortsel, B) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

2.6.7 Massenspektrometrische Analyse

Die Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse zur Generierung von Gesamtproteom- und Sekretomdaten erfolgte mit der SPEED-Methode (Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion), die aus drei obligatorischen Schritten besteht, nämlich Ansäuerung, Neutralisation und Verdau von Proteinen (s. Abbildung 14) [145]. SPEED ist eine universelle Methode zur Peptidgenerierung aus verschiedenen Ausgangsmaterialien und ist auch für lyse-resistente Probentypen leicht anwendbar, da reine Trifluoressigsäure (TFA) für eine hocheffiziente Proteinextraktion durch vollständige Probenauflösung verwendet wird.

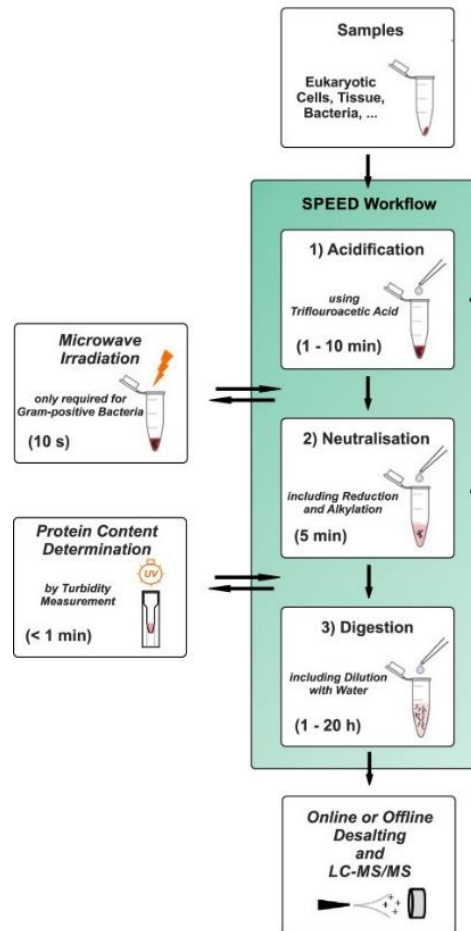


Abbildung 14: Workflow der SPEED-Methode

Doellinger © 2020 Molecular & Cellular Proteomics 19(1): p. 209-222

2.6.7.1 Ansäuerung von Probenmaterial und Neutralisation von Proteinlysaten

Für die Herstellung von Probenmaterial zur Analyse des Gesamtproteoms wurden die zu untersuchenden Stämme auf R-Minimalmedium-Agarplatten ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37 °C kombiniert mit 5 % CO₂ bebrütet. Pro Stamm wurden jeweils drei Platten beimpft, sodass jeweils drei biologische Replikate untersucht werden konnten. Anschließend wurde von jeder Platte Koloniematerial mit einer TFA-resistenten 1 µl Öse abgenommen und in 120 µl 100 % TFA eingerührt und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren homogenisiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei RT. Reines TFA ist eine starke Säure und ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für Proteine. Sie löst Zellen und Gewebe innerhalb weniger Minuten bei Raumtemperatur auf und führt zu klaren Lysaten. Die Ansäuerung bei Gram-positiven Bakterien resultiert allerdings aufgrund von unlöslichen Zellwandkomponenten in trüben Lysaten, weshalb die Proben nach der Inkubation für 3 min auf 70 °C erhitzt wurden. Der Ansäuerung mit TFA folgte sogleich die Neutralisation der Proben mit dem 10 x Volumen an 2 M Tris-Puffer. Es wurden 80 µl je Probe in 800 µl 2 M Tris-Puffer pipettiert, wodurch die TFA-Lysate neutralisiert wurden. Bei diesem Schritt präzipitieren die Proteine und bilden feine homogene Partikel, die jedoch aufgrund des hohen Salzgehaltes der Probe nicht

sedimentieren. Nach erfolgten Sterilkontrollen in LB-Medium wurden die Proben aus dem S3-Labor ausgeschleust und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Für die Analyse des Sekretoms wurden die hergestellten Kulturüberstände (s. 2.4.4) verwendet und zunächst die Proteine durch Behandlung mit Aceton gefällt. Pro Stamm erfolgte die Aufarbeitung auch hier jeweils mit drei biologischen Replikaten. Für die Acetonfällung wurden 4 ml KÜS mit 16 ml vorgekühltem Aceton gemischt und für 1 – 2 Stunden bei -20 °C gekühlt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12000 x g, woraufhin der Überstand verworfen und das Pellet mit dem 3 x Volumen an 100 % TFA angesäuert wurde. Die Neutralisation des Lysats wurde direkt im Anschluss wiederum mit dem 10 x Volumen an 2 M Tris-Puffer erreicht. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben ebenfalls bei -20 °C gelagert.

2.6.7.2 Trypsin-Verdau von Proteinen

Vor dem Verdau der Proteine müssen die Disulfidbrücken reduziert und alkyliert werden. Dafür wurden die Proben mit einem Gemisch aus 100 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) und 400 mM 2-Chloracetamid (CAA) im Verhältnis 10:1 versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Die Proteinkonzentrationen wurden anschließend anhand einer Trübungsmessung bei 360 nm mit je 100 µl Probe am GENESYS™ 10S UV-Vis Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Vor dem Trypsin-Verdau wurden alle Proben auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Im Falle der Proben für die Gesamtproteomanalyse wurden die Proben mit 2 M Tris-Puffer und TFA (10:1) auf eine Konzentration von 0,3 µg/µl mit einer Gesamtmenge von 300 µl verdünnt, die Proben für die Sekretomanalyse wurden analog auf eine Konzentration von 0,2 µg/µl eingestellt. Die Konzentrationen richteten sich nach dem Lysat mit dem geringsten Messwert.

Anschließend wurden die Proteine in den Proben mit Trypsin verdaut, was zu einer vollständigen Auflösung der Protein-Partikel führt. Damit einhergehend werden die Lysate klar, da die entstehenden Peptide wasserlöslich sind. Zur Proteolyse wurde den Proben 1,2 ml Wasser und 1 µl Trypsin beigefügt und das Proteingemisch schüttelnd bei 400 rpm für 20 Stunden bei 37 °C verdaut. Am darauffolgenden Tag wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 30 µL 100 % TFA gestoppt, da der pH-Wert in den Proben durch die Zugabe von TFA ins Saure umschlägt. Die Veränderung des pH-Wertes wurde mit Hilfe von pH-Streifen überprüft.

2.6.7.3 Entsalzung von Peptidgemischen

Die Entsalzung der Peptidgemische wurde unter Verwendung sogenannter C18-Säulen durchgeführt. Dafür wurden in 200 µl Pipettenspitzen drei Lagen von C18-Quarzfiltern (ENVI™-18 DSK SPE Disk, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach der Methode von

Rappsilber *et al.* [146] geschichtet. Zur Aktivierung der Quarzfilter wurden die Säulen mit 200 μL Methanol befüllt und für 2 min bei 2000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen mit 200 μL 0,1 % TFA gewaschen. Nebenbei wurden die aus dem Kapitel 2.6.7.2 behandelten Proben für 2 min bei 8000 x g zentrifugiert, um feste Bestandteile wie z.B. Zellwandtrümmer der Bakterien zu pelletieren. Diese festen Bestandteile sind unlöslich und unverdaulich und würden die Quarzfilter verstopfen. Anschließend wurden die Säulen etappenweise mit 200 μL Probenüberstand beladen, bis das gesamte Volumen der Probe durch den Filter zentrifugiert wurde. Die Säulen wurden im Anschluss mit dem 1,5 x Probenvolumen an 0,1 % TFA gewaschen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der Peptide erfolgte mit 80 μL 80 % Acetonitril / 0,1 % TFA Lösung für 3 min bei 3000 x g. Das Eluat wurde daraufhin für 45 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, um einerseits organische Lösungsmittel und Salze zu eliminieren und andererseits die Proben aufzukonzentrieren. Nach dem Trocknen wurden die Peptide in 20 μL 0,1 % TFA aufgenommen und die Konzentration mit je 1,5 μL bei 280 nm am Implen NanoPhotometer® NP80 UV-Vis Spektralphotometer (Implen, München, D) gemessen. Bis zur Analyse mit dem Massenspektrometer (s. 2.6.7.4) in der Abteilung ZBS 6 „Proteomik und Spektroskopie“ des Robert Koch-Institutes wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.6.7.4 Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS)

Die massenspektrometrische Analyse wurde in der Abteilung ZBS 6 „Proteomik und Spektroskopie“ des Robert Koch-Institutes von Dr. Jörg Döllinger und Kollegen durchgeführt. Die Proben wurden dabei auf einer EASY-nanoLC 1200 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) analysiert, die online mit einem Q Exactive™ HF-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gekoppelt ist. 1 μg an Peptiden wurden auf einer 200 cm $\mu\text{PAC}^{\text{TM}}$ -Säule (PharmaFluidics, Gent, Belgien) unter Verwendung eines 180-minütigen Gradienten von 80 % Acetonitril / 0,1 % Ameisensäure in 99,9 % Wasser / 0,1 % Ameisensäure bei einer Flussrate von 300 nL/min getrennt [147]. Die Säulentemperatur wurde mit Hilfe eines Butterfly-Heizers (Phoenix S&T, Chester, PA, USA) auf 50 °C gehalten. Die Q Exactive™ HF wurde datenabhängig im m/z-Bereich (Masse/Ladung) von 300 - 1.650 mit einer Auflösung von 120.000 unter Verwendung eines AGC-Zielwertes (Automatic Gain Control) von 3×10^6 mit einer maximalen Injektionszeit von 20 ms betrieben. Bis zu 10 der intensivsten 2+ - 5+ geladenen Ionen wurden für die höherenergetische kollisionsinduzierte Dissoziation (HCD) mit einer normalisierten Kollisionsenergie (NCE) von 25 % ausgewählt. Fragmentspektren wurden bei einer Isolationsbreite von 2,0 Th und einer Auflösung von 30.000@200m/z unter Verwendung eines AGC-Zielwertes von 1×10^5 mit einer maximalen Injektionszeit von 50 ms aufgenommen. Der minimale MS²-Zielwert wurde auf 1×10^4 eingestellt. Nach der

Fragmentierung wurden die Peaks für 30 s innerhalb eines 10 ppm-Fensters dynamisch von der Vorläufer-Auswahl ausgeschlossen. Peptide wurden mittels Elektrospray mit einem Edelstahl-Emitter, I.D. 30 μm (Proxeon, Odense, Dänemark), bei einer Sprühspannung von 2,1 kV und einer beheizten Kapillartemperatur von 275 °C ionisiert.

2.6.7.5 Bioinformatische Analyse der Proteomdaten

Die bioinformatischen Analysen wurden in der vorliegenden Arbeit von Dr. Jörg Döllinger aus der Abteilung ZBS 6 „Proteomik und Spektroskopie“ des Robert Koch-Institutes durchgeführt. Die Massenspektren wurden mit dem MaxQuant Programm (Version 1.6.5) ausgewertet [148]. Zunächst wurden die Massen der Vorläufer-Ionen mit der Option „software lock mass“ rekali­briert, bevor die MS²-Spektren mit dem Andromeda-Algorithmus gegen Sequenzen des kompletten Proteoms von *Bcbva* CI (UP000001657, heruntergeladen am 21.3.2021) und *B. anthracis* Shikan-NIID (UP000217643, heruntergeladen am 21.3.2021, redundant zu *B. anthracis* Vollum) gesucht wurden. Die Spektren wurden mit einer Toleranz von 4,5 ppm im MS¹- und 20 ppm im HCD-MS²-Modus, strenger Trypsin-Spezifität (KR nicht P) und unter Berücksichtigung von bis zu zwei fehlenden Spaltstellen gesucht. Die Cystein-Carbamidomethylierung wurde als feste Modifikation und die Methioninoxidation sowie die N-terminale Acetylierung von Proteinen als variable Modifikationen eingestellt. Die False Discovery Rate (FDR) wurde für Peptid- und Proteinidentifikationen auf 1 % festgelegt. Die Identifizierungen wurden zwischen den Proben mit der Option „match between run“ innerhalb eines Match-Fensters von 0,7 min und eines Alignment-Fensters von 20 min übertragen.

Die statistische Analyse der MaxQuant-Ergebnisse wurde in Perseus (Version 1.6.5) durchgeführt [149]. Zunächst wurden Kontaminanten entfernt. Die relative Proteinquantifizierung wurde auf Basis der log₂-transformierten LFQ-Intensitäten durchgeführt. Zunächst wurden die Proteinintensitäten auf den Probenmedian normalisiert. Der Median der dreifachen Analyse jedes Proteins wurde dann verwendet, um den Fold Change zwischen Kulturüberstand und Zelle nach Imputation der Intensitäten in den Zellproben zu berechnen. Ein FC-Cutoff $\geq + 2$ wurde verwendet, um sekretierte Proteine von Artefakten zu unterscheiden. Anschließend wurden Proteine, die nicht in mindestens zwei Triplikaten von mindestens einer Probe quantifiziert wurden, entfernt. Verbleibende fehlende Werte wurden nach einer Normalisierung auf den Median der Intensität für jedes Protein aus einer Normalverteilung (Breite 0,3, Downshift 1,8) ersetzt. Potentiell diskriminierende Antigene zwischen *Bcbva* und *B. anthracis* wurden mit FDR-bereinigten p-Werten aus einem t-Test mit einer permutationsbasierten FDR von 0,01 (250 Randomisierungen, s₀ = 1) identifiziert.

2.7 Software und Internet-Datenbanken

In nachfolgender Tabelle sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Software und Internet-Datenbanken aufgeführt, die zur Datenauswertung verwendet wurden.

Tabelle 15: verwendete Software und Datenbanken

Programm / Datenbank	Funktion	Hersteller / Website
ABI7500 System Software Version 1.4	Auswertung Ergebnisse Real-Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt, D
ZEISS Axiovision 4.9 Software	Aufnahme und Auswertung lichtmikroskopischer Bilder	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, D
Geneious Prime® Version 11.0	Sequenzauswertung	Biomatters Ltd, Auckland, NZ
Adobe Photoshop CS6	Bildauswertung und -bearbeitung	Adobe Systems GmbH, München, D
Microsoft Office Excel	Datenauswertung	Microsoft Deutschland GmbH, D
GraphPad Prism Version 8	Datenauswertung und Kurvenerstellung	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
NCBI („National Center for Biotechnology Information“)	Homologie-Vergleiche, BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
ImageLab 6.0	Darstellung von DNA in Agarosegelen (Größenbestimmung von DNA-Fragmenten)	Bio-Rad, München, D
UniProt („Universal Protein Database“)	Homologie-Vergleiche, BLAST	https://www.uniprot.org/
InterPro	Sequenzanalyse und Klassifizierung von Proteinen	https://www.ebi.ac.uk/interpro/

3 Ergebnisse

3.1 Transkriptomanalyse

Die afrikanischen *Bcbva*-Stämme besitzen die Toxin- und Kapselplasmide pXO1 und pXO2 von *B. anthracis*, jedoch einen chromosomalen Hintergrund von *B. cereus*, und zeigen daher sowohl auf bakteriologischer als auch molekularer Ebene Merkmale beider Spezies. Die Aktivität des pXO1-kodierten globalen Regulators AtxA bestimmt die Hochregulierung der Toxin- und Kapselgenexpression in vergleichbaren Wachstumsphasen in *B. anthracis* und *Bcbva*. Auf dieser Grundlage und um ein umfassenderes Bild auf Basis der globalen Genexpression zu erhalten, wurde eine vergleichende Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung an voll virulenten Stämmen von *Bcbva* und *B. anthracis* durchgeführt. Dabei sollten sowohl Gemeinsamkeiten in der Genregulation als auch Unterschiede zwischen den beiden Spezies aufgeklärt werden.

3.1.1 Auswahl der Zielstämme und Kultivierungsbedingungen

Für die Analyse wurden zwei *Bcbva*-Stämme, die beiden ursprünglichen Isolate aus Kamerun, *Bcbva* CA, und der Elfenbeinküste, *Bcbva* CI, als auch zwei klassische *B. anthracis*-Stämme, der sehr bekannte Laborstamm *B. anthracis* Vollum und das Wildtyp-Isolat *B. anthracis* 14RA5914 Dobichau (s. Tabelle 1) ausgewählt. Letzterer wird in der vorliegenden Arbeit der Einfachheit halber nur noch als *B. anthracis* Dobichau bezeichnet. Alle zu untersuchenden Stämme wurden unter zwei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen inkubiert und RNA für die nachfolgende RNA-Sequenzierung isoliert. Die Bakterien wurden bei 37 °C sowohl in BHI-Flüssigmedium kombiniert mit atmosphärischem Sauerstoffgehalt („O₂-Bedingung“) als auch in BHI-Flüssigmedium mit 0,8 % Natriumbikarbonat kombiniert mit 5 % CO₂ („CO₂-Bedingung“) angezogen. Bei dem Wachstum in CO₂-Atmosphäre handelte es sich um die experimentelle Bedingung, da bei Vorhandensein von CO₂ und Natriumbikarbonat im Kulturmedium das Wirtsmilieu bei einer Infektion mit *B. anthracis* simuliert wird und folglich Virulenzfaktoren wie z.B. Toxin- und Kapselgene verstärkt exprimiert werden [52, 150, 151]. Um weitere Virulenzgene identifizieren und Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede hinsichtlich der Pathogenität bei *Bcbva* und *B. anthracis* aufklären zu können, wurde die Genexpression unter wirtsähnlichen Bedingungen in Bezug zur Umgebungsbedingung betrachtet. Das Wachstum der Bakterien in O₂-Atmosphäre stellte für die RNA-Sequenzierung somit stets die Kontrollbedingung dar.

3.1.2 Ermittlung des Untersuchungszeitpunktes

Als Zeitpunkt für die mRNA-Extraktion wurde der Übergang von später exponentieller in beginnende stationäre Wachstumsphase während einer Kultivierung der Stämme in O₂- bzw. CO₂-Bedingung ausgewählt, da in letzterer zu diesem Zeitpunkt die Expression bekannter Virulenzfaktoren wie Toxin- oder Kapselgene am höchsten ist [59, 151, 152]. Die Auswahl des Zeitpunktes der Entnahme der Bakterienkultur für die Isolierung von RNA war von entscheidender Wichtigkeit, da zum einen der mRNA-Gehalt in der Zelle maximal sein sollte, zum anderen sich die verschiedenen Bakterienstämme in den zwei Wachstumsbedingungen weitestgehend synchron verhalten sollten, um eine ähnliche Zellzahl und einen ähnlichen metabolischen Zustand zu gewährleisten. Aufgrund dessen wurden Wachstumskurven (s. 2.4.3) für alle vier *Bacillus*-Stämme in BHI-Medium sowohl unter O₂- als auch CO₂-Bedingung erstellt (s. Abbildung 15). Insgesamt zeigten die vier Stämme in CO₂-Atmosphäre ein etwas verzögertes Wachstum im Vergleich zur O₂-Bedingung, was nicht überraschend ist, da die Energieproduktion im Allgemeinen in aeroben Atmosphären effizienter ist. Dieser Trend war bei den beiden *Bcbva*-Stämmen allerdings in der exponentiellen Wachstumsphase deutlicher zu beobachten als bei den beiden *B. anthracis*-Stämmen (s. Abbildung 15 B). Bei *B. anthracis* Vollum konnte in der lag- und exponentiellen Phase ein langsames Wachstum verzeichnet werden, was aufgrund einer schlecht gewachsenen Vorkultur auf die vergleichsweise geringere Start-OD der Hauptkultur zurückzuführen ist. Insgesamt erreichten jedoch alle Stämme sowohl in O₂- als auch in CO₂-Atmosphäre nach vier Stunden Wachstum das Ende der exponentiellen Phase mit einer ähnlichen Zelldichte, nach sechs Stunden war die stationäre Phase endgültig erreicht (s. Abbildung 15 A). Aufgrund der Ergebnisse wurde eine Wachstumsdauer bis zur RNA-Extraktion von 4,5 Stunden ausgewählt, ausgehend vom Zeitpunkt des Überimpfens aus der Vorkultur in die Untersuchungskultur. Zu diesem Zeitpunkt zeigten alle Stämme innerhalb der beiden Wachstumsbedingungen eine ähnliche Wachstumskinetik und zwischen O₂- und CO₂-Kultivierung ähnliche Zelldichten, gemessen anhand der OD₆₀₀ (~ 2,5). Die Wachstumsdauer markierte außerdem bei allen Stämmen in beiden Bedingungen den gewünschten Übergang von später exponentieller in beginnende stationäre Wachstumsphase.

Nachdem der Untersuchungszeitpunkt für die Transkriptomanalyse anhand der Wachstumskurven bestimmt wurde, wurden für die anschließende RNA-Sequenzierung pro Stamm jeweils drei Kulturen bei O₂- Bedingung und drei Kulturen bei CO₂-Bedingung inkubiert, sodass pro Stamm und pro Kultivierungsbedingung jeweils drei biologische Replikate untersucht werden konnten. Zum Zeitpunkt der Bakterienentnahme für die RNA-Extraktion nach 4,5 Stunden Wachstum wurde außerdem die OD der Kultur photometrisch bestimmt. Eine tabellarische Übersicht über die Werte der OD-Messungen für die Wachstumskurven

bzw. die Kulturen für die RNA-Extraktion ist im Anhang (s. Tabelle 34 und Tabelle 35) zu finden.

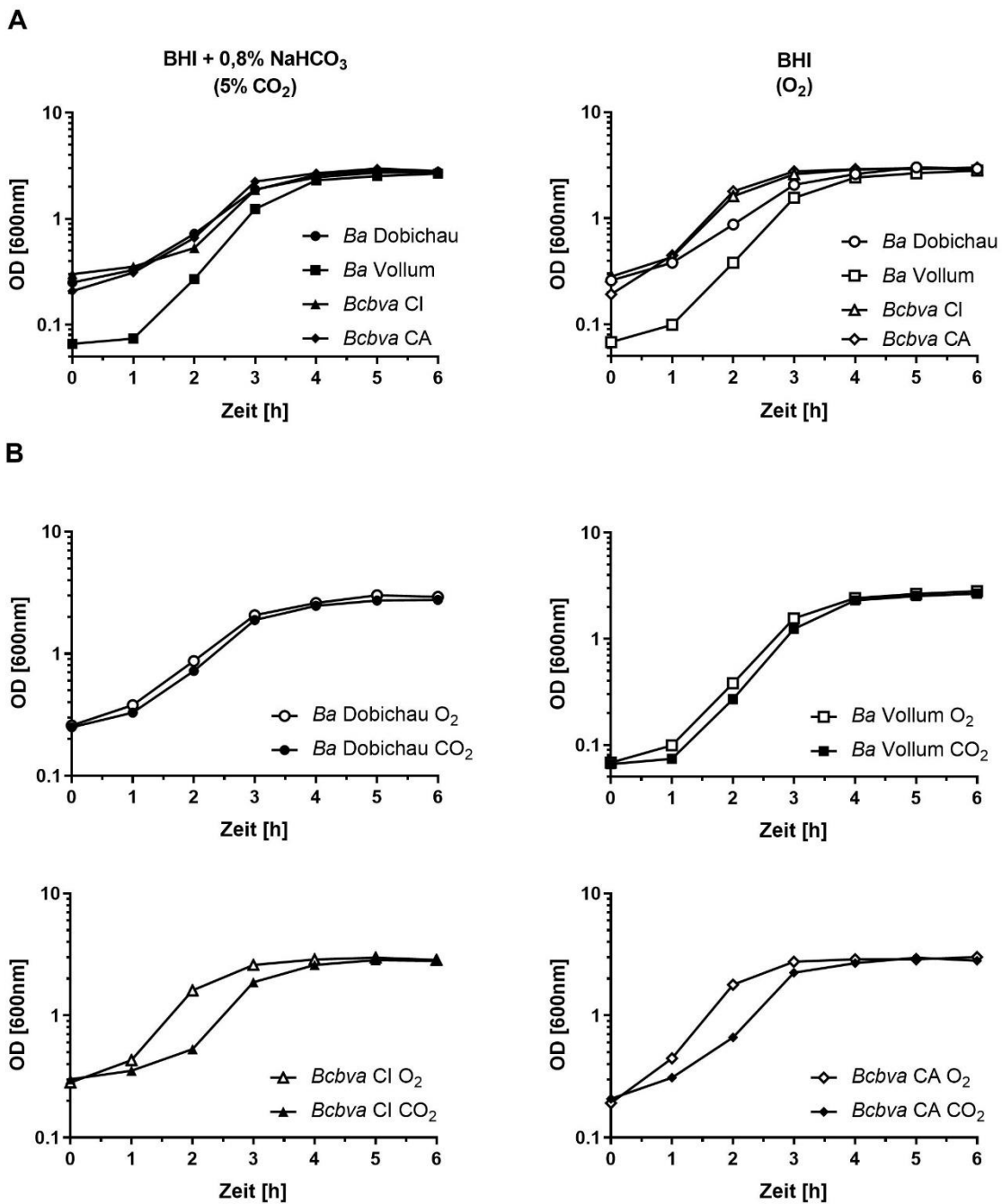


Abbildung 15: Wachstumskurven von *B. anthracis* und *Bcbva* in BHI-Medium unter O₂- und CO₂-Bedingung

Dargestellt ist das Wachstum bei 37 °C (O₂) mit 0,8 % Natriumbikarbonat und 5 % CO₂ (CO₂) von allen vier *Bacillus*-Stämmen pro Bedingung (A) und von jeweils einem der vier *Bacillus*-Stämme für beide Bedingungen (B). OD = Optische Dichte.

3.1.3 Quantitäts- und Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA

Für eine erfolgreiche RNA-Sequenzierungsanalyse ist eine reine und intakte Gesamt-RNA sowie eine ausreichend hohe Konzentration an mRNA entscheidend, die in nur sehr geringen Mengen in der Zelle vorhanden ist [153]. Vor der Herstellung der cDNA-Bibliotheken war durch die vorbereitenden Arbeitsschritte der DNase-Behandlung und rRNA-Abreicherung mit zusätzlichen Verlusten der RNA-Konzentration zu rechnen. Aufgrund dessen wurde zum Untersuchungszeitpunkt nach 4,5 h Wachstum 3 ml Bakterienkultur für die Extraktion verwendet, um die mRNA-Ausbeute zu erhöhen. In Hinblick auf die Probenanzahl (vier Stämme unter zwei Bedingungen mit je drei biologischen Replikaten = 24 Proben) und der Limitierungen im Protokoll durch die Bindungskapazität der RNA-Säulen stellten 3 ml das maximale Aufreinigungsvolumen bzgl. der Arbeiten im S3-Labor dar. Hinzu kam die generell geringe Stabilität bakterieller mRNA, die nur eine ungefähre Halbwertszeit von wenigen bis 20 min besitzt [153] und das ubiquitäre Vorhandensein von stabilen RNasen, wodurch ein besonders vorsichtiger Umgang mit RNA unabdingbar war. Daher wurde im Anschluss an die RNA-Extraktion und vor den nachfolgenden Arbeitsschritten die Konzentration der RNA fluorometrisch und deren Reinheitsgrad elektrophoretisch bestimmt. Die Konzentrationsbestimmungen am Qubit-Fluorometer erfolgten vor sowie nach der Behandlung der Proben mit DNase I (s. 2.5.3.2) und rangierten vor der Behandlung zwischen 100 ng/µl bis rund 2 µg/µl sowie nach der Behandlung zwischen 20 ng/µl und knapp 45 ng/µl. Eine tabellarische Auflistung der gemessenen Konzentrationen ist im Anhang (s. Tabelle 36 und Tabelle 37) aufgeführt.

Geringste Mengen an verbliebener DNA in den Präparationen würde zu falsch positiven Transkriptionssignalen führen. Um das Vorhandensein von DNA-Resten nach der DNase-Behandlung ausschließen zu können, wurde eine qPCR mit RNA für den Nachweis des Hauhaltsgens *rpoB* (β -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase) und des Toxingens *pagA* durchgeführt. Erst wenn sich kein Amplifikationsprodukt nachweisen ließ, wurde die Integrität der RNA in einer automatisierten Kapillar-Elektrophorese mit dem Agilent Bioanalyzer bzw. Fragment Analyzer untersucht. Für jede Probe wird das rRNA-Verhältnis berechnet und als RIN bzw. RQN als ein Wert zwischen 1 und 10 ausgegeben. Eine intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA von sehr hoher Qualität weist dabei den höchsten Wert von 10 auf. Demgegenüber stellt die 1 eine komplett degradierte und fragmentierte RNA mit geringster Qualität dar (s. 2.5.5.1). Die gemessenen Werte der RNA-Integritäten sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 16: RNA-Integritäten

Bestimmung des Reinheitsgrades der RNA-Proben über die RIN bzw. RQN am Agilent Bioanalyzer oder Agilent Fragment Analyzer. R = Replikat, RIN = RNA Integrity Number, RQN = RNA Quality Number.

Stamm	RIN/RQN – O ₂			RIN/RQN – CO ₂		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<i>Ba</i> Dobichau	7,7	8,2	8,0	8,0	7,4	7,8
<i>Ba</i> Vollum	7,8	8,1	8,7	8,2	8,1	8,2
<i>Bcbva</i> CI	8,0	7,9	7,5	7,5	6,6	8,0
<i>Bcbva</i> CA	7,8	7,9	7,9	6,3	6,0	6,9

Als Grenzwert für die RNA-Sequenzierung wurde eine RNA-Integrität ≥ 6 festgelegt, da niedrigere Werte zu unbefriedigenden Ergebnissen führen (A. Thürmer, persönliche Mitteilung). Somit war grundsätzlich die Qualität aller RNA-Proben als gut bis sehr gut einzuschätzen, da die RIN/RQN-Werte zwischen 6 und 9 lagen.

Zusätzlich zu den Zahlenwerten wurden die RNA-Komponenten (vornehmlich die rRNA-Fraktion) anhand ihrer detektierten Fluoreszenz als „virtuelles Gelbild“ mit den spezifischen rRNA-Bandengrößen (s. Abbildung 16 A) sowie als Proben-Elektropherogramm mit den spezifischen rRNA-Fluoreszenzpeaks (s. Abbildung 16 B) dargestellt, um die Reinheit der einzelnen RNA-Proben graphisch abzubilden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 exemplarisch für die Proben von *B. anthracis* Dobichau, *Bcbva* CI und *Bcbva* CA dargestellt, die mittels Fragment Analyzer ermittelt wurden. Die RNA-Proben von *B. anthracis* Vollum wurden im Bioanalyzer untersucht und sind im Anhang (s. Abbildung 37) aufgeführt.

Jede der insgesamt 24 RNA-Proben zeigte zwei deutliche Banden auf einer Höhe von ca. 2900 nt und 1500 nt und zwei Peaks mit dem spezifischen Fluoreszenzsignal für die 23S und 16S rRNA. Weiterhin war eine schwache Bande unterhalb von 200 nt zu erkennen, bei der es sich aufgrund der scharfen Abgrenzung höchstwahrscheinlich um die 5S rRNA mit einer Größe von 120 nt handelte.

In den RNA-Proben zeigten sich keinerlei hochmolekulare Banden, wodurch eine gDNA-Kontamination in den Proben, neben der Verifikation in der qPCR, zusätzlich ausgeschlossen werden konnte. Die Banden und Peaks der rRNA waren scharf abgegrenzt und klar erkennbar, was sich in den guten RIN-Werten widerspiegelte und auf eine intakte RNA schließen ließ, die kaum degradiert oder fragmentiert vorlag. Die Analysen bestätigten eine sehr gute Quantität und Qualität der RNA-Proben, die somit für die Verarbeitung in der RNA-Sequenzierung als geeignet eingestuft wurden.

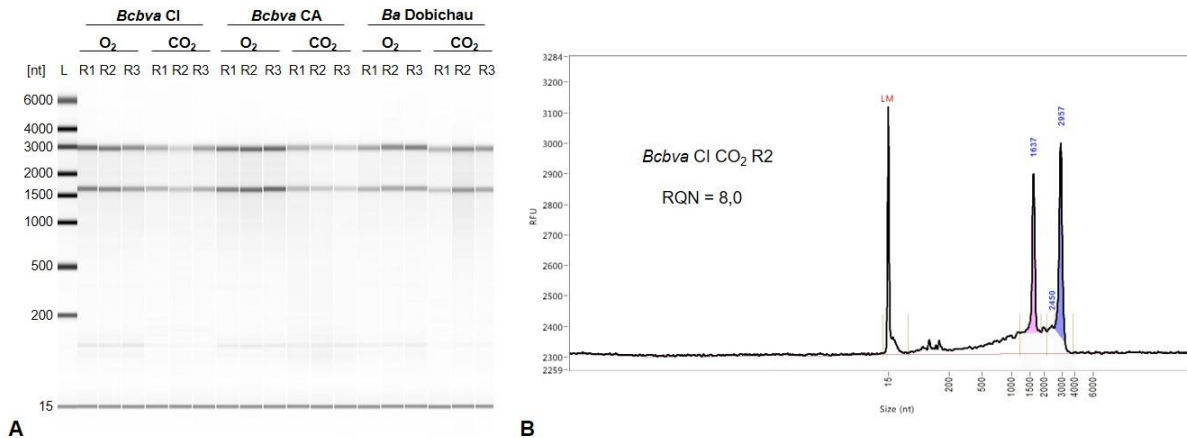


Abbildung 16: Fragment Analyzer-Ergebnisse für die RNA-Proben von *B. anthracis* Dobichau, *Bcbva CI* und *Bcbva CA*

(A) „virtuelles Gelbild“ für alle drei biologischen Replikate pro Bedingung und pro Stamm. Die Bande bei 15 nt stellt die interne Markerbande dar. (B) Proben-Elektropherogramm, exemplarisch gezeigt für Replikat 2 der CO₂-Bedingung von *Bcbva CI* mit einer RIN von 8,2.

nt = nucleotide, L = Ladder, R = Replikat, RFU = relative fluorescence units, LM = lower marker

3.1.4 Überprüfung der Genexpression zum Untersuchungszeitpunkt

Bevor die RNA-Proben in dem zeitaufwändigen und auch kostspieligen RNA-Sequenzierungsprozess verwendet wurden, sollte die Genexpression verschiedener Toxin- und Kapselgene untersucht werden. Dies diente der Verifizierung des ausgewählten Untersuchungszeitpunktes, da die zu analysierenden Gene beim Übergang in die stationäre Phase unter wirtsähnlichen Bedingungen (CO₂-Bedingung) im Vergleich zur Umgebungsbedingung (O₂-Bedingung) bekanntermaßen stärker exprimiert werden. So konnte sichergestellt werden, dass die Extraktion der RNA zum Zeitpunkt der Hochregulation von Virulenzgenen erfolgte und die Identifizierung weiterer Pathogenitätsfaktoren anhand der RNA-Sequenzierung möglich wäre.

Es wurden als Zielgene für die Überprüfung der Genexpression zum ausgewählten RNA-Extraktionszeitpunkt neben *pagA* (Protektives Antigen) und *capB* (PDGA-Kapsel) auch das für das *Bcbva*-spezifische Antigen kodierende Gen *pXO2-60* und als Kontrolle das Haushaltsgen *rpoB* ausgewählt. Es wurde pro Stamm und Bedingung aus der mit DNase-I behandelten RNA komplementäre DNA mit spezifischen Primern (s. 2.5.3.3) von jeweils einem Replikat hergestellt und in die Amplifikationsreaktion eingesetzt. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der qRT-PCR, die mit spezifischen TaqMan-Sonden durchgeführt wurde (s. 2.5.2.4), für jedes Gen graphisch dargestellt. Da die Analyse nur einen Vorversuch darstellte, wurde auf das Mitführen von Plasmidstandards und somit auf das Erstellen einer Standardkurve verzichtet. Die Kopienzahl des jeweiligen Zielgens im Reaktionsansatz konnte dementsprechend nicht ermittelt werden, um eine absolute Quantifizierung der Expression vorzunehmen. Abgebildet

und verglichen wurden daher nur die gemessenen Ct-Werte, wobei ein vergleichsweise niedrigerer Ct-Wert für eine höhere Expression in der jeweiligen Bedingung steht.

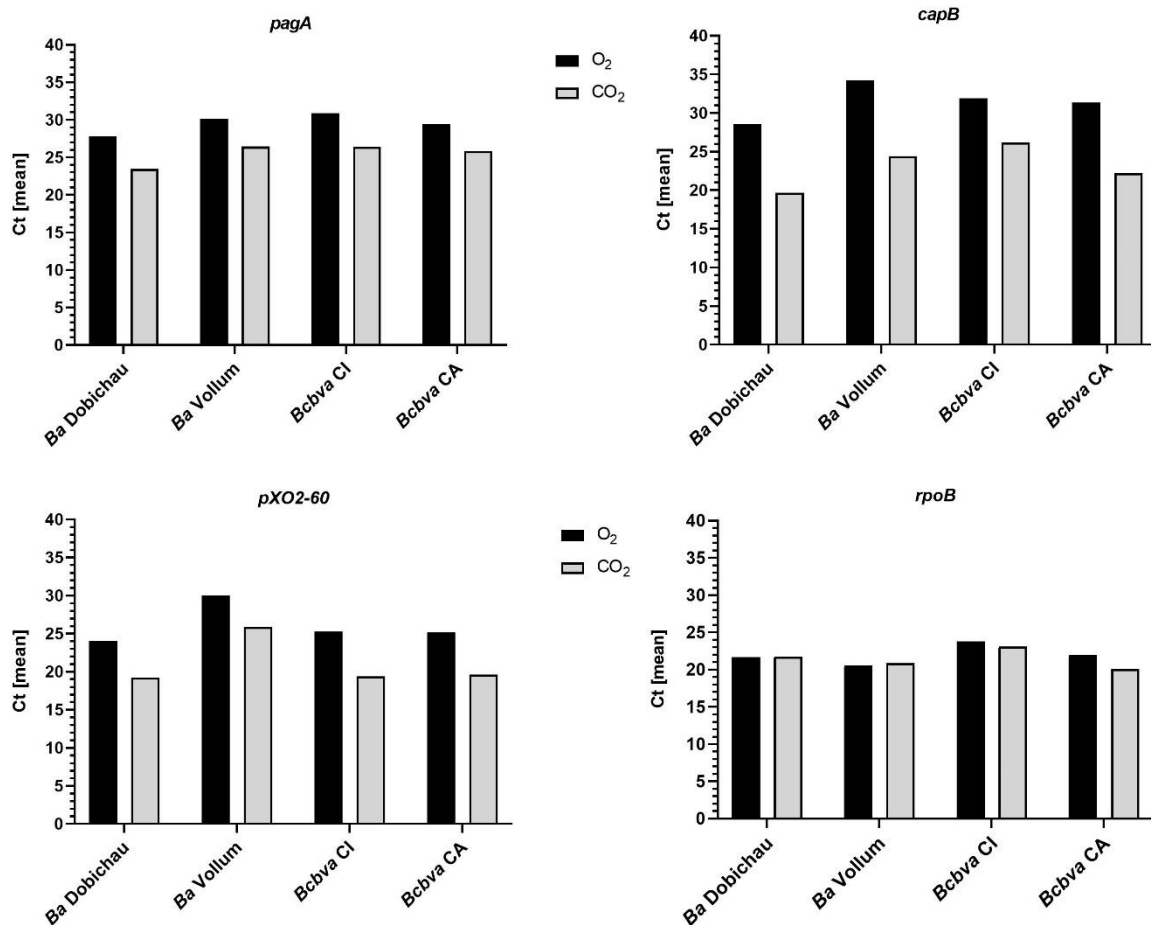


Abbildung 17: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR

Kontrolle der Genexpression von vier Zielgenen zum ausgewählten RNA-Extraktionszeitpunkt mittels quantitativer RT-PCR. Ein niedrigerer Balken symbolisiert einen geringeren Ct-Wert, der eine stärkere Expression des Gens in der jeweiligen Bedingung widerspiegelt. Ct = Cycle Threshold.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fiel die deutliche Steigerung der Expression von *capB* bei allen vier untersuchten Stämmen unter wirtsähnlichen Bedingungen auf (niedrigere Balkenhöhe bzw. Ct-Werte). Die Gene *pagA* und *pXO2-60* waren in Gegenwart von CO_2 und Natriumbikarbonat ebenfalls sowohl bei den beiden *B. anthracis*- als auch *Bcbva*-Isolaten stärker exprimiert. Die Expressionen des Kontrollgens *rpoB* wiesen keine oder nur minimale Schwankungen zwischen den beiden Untersuchungsbedingungen auf und spiegelten somit eine erwartbare konstitutive Expression wider.

Insgesamt entsprachen die Expressionsunterschiede der ausgewählten Zielgene zwischen den beiden Bedingungen zum Untersuchungszeitpunkt den erwarteten Ergebnissen, woraufhin die RNA-Proben für die rRNA-Abreicherung (s. 2.5.5.2) und Herstellung der cDNA-Bibliotheken (s. 2.5.5.3) verwendet wurden. Der Erfolg der rRNA-Depletion als auch die der

Bibliotheken-Herstellung wurde im Agilent Bioanalyzer bzw. Fragment Analyzer überprüft (s. Anhang Abbildung 38 und Abbildung 39, exemplarisch gezeigt für die Proben von *B. anthracis* Dobichau, *Bcbva* CI und *Bcbva* CA). Anschließend wurden die cDNA-Bibliotheken sequenziert und die erhaltenen Transkriptomdaten analysiert.

3.1.5 Korrelation der biologischen Replikate bei der RNA-Sequenzierung

Um den Zusammenhang zwischen den sequenzierten DNA-Bibliotheken eines jeden biologischen Replikats zu testen, wurden die Transkriptomdaten der vier Stämme, beider Wachstumsbedingungen sowie aller biologischen Replikate einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, Principal Component Analysis) unterzogen. Dabei handelt es sich um ein statistisches Verfahren, welches einen komplexen Datensatz aus Tausenden von transkribierten Genen auf einen Datenpunkt komprimiert. Die Hauptkomponentenanalyse verwendet Linearkombinationen der Genexpressionswerte pro Replikat und definiert je nach Größe der zugrundeliegenden Varianz einen Punkt im Koordinatenfeld. Zu Gunsten der Übersichtlichkeit wird bei einer Darstellung der Transkriptionsprofile im Koordinatensystem die größte Ausdehnung im Raum als Hauptkomponente 1 (PC1) definiert, dieser kommt damit die größte Varianz zwischen den Replikaten zu. Die Hauptkomponente 2 (PC2) beschreibt die zweitgrößte Varianz im Genexpressionsprofil der Replikate und verläuft orthogonal zur PC1. In dieser räumlichen Ausdehnung haben Gene mit einer starken Varianz einen größeren Einfluss auf die Hauptkomponenten. Je nach Expressionsprofil und Einfluss auf die jeweilige Hauptkomponente errechnet sich sowohl für die x-Achse (PC1) als auch die y-Achse (PC2) ein Wert, welcher schließlich das gesamte Expressionsprofil eines Replikates in der Hauptkomponentenanalyse beschreibt. Da die Unterschiede in den Datensätzen mit der Ausdehnung der Hauptkomponenten im Raum korrelieren, kann die Hauptkomponentenanalyse verwendet werden, um Ausreißer zwischen biologischen Replikaten zu ermitteln. Durch dieses Verfahren konnte die komplexe Datenstruktur der Transkriptomdaten auf ein zweidimensionales Koordinatensystem komprimiert und eine Beurteilung durchgeführt werden.

Die biologischen Replikate eines jeden Stammes zeigten pro Bedingung definierte Cluster in der Hauptkomponentenanalyse, weshalb von einer hohen Korrelation ausgegangen werden konnte (s. Abbildung 18). Die Achsen der Hauptkomponentenanalyse sind nach Wichtigkeit ihrer Unterschiede sortiert, sodass die erste Hauptkomponentenachse (PC1) im Vergleich zur zweiten Hauptkomponentenachse (PC2) einen größeren Unterschied zweier Messpunkte im Falle einer gleichen Entfernung widerspiegelt. Dabei kam bei allen vier Stämmen der PC1-Achse mehr als die Hälfte der Varianz (67 % - 93 %) des gesamten Datensatzes zu, der PC2-Achse kamen zwischen 2 % und 23 % der Varianz zu. Damit konnte in den Analysen insgesamt zwischen 89 % und 95 % der Varianz der gesamten Datensätze erfasst werden.

Auf der PC1-Achse zeigte sich eine deutliche Trennung zwischen den drei biologischen Replikaten der jeweiligen Bedingung, wobei die Datenpunkte bei jedem Stamm eine annähernd identische Achsen-Ausdehnung aufwiesen. Dem gegenüber stand eine geringe Varianz auf der PC2-Achse in den biologischen Replikaten bei den Stämmen *B. anthracis* Vollum und *Bcbva* CI in der O₂-Bedingung bzw. bei *B. anthracis* Dobichau und *Bcbva* CA in der CO₂-Bedingung, die allerdings aufgrund der minimalen Entfernung zwischen den Messpunkten (s. Achsenskalierung) als vernachlässigbar zu betrachten war.

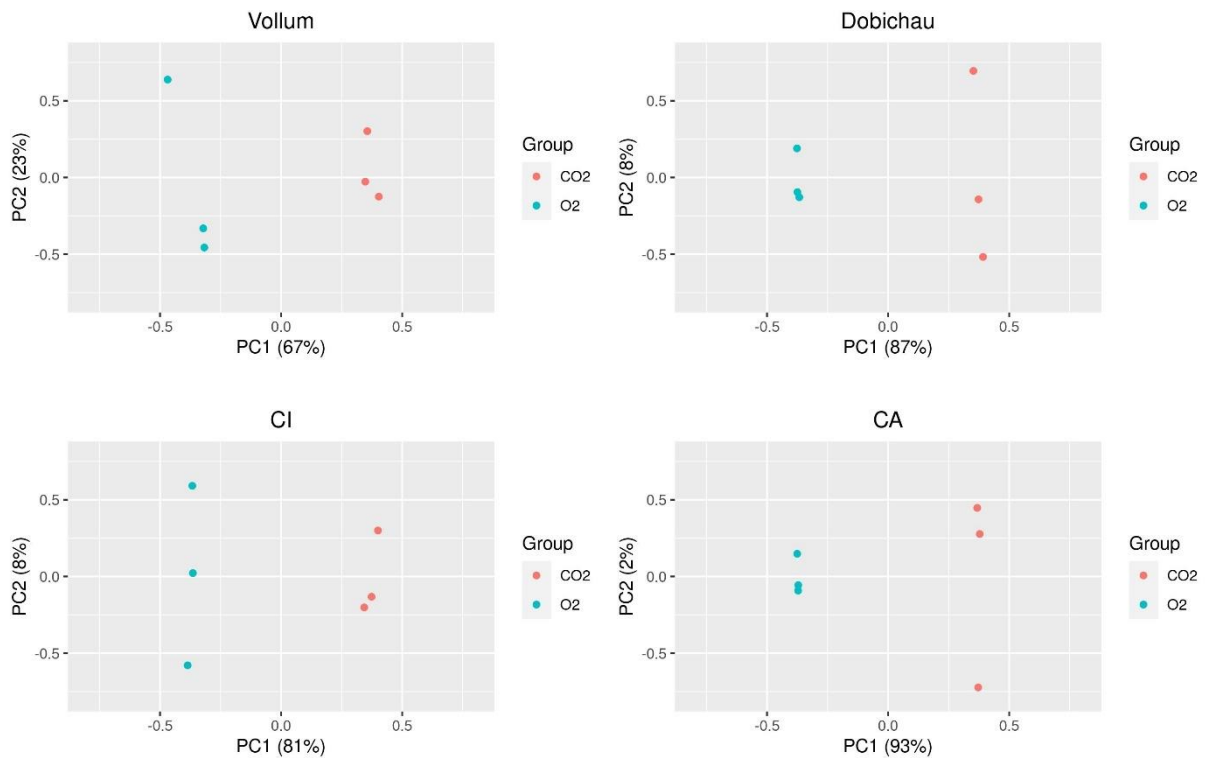


Abbildung 18: PCA-Plots der normalisierten Expressionswerte von *B. anthracis* und *Bcbva*

Hauptkomponentenanalyse zur Korrelationsbestimmung der drei biologischen Replikate einer Wachstumsbedingung (rot = CO₂, blau = O₂) für jeden untersuchten *Bacillus*-Stamm.

PC = Principal Component.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse, dass die Datensätze der jeweiligen biologischen Replikate definierte Cluster nach Kultivierung in O₂- bzw. CO₂-Atmosphäre bildeten und nur einer geringen Streuung innerhalb derselben Bedingung unterlagen. Dadurch war sichergestellt, dass die Transkriptom-Datensätze eine verlässliche Grundlage lieferten, um differentiell exprimierte Gene in den *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen unter CO₂-Bedingung zu bestimmen.

3.1.6 Differentielle Genexpressionsanalyse

Die differentielle Genexpressionsanalyse gibt Auskunft über die transkriptomischen Veränderungen auf Basis der Genexpression mittels des Vergleichs von Proben

unterschiedlicher Bedingungen. Mithilfe der Methode lassen sich in den vorliegenden Sequenzierungsdaten der *B. anthracis*- und *Bcbva*-Proben die Unterschiede in der Expression der Transkripte zwischen den zwei Kultivierungsbedingungen detektieren. Das Ziel dabei ist es, die Gene zu identifizieren, die in der CO₂-Bedingung eine signifikante Veränderung in ihrer Abundanz im Vergleich zur O₂-Bedingung aufweisen, um infolgedessen spezies-spezifische bzw. spezies-übergreifende Erkenntnisse zu Faktoren im Pathogenitätsgeschehen zu erlangen.

3.1.6.1 Bestimmung differentiell exprimierter Gene

Als Matrix für die Analyse wurden die differentiell exprimierten Gene (DEG's) jedes Stammes mit dem jeweiligen annotierten Genom aus drei biologischen Replikaten bestimmt. Gene mit einem angepassten p-Wert < 0,05 und einem FC (Fold Change) von $\geq + 4$ bzw. $\leq - 4,0$ ($\log_2\text{FC} \geq + 2$ bzw. $\leq - 2$) wurden als differentiell exprimiert eingestuft (s. 2.5.5.5). Der Begriff Fold Change spiegelt dabei das Verhältnis von zwei Zuständen wider, wobei in der vorliegenden Arbeit der Ausgangszustand (O₂) mit dem neuen Zustand (CO₂) verglichen und somit die Änderung der Genexpression von der O₂-Bedingung zur CO₂-Bedingung (O₂ → CO₂) betrachtet wurde. Das bedeutet, dass sich die ermittelten Mengen an DEG's immer auf die CO₂-Bedingung beziehen und die generierten log₂FC-Werte anzeigen, um wie vielfach höher bzw. geringer das jeweilige Gen in der CO₂-Bedingung exprimiert wurde.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Anzahl an identifizierten DEG's für jeden der vier untersuchten *Bacillus*-Stämme.

Tabelle 17: Übersicht über die Anzahl differentiell exprimierter Gene in *B. anthracis* und *Bcbva*

Art	Stamm	Gesamtanzahl CDS	DEG's (O ₂ → CO ₂)		^davon	
			Total	- 4 ≥ FC ≥ + 4 [▲]	↑	↓
<i>B. anthracis</i>	Vollum	5305	1848 (~35 %*)	262 (~14 %**)	121	141
	Dobichau	5303	3085 (~58 %*)	310 (~10 %**)	144	166
<i>Bcbva</i>	CI	5268	2637 (~50 %*)	354 (~13 %**)	198	156
	CA	5434	3592 (~66 %*)	889 (~25 %**)	446	443

CDS = coding sequences; DEG = differentiell exprimierte Gene; FC = Fold Change

* Prozentangaben in Klammern stellen den Prozentsatz der Gesamtanzahl an DEG's relativ zur Gesamtanzahl an CDS dar.

** Prozentangaben in Klammern stellen den Prozentsatz der DEG's mit einem FC $\geq + 4$ bzw. $\leq - 4$ relativ zur Gesamtanzahl an DEG's dar.

Es zeigte sich, dass im Stamm *B. anthracis* Vollum von insgesamt 5.305 kodierenden Sequenzen 1.848 Gene differentiell exprimiert waren. Hierbei handelte es sich im Vergleich zu den anderen Stämmen um den geringsten Gesamtanteil an ermittelten DEG's (~35 %). Davon wiesen 262 Gene einen FC $\geq + 4$ bzw. $\leq - 4$ auf. Daraus waren 121 Gene hochreguliert und 141 herunterreguliert. Bei *B. anthracis* Dobichau wurden 3.085 differentiell exprimierte Gene

von insgesamt 5.303 kodierenden Sequenzen detektiert. Davon fielen 310 Gene unter den FC-Cutoff, das wiederum im Verhältnis zur Gesamtanzahl an DEG's und im Vergleich zu den anderen Stämmen den geringsten Anteil an Genen mit einer 4-fachen Expressionsänderung darstellte (~10 %). Von diesen 310 Genen wurden 144 hoch- und 166 herunterreguliert. Bei dem Stamm *Bcbva* CI konnten von 5.268 kodierenden Sequenzen insgesamt 2.637 DEG's ermittelt werden, 354 davon mit einem $FC \geq +4$ oder ≤ -4 . Diese Zahl teilte sich in 198 hochregulierte und 156 herunterregulierte Gene auf. Bei dem Stamm *Bcbva* CA konnte unter CO₂-Bedingung von insgesamt 5.434 kodierenden Sequenzen eine Anzahl von 3.592 differentiell exprimierten Genen identifiziert werden. Es handelte sich im Vergleich zu den anderen Stämmen um den größten Gesamtanteil an ermittelten DEG's (~66 %). Hier stach auch die größte Anzahl von 889 Genen mit dem FC-Cutoff $\geq +4$ bzw. ≤ -4 heraus (~25 %), wovon 446 hochreguliert und 443 herunterreguliert waren. In der Gesamtheit war die Hoch- bzw. Herunterregulation der differentiell exprimierten Gene unter CO₂-Bedingung in allen untersuchten Stämmen jeweils zu fast gleichen Anteilen festzustellen (s. auch Tabelle 18).

3.1.6.2 Verteilung der differentiell exprimierten Gene auf das Chromosom und die Plasmide

Eine genauere Analyse der Daten hinsichtlich der Anzahl an differentiell exprimierten Genen von verschiedenen genetischen Elementen (Chromosom und Plasmiden) ergab, dass die Plasmidgene sowohl in den beiden *B. anthracis*- als auch *Bcbva*-Stämmen in der CO₂-Wachstumsbedingung fast ausschließlich hoch- anstatt herunterreguliert wurden (s. Abbildung 19 und Tabelle 18). Dabei lag die Anzahl an pXO2-lokalisierten Genen bei fast allen Stämmen höher als die der pXO1-lokalisierten Gene.

Bei *B. anthracis* Vollum waren insgesamt 28 differentiell hochregulierte Gene (~23 %) auf den beiden Plasmiden lokalisiert, bei *B. anthracis* Dobichau lag der Anteil bei ~19 % (28 Plasmidgene). Wohingegen sich bei *Bcbva* CI die pXO1- und pXO2-lokalisierten DEG's anzahlmäßig die Waage hielten, stach bei *Bcbva* CA die große Menge an pXO2-hochregulierten Genen (34 pXO2 vs. 19 pXO1) heraus. Der Anteil an differentiell hochregulierten Plasmidgenen war bei den *Bcbva*-Stämmen gleich (~12 %).

Die Verteilung der differentiell herunterregulierten Gene beschränkte sich fast ausschließlich auf das Chromosom. Bei *B. anthracis* Vollum wurde kein einziges Plasmidgen detektiert, bei *B. anthracis* Dobichau wurde nur ein pXO2-Gen herunterreguliert. Zu einem pXO2-lokalisierten Gen bei *Bcbva* CI wurde zusätzlich ein weiteres, für ein hypothetisches Protein kodierendes Gen identifiziert, das auf dem nicht näher charakterisierten Plasmid pCI-14 vorliegt, welches nur bei diesem Stamm vorhanden ist. Auffällig war jedoch, dass im Gegensatz zu den anderen Stämmen, bei denen kein einziges pXO1-lokalisiertes Gen eine

signifikante Expressionsminderung aufwies, bei *Bcbva* CA immerhin sieben Gene dieses Plasmids differentiell herunterreguliert wurden.

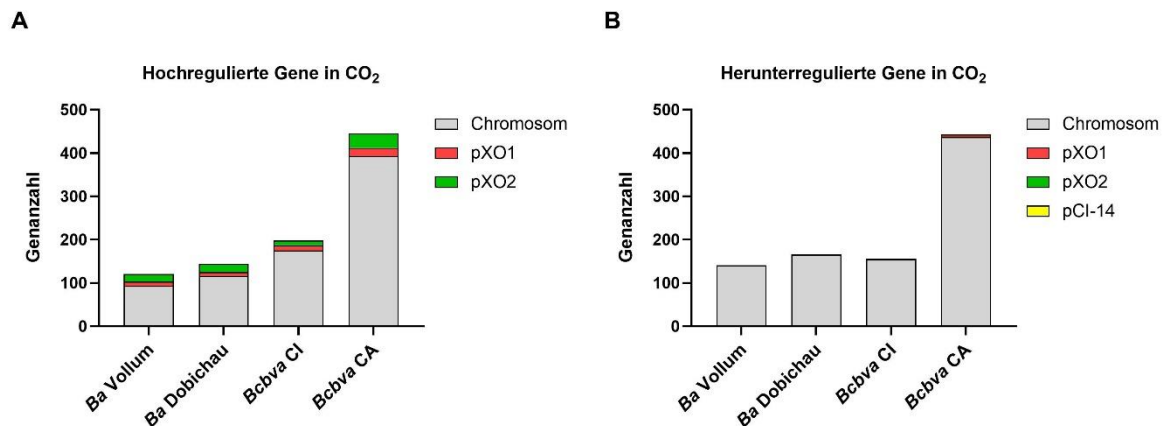


Abbildung 19: Darstellung der chromosomal- und plasmid-lokalisierten DEG's

Verteilung der differentiell exprimierten Gene auf das Chromosom bzw. die Plasmide für die hochregulierten Gene (A) und herunterregulierten Gene (B) unter CO₂-Bedingung in den untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen.

Tabelle 18: Übersicht über die Anzahl chromosomal- und plasmid-lokalisierter DEG's

Anzahl der differentiell exprimierten Gene des Chromosoms bzw. der Plasmide für die hoch- bzw. herunterregulierten Gene unter CO₂-Bedingung in den untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen.

Art	Stamm	hochregulierte DEG's (O ₂ → CO ₂) mit FC ≥ + 4				
		Total	Chromosom	pXO1	pXO2	pCI-14
<i>B. anthracis</i>	Vollum	121 (~46 %*)	93	10	18	n.v.
	Dobichau	144 (~46 %*)	116	9	19	n.v.
<i>Bcbva</i>	CI	198 (~56 %*)	175	12	11	0
	CA	446 (~50 %*)	393	19	34	n.v.
		herunterregulierte DEG's (O ₂ → CO ₂) mit FC ≤ - 4				
		Total	Chromosom	pXO1	pXO2	pCI-14
<i>B. anthracis</i>	Vollum	141 (~54 %*)	141	0	0	n.v.
	Dobichau	166 (~54 %*)	165	0	1	n.v.
<i>Bcbva</i>	CI	156 (~44 %*)	154	0	1	1
	CA	443 (~50 %*)	437	7	0	n.v.

FC = Fold Change; n.v. = Plasmid nicht vorhanden

* Prozentangaben in Klammern stellen den Prozentsatz der hoch- bzw. herunterregulierten DEG's mit einem FC ≥ + 4 bzw. ≤ - 4 relativ zur Gesamtanzahl an DEG's mit einem FC ≥ + 4 bzw. ≤ - 4 dar (s. Tabelle 17).

3.1.6.3 Stammspezifische und -übergreifende Verteilung der differentiell exprimierten Gene

Um einen detaillierteren Überblick über die Verteilung der differentiell regulierten Gene zwischen den einzelnen untersuchten Stämme zu erhalten, wurden die Daten der hoch- bzw. herunterregulierten Gene in Venn-Diagrammen dargestellt (s. Abbildung 20). Hierbei ist zu

erwähnen, dass in der Analyse ausschließlich homologe Gene zwischen *B. anthracis* und *Bcbva* mit einer Nukleotidübereinstimmung von mindestens 80 % einbezogen wurden.

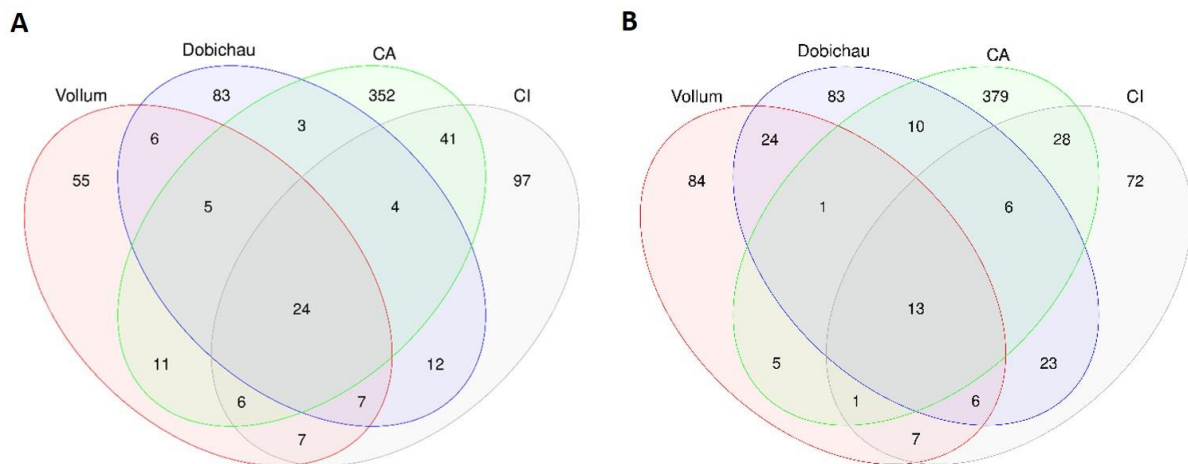


Abbildung 20: Venn-Diagramme der differentiellement regulierten Gene in *B. anthracis* und *Bcbva*
Darstellung der Überschneidungen der hochregulierten Gene (FC ≥ + 4) (A) bzw. herunterregulierten Gene (FC ≤ - 4) (B) zwischen den untersuchten *Bacillus*-Stämmen unter CO₂-Bedingung. Threshold der Sequenzidentität der *B. anthracis*- und *Bcbva*-Gene lag bei ≥ 80 %.

Besonders auffällig war der große Anteil an exklusiv hoch- bzw. herunterregulierten Genen, die ausschließlich im *Bcbva* CA vorkamen (grüner Kreis, oberste Zahl). Hierbei wurden 352 hochregulierte Gene (s. Abbildung 20 A) und 379 herunterregulierte Gene (s. Abbildung 20 B) identifiziert. Demgegenüber stand eine vergleichsweise niedrige Anzahl an Genen, mit nur 97 Hoch- und 72 Herunterregulierten, die ausschließlich im *Bcbva* CI differentiellement exprimiert wurden (grauer Kreis, oberste Zahl). Dieser gravierende Unterschied deutet darauf hin, dass die beiden *Bcbva*-Isolate unter wirtsähnlichen Bedingungen einer deutlich anderen Genregulation und -expression zu unterliegen scheinen. Die exklusiven DEG's der beiden *B. anthracis*-Stämme waren in Anbetracht der Genanzahl im Bereich vom *Bcbva* CI angesiedelt, mit 55 hochregulierten Genen für *B. anthracis* Vollum (s. Abbildung 20 A, roter Kreis) und 83 hochregulierten Genen für *B. anthracis* Dobichau (s. Abbildung 20 A, blauer Kreis). Bei den herunterregulierten Genen wurden 84 für *B. anthracis* Vollum (s. Abbildung 20 B, roter Kreis) und 83 für *B. anthracis* Dobichau (s. Abbildung 20 B, blauer Kreis) identifiziert. Zwischen den beiden *B. anthracis*-Vertretern zeigte sich im Gegensatz zu den *Bcbva*-Isolaten kein deutlicher Unterschied in der Anzahl an differentiellement exprimierten Genen. Beim Betrachten der Schnittmenge von *B. anthracis* Vollum und *B. anthracis* Dobichau (Überschneidung roter und blauer Kreis) mit der von *Bcbva* CI und *Bcbva* CA (Überschneidung grüner und grauer Kreis) fiel auf, dass unter CO₂-Bedingung mehr hochregulierte Gene spezifisch in den beiden *Bcbva*-Stämmen vorkamen. Hierbei standen sechs hochregulierte Gene der *B. anthracis*-Isolate 41 Genen der *Bcbva*-Stämme gegenüber (s. Abbildung 20 A). Bei den herunterregulierten Genen verhielt es sich zahlenmäßig fast identisch, mit 24 Genen

bei *B. anthracis* und 28 Genen bei *Bcbva* (s. Abbildung 20 B). Spezies-spezifisch wurden bei *B. anthracis* mehr Gene herunter- als hochreguliert (6 hochreguliert vs. 24 herunterreguliert), bei *Bcbva* war es entgegengesetzt der Fall (41 hochreguliert vs. 28 herunterreguliert). Die Schnittmenge für differentiell exprimierte Gene, die in allen vier Stämmen vorkamen (Überschneidung aller Kreise), belief sich auf 24 hochregulierte und 13 herunterregulierte Gene.

3.1.6.4 Analyse der hochregulierten Gene unter CO₂-Bedingung

Da die nähere Betrachtung der stammspezifischen Unterschiede den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten und um den Fokus auf spezies-spezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen *B. anthracis* und *Bcbva* zu legen, wurde die weitere Analyse der differentiell exprimierten Gene auf bestimmte Gensets beschränkt. Mit dem Ziel der Transkriptomanalyse, die globale Genexpression schwerpunktmäßig unter wirtsähnlichen Bedingungen bei *B. anthracis* und *Bcbva* zu beleuchten, wurden zunächst differentiell exprimierte Gene betrachtet, die unter CO₂-Bedingung hochreguliert wurden (s. Abbildung 20 A). Um Gemeinsamkeiten zwischen den beiden *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen zu identifizieren, wurde die Schnittmenge der DEG's ausgewählt, die in allen vier Stämmen hochreguliert wurden (24 Gene). Für die Analyse der Unterschiede wurde jeweils das Genset an DEG's ausgesucht, das die hochregulierten Gene beider Stämme pro Spezies beinhaltete (6 Gene bei *B. anthracis*, 41 Gene bei *Bcbva*). Zusammenfassend wurden folgende drei Genpools untersucht:

- I. Hochregulierte Gene in den *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen (24)
- II. Ausschließlich in den *B. anthracis*- Stämmen hochregulierte Gene (6)
- III. Ausschließlich in den *Bcbva*- Stämmen hochregulierte Gene (41)

Die Tabellen 19 - 21 geben eine Übersicht über die differentiell exprimierten Gene in den drei Gensets unter Angabe der dazugehörigen log₂FC-Werte für jeden der vier untersuchten *Bacillus*-Stämme.

Bei den differentiell exprimierten Genen des ersten Gensets überwog die Anzahl an plasmid-lokalisierten Genen die der chromosomal-lokalisierten Gene, wobei neun chromosomale Gene, sechs pXO1- und neun pXO2-lokalisierte Gene mit einem log₂FC $\geq + 2$ (= 4-fach) hochreguliert wurden (s. Tabelle 19). Zur Vereinfachung werden im Folgenden nur die Locus Tags von *B. anthracis* Vollum angegeben. Sowohl bei *B. anthracis* als auch bei *Bcbva* waren bekannte Virulenzgene um das mindestens 4-fache und mehr in der CO₂-Bedingung stärker exprimiert als in der O₂-Bedingung. Darunter fielen Gene des Kapseloperons *capBCADE* (DJ46_RS00275, DJ46_RS00280, DJ46_RS00285, DJ46_RS00290), die einen

Expressionsanstieg um das 7- bis 545-fache aufwies, und das für das Anthrax-Toxin Protektives Antigen (s. 1.3.4.2) kodierende *pagA*-Gen (DJ46_RS00770), das eine 6- bis 33-fache Steigerung aufzeigte. Bei Betrachtung der differentiell exprimierten Gene des pXO2-Plasmids in allen Stämmen konnte eine 12,5- bis fast 100-fache Expressionssteigerung des *pXO2-61/pXO2-60*-Operons (DJ46_RS00240 und DJ46_RS00245) festgestellt werden. Ersteres Gen stellt einen *atxA*-regulierten offenen Leserahmen dar, der dem *pXO2-60*-Gen vorgelagert ist, dessen Genprodukt spezifisch bei *Bcbva* sekretiert wird (s. 1.3.5.1). Die Vermutung, dass diese zwei Gene in einem Operon organisiert vorliegen, wurde über die Herstellung von cDNA mit anschließender konventioneller PCR bestätigt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich fand sich ein weiteres, rund 41- bis 194-fach hochreguliertes pXO2-Gen (*pagR*, DJ46_RS00270), bei dem es sich um ein Paralog des pXO1-kodierten Transkriptionsfaktors *pagR* handelt. Das pXO2-lokalisierte *pagR*-Gen wurde mit der Abschwächung der Virulenz im Pasteur II-Impfstamm in Verbindung gebracht [154]. Bei den pXO1-lokaliserten DEG's wurde neben *pagA* das *bsIA*-Gen (DJ46_RS00925), das für ein S-Layer Protein kodiert, mit einer knapp 26- bis rund 120-fachen Expressionssteigerung unter CO₂-Bedingung identifiziert. BslA stellt einen Virulenzfaktor dar, da das Protein die Adhäsion an Wirtszellen vermittelt und das Bakterium befähigt, die Blut-Hirn-Schranke des Wirts zu überwinden [155-157].

Weiterhin wurde ein Operon aus drei Genen (DJ46_RS00855, DJ46_RS00860 und DJ46_RS00865) hochreguliert, die für hypothetische Proteine kodieren. Um hier mehr Informationen hinsichtlich potentieller Proteinfunktionen zu erlangen, wurden die Proteinsequenzen entsprechender Gene mit den Vorhersagertools von InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) [158] des EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute) oder über das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) von UniProt (<https://www.uniprot.org/blast/>) analysiert. Falls Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden diese in den Tabellen entsprechend gekennzeichnet.

Unter den differentiell exprimierten chromosomalen Genen fanden sich sowohl das mit einer 18- bis rund 42-fach erhöhten CO₂-Expression für die L-Lysin 2,3-Aminomutase kodierende Gen *kamA* (DJ46_RS06775), als auch drei Gene (DJ46_RS03620, DJ46_RS21135, DJ46_RS21140), die für Natrium-Kalium-Antiporter kodieren. Diese Transmembranproteine katalysieren unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) den aktiven Transport von Natriumionen aus der Zelle und Kaliumionen in die Zelle. Dieser Vorgang spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Sporenceimung, da sich ein Anstieg des internen pH-Werts der keimenden Sporen und die Freisetzung von Na⁺- und K⁺-Ionen als frühe Ereignisse gezeigt haben, die der Freisetzung von Dippicolinsäure (DPA) vorausgehen. Das in der vorliegenden Transkriptomanalyse 12- bis 56-fach erhöht exprimierte Gen *gerN* (DJ46_RS03620) erwies sich als wichtig für die Keimung von *B. cereus*-Sporen als Reaktion auf Inosin [159]. Zu den weiteren, bei allen untersuchten Stämmen hochregulierten Genen des

Chromosoms gehörten u.a. das Transkript für ein Lipoprotein (DJ46_RS28530) und das Gen einer *Small Multidrug Resistance* (SMR) – Effluxpumpe (DJ46_RS27850).

Da weitere bekannte Virulenzgene bzw. Gene, die bekanntermaßen unter wirtsähnlichen Bedingungen hochreguliert werden, nicht in der aufgeführten Liste vorkamen, wurden ihre Expressionswerte gesondert in den Daten gesucht, um ihr Expressionsverhalten zu überprüfen. Das Toxingen *lef*, das für den Letalfaktor kodiert, war bei den beiden *B. anthracis*-Stämmen unter CO₂-Bedingung ebenfalls stark exprimiert, lag jedoch mit log₂FC-Werten von 1,14 (*B. anthracis* Vollum) und 1,99 (*B. anthracis* Dobichau), wenn auch knapp, unter dem Cutoff von ≥ 2 . Bei den *Bcbva*-Stämmen konnte kaum ein Expressionsunterschied zu der O₂-Bedingung ermittelt werden. Das Gen für den Ödemfaktor, *cya*, zeigte bei keinem Stamm eine Hochregulation unter wirtsähnlichen Bedingungen, und im *Bcbva* CA war das Gen sogar herunterreguliert (log₂FC = -1,29). Eine Expressionserhöhung des *atxA*-Gens in der CO₂-Bedingung war nur bei *B. anthracis* Dobichau um das 2,6-fache (log₂FC = 1,39) beobachtet worden. Die Expressionssteigerungen für die Regulatorgene *acpA* und *acpB* (s. 1.3.5.1) unter CO₂-Bedingung beliefen sich auf das 6,5- bis 39-fache in jeweils drei der vier untersuchten Stämme. Der *acpA*-Wert bei *B. anthracis* Dobichau und der *acpB*-Wert bei *Bcbva* CI lag unter dem DEG-Cutoff, weshalb die Gene nicht in den analysierten Gensets wiederzufinden waren. Die Expression des *hasA*-Gens, das zum *hasACB*-Operon gehört, welches die Hyaluronsäure-Kapsel kodiert (s. 1.4.4), war ausschließlich im *Bcbva* CA um das knapp 8-fache (log₂FC = 2,95) erhöht. Das für das S-Layer Protein EA1 kodierende Gen *eag* war nur in den beiden *Bcbva*-Stämmen unter CO₂ hochreguliert, wobei es sich bei *Bcbva* CA um eine 3,3-fache Steigerung und bei *Bcbva* CI um eine 16-fache Steigerung handelte. Für das S-Layer Protein Sap kodierende Gen *sap* konnte weder bei den untersuchten *B. anthracis*- noch bei den *Bcbva*-Stämmen eine Hochregulation in der CO₂-Bedingung festgestellt werden.

Als Kontrolle wurde zusätzlich die Expression des Haushaltsgens *rpoB* überprüft. Bei keinem der untersuchten Stämme wurde eine Änderung der Expression zwischen den Wachstumsbedingungen festgestellt, wie bereits in der qRT-PCR zur Überprüfung des Untersuchungszeitpunktes (s. 3.1.4) beobachtet werden konnte.

Tabelle 19: Differentiell exprimierte Gene mit einem $\log_2FC \geq +2$ (≥ 4 -fache Steigerung) in CO_2 relativ zu O_2 in allen vier *Bacillus*-Stämmen

Locus Tag (<i>Ba Vollum</i>)	Locus Tag (<i>Bcbva CI</i>)	Genname	Proteinname (<i>Ba Vollum</i>)	\log_2FC ($O_2 \rightarrow CO_2$)			
				<i>Ba Vollum</i>	<i>Ba Dobichau</i>	<i>Bcbva CA</i>	<i>Bcbva CI</i>
DJ46_RS00240	BACI_pCIXO200720	<i>pXO2-61</i>	hypothetical protein	3,65	6,63	4,46	5,01
DJ46_RS00245	BACI_pCIXO200710	<i>pXO2-60</i>	hypothetical protein	3,73	6,06	4,35	4,81
DJ46_RS00250	BACI_pCIXO200700	<i>lepB</i>	signal peptidase I	2,40	3,06	5,14	2,07
DJ46_RS00270	BACI_pCIXO200670	<i>pagR</i>	helix-turn-helix transcriptional regulator	7,60	6,65	6,15	5,35
DJ46_RS00275	BACI_pCIXO200640	<i>capB</i>	capsule biosynthesis protein CapB	8,62	9,09	7,14	4,32
DJ46_RS00280	BACI_pCIXO200630	<i>capC</i>	capsular polyglutamate amide ligase/translocase	8,81	9,09	7,78	3,81
DJ46_RS00285	BACI_pCIXO200620	<i>capA</i>	capsular polyglutamate synthetase	8,30	8,79	7,63	3,65
DJ46_RS00290	BACI_pCIXO200610	<i>capD</i>	capsule biosynthesis gamma-glutamyltransferase	7,56	7,82	6,71	2,76
DJ46_RS00295	BACI_pCIXO200590		YxeA family protein	5,26	6,93	6,42	2,56
DJ46_RS00770	BACI_pCIXO101530	<i>pagA</i>	anthrax toxin protective antigen	3,64	5,06	2,55	3,23
DJ46_RS00855	BACI_pCIXO101240		hypothetical protein (Nucleotide sugar dehydrogenase subfamily**)	4,70	4,87	4,65	4,99
DJ46_RS00860	BACI_pCIXO101230		hypothetical protein	5,51	6,36	5,43	5,17
DJ46_RS00865	BACI_pCIXO101220		hypothetical protein	4,79	5,60	5,59	5,07
DJ46_RS00920	BACI_pCIXO101100		phosphatase PAP2 family protein	3,38	3,77	3,86	2,54
DJ46_RS00925	BACI_pCIXO101090	<i>bslA</i>	S-layer homology domain-containing protein	5,22	6,54	6,90	4,70
DJ46_RS03620	BACI_c16590	<i>gerN</i>	cation:proton antiporter	3,58	4,33	5,82	5,45
DJ46_RS06775	BACI_c22610	<i>kamA</i>	lysine 2,3-aminomutase	5,38	4,18	5,33	5,29
DJ46_RS06780	BACI_c22620		YokU family protein	5,54	4,05	5,00	5,32
DJ46_RS09360	BACI_c28050		YxcD family protein	2,97	3,82	4,52	3,65
DJ46_RS09365	BACI_c28060		hypothetical protein (Membranprotein*)	2,39	3,39	4,84	3,88
DJ46_RS21135	BACI_c50570		cation:proton antiporter	2,66	4,31	4,70	3,07
DJ46_RS21140	BACI_c50580		cation:proton antiporter regulatory subunit	3,10	5,30	4,02	3,61
DJ46_RS27850	BACI_c08690		multidrug efflux SMR transporter	4,32	7,66	5,41	3,93
DJ46_RS28530	BACI_c10180		lipoprotein	2,47	3,00	2,78	3,10

\log_2FC = Logarithmus des Fold Change zur Basis 2

* nach eigener Analyse mit den InterPro-Tools von EMBL-EBI

** nach eigener Analyse mit BLAST von UniProt

In Tabelle 20 sind die sechs ausschließlich in den beiden *B. anthracis*- Stämmen hochregulierten Gene aufgelistet. Hierbei handelte es sich um ein pXO1-lokalisiertes Gen, zwei pXO2-lokalisierte und zwei chromosomale Gene. Die beiden Transkripte des pXO2-Plasmids scheinen in einem Operon organisiert vorzuliegen, wobei sie für eine membrangebundene Metalloprotease (DJ46_RS00195) bzw. ein Membranprotein (DJ46_RS00200) kodieren. Bei *B. anthracis* Dobichau zeigten die Gene eine etwas stärkere Expressionssteigerung, um das 70- bzw. 46-fache, als bei *B. anthracis* Vollum, bei dem es sich auf einen 13-fachen Anstieg belief. Das auf Kohlenstoffmangel reagierende Gen *cstA1* (DJ46_RS04485) wies bei *B. anthracis* eine 4,5- bis 17-fache Hochregulation unter CO₂-Bedingung auf. Das *ykrK*-Gen, das in *B. subtilis* für den neuartigen Transkriptionsregulator YkrK kodiert [160, 161], war in den *B. anthracis*-Stämmen um das 4-fache hochreguliert. *CstA1* und *ykrK* waren in den zwei *Bcbva*-Stämmen im Gegensatz zur O₂-Bedingung ebenfalls stärker exprimiert, zählten allerdings in der vorliegenden Analyse aufgrund des log2FC-Cutoffs von ≥ 2 nicht zu den differentiell exprimierten Genen.

Im Gegensatz zu den sechs ausschließlich in den *B. anthracis*- Stämmen hochregulierten Genen, wurden in den beiden *Bcbva*-Stämmen zusammen insgesamt 41 Gene um das mindestens 4-fache in der CO₂-Bedingung stärker exprimiert (s. Tabelle 21). Hierbei handelte es sich um 39 chromosomale, ein pXO1- und ein pXO2-lokalisiertes Gen. Auffällig war, dass viele Gene hochreguliert wurden, die für einen ABC-Transporter kodieren. ABC-Transporter bilden eine große Familie von Membranproteinen, die die ATP-Hydrolyse mit dem aktiven Import oder Export spezifischer Substrate über die Zellmembran verknüpfen. Hierzu zählten Gene des *opp*-Operons (BACI_c02340, BACI_c06660, BACI_c06690, BACI_c06700, BACI_c09470), die um das 5- bis 11,5-fache hochreguliert wurden. Weiterhin wurde ein Operon aus acht Genen (BACI_c14620 - BACI_c14690) um das rund 6- bis 419-fache in den beiden *Bcbva*-Stämmen stärker exprimiert, deren Genprodukte an dem Schwefelstoffwechsel beteiligt sind. Dabei wird anorganisches Sulfat zu Sulfid reduziert, wobei eine O-Acetyl-L-Serin (OAS) (Thiol)-Lyase das Sulfid einbaut und die Aminosäure Cystein bildet. Die Gene des *ssu*-Operons, die einen 22- bis 307-fachen Expressionsanstieg aufwiesen, spielen in diesem Prozess ebenfalls eine Rolle. Das *hlyII*-Gen, das einen 7,5- bis 11-fachen Anstieg in CO₂ aufzeigte, kodiert für den in *B. cereus* bekannten Virulenzfaktor Hämolysin II, der den Makrophagen-Zelltod durch Apoptose aufgrund seiner porenbildenden Aktivität provoziert [162]. Für die beiden plasmid-lokalisierten Gene (BACI_pCIXO101070 und BACI_pCIXO200650), die ausschließlich in den *Bcbva*-Isolaten differentiell hochreguliert wurden, konnten bisher keine näheren Informationen hinsichtlich bekannter Proteindomänen oder potentieller Proteinfunktionen in den Datenbanken gefunden werden.

Tabelle 20: Differentiell exprimierte Gene mit einem log₂FC ≥ 2 (≥ 4-fache Steigerung) in CO₂ relativ zu O₂ in den zwei *B. anthracis*-Stämmen

Locus Tag (<i>Ba</i> Vollum)	Locus Tag (<i>Bcbva</i> CI)	Genname	Proteinname (<i>Ba</i> Vollum)	log ₂ FC (O ₂ → CO ₂)			
				<i>Ba</i> Vollum	<i>Ba</i> Dobichau	<i>Bcbva</i> CA	<i>Bcbva</i> CI
DJ46_RS00195	BACI_pCIXO200870		CPBP family intramembrane metalloprotease	3,73	6,13	-0,13	-0,06
DJ46_RS00200	BACI_pCIXO200860		hypothetical protein (Membranprotein*)	3,75	5,51	0,87	0,89
DJ46_RS00870'	BACI_pCIXO101210		hypothetical protein	2,52	3,16	0,60	1,63
DJ46_RS04485	BACI_c18140	<i>cstA1</i>	carbon starvation protein A	4,10	2,17	1,41	1,66
DJ46_RS09370	BACI_c28070	<i>ykrK</i>	DUF1836 domain-containing protein	2,03	2,19	1,22	1,32
DJ46_RS20600	n.d.		PQQ-binding-like beta-propeller repeat protein	2,44	2,53	n.d.	n.d.

n.d. = nicht detektiert; log₂FC = Logarithmus des Fold Change zur Basis 2

' in neuer Annotierung nicht mehr vorhanden

* nach eigener Analyse mit den InterPro-Tools von EMBL-EBI

Tabelle 21: Differentiell exprimierte Gene mit einem log₂FC ≥ 2 (≥ 4-fache Steigerung) in CO₂ relativ zu O₂ in den zwei *Bcbva*-Stämmen

Locus Tag (<i>Ba</i> Vollum)	Locus Tag (<i>Bcbva</i> CI)	Genname	Proteinname (<i>Bcbva</i> CI)	log ₂ FC (O ₂ → CO ₂)			
				<i>Ba</i> Vollum	<i>Ba</i> Dobichau	<i>Bcbva</i> CA	<i>Bcbva</i> CI
DJ46_RS24375	BACI_c02340	<i>oppA3</i>	peptide ABC transporter substrate-binding protein	0,12	0,47	2,91	3,42
DJ46_RS25470	BACI_c04430		TetR family transcriptional regulator	0,99	0,86	2,78	3,88
DJ46_RS25610	BACI_c04730		BH0509 family protein	0,94	-0,53	3,27	2,09
DJ46_RS26830	BACI_c06600		dihydrofolate reductase	0,54	1,08	2,13	2,09
DJ46_RS26865	BACI_c06660	<i>oppA5</i>	oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein	0,00 ^a	0,00 ^a	2,94	3,31
DJ46_RS26880	BACI_c06690	<i>oppF3</i>	ABC transporter ATP-binding protein	-1,30	0,03	2,38	2,62
DJ46_RS26885	BACI_c06700	<i>oppD3</i>	ABC transporter ATP-binding protein	-1,50	1,64	3,78	3,23
DJ46_RS27745	BACI_c08480		DUF1232 domain-containing protein	0,29	1,58	3,12	3,72
DJ46_RS28200	BACI_c09470	<i>oppA7</i>	ABC transporter substrate-binding protein	-1,33	0,62	2,62	3,53
DJ46_RS28515	BACI_c10150		helix-turn-helix transcriptional regulator	0,73	1,10	2,88	2,77
DJ46_RS02665	BACI_c14620	<i>cysH</i>	phosphoadenylyl-sulfate reductase	0,00 ^b	0,00 ^b	2,48	5,02
DJ46_RS02670	BACI_c14630	<i>sat</i>	sulfate adenylyltransferase	-0,25	0,49	3,82	6,45
DJ46_RS02675	BACI_c14640	<i>cysC</i>	adenylyl-sulfate kinase	0,00 ^b	0,00 ^b	3,41	7,59
DJ46_RS02680	BACI_c14650	<i>nirA</i>	ferredoxin-nitrite reductase	-0,24	0,02	3,52	8,39
DJ46_RS02685	BACI_c14660		DUF3906 family protein	0,00 ^b	0,23	3,06	8,71

DJ46_RS02690	BACI_c14670	<i>cysG1</i>	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	0,00 ^b	2,51	3,16	3,31
DJ46_RS02695	BACI_c14680		sirohdrochlorin chelatase	-0,23	0,98	4,22	7,04
DJ46_RS02700	BACI_c14690	<i>cysG2</i>	NAD(P)-binding protein	0,07	1,37	3,42	6,03
DJ46_RS04005	BACI_c17230		alanyl-tRNA editing protein	0,43	0,71	2,14	2,65
Pseudogen	BACI_c18050	<i>yndG</i>	DoxX-like family protein	0,00 ^b	0,00 ^b	2,22	2,68
DJ46_RS05545	BACI_c20050		short-chain dehydrogenase	-1,02	0,40	3,27	2,79
DJ46_RS05635	BACI_c20230		CBS domain-containing protein	-0,31	1,09	3,28	3,54
DJ46_RS06345	BACI_c21680		response regulator transcription factor	0,15	-0,07	2,35	2,11
Pseudogen	BACI_c24970	<i>hlyII</i>	beta-channel forming cytolysin	0,00 ^b	0,00 ^b	2,90	3,51
DJ46_RS08220	BACI_c25820		ABC transporter ATP-binding protein	0,26	0,42	4,60	4,37
DJ46_RS08460	BACI_c26300		DegV family protein	1,58	1,24	2,14	2,02
DJ46_RS09305	BACI_c27930		carboxymuconolactone decarboxylase family protein	-0,52	0,04	2,61	2,04
DJ46_RS09715	BACI_c28760	<i>ssuC</i>	ABC transporter permease	0,00 ^b	0,79	4,49	7,47
DJ46_RS09720	BACI_c28770	<i>ssuA</i>	aliphatic sulfonate ABC transporter substrate-binding protein	0,00 ^b	1,61	6,07	8,26
DJ46_RS09725	BACI_c28780	<i>ssuB</i>	ABC transporter ATP-binding protein	0,00 ^b	0,00 ^b	6,32	5,93
DJ46_RS12395	BACI_c34020		hypothetical protein (Membranprotein*)	0,90	1,88	2,61	2,59
DJ46_RS13045	BACI_c35270		peptide ABC transporter substrate-binding protein	-0,38	0,99	2,23	2,88
DJ46_RS13050	BACI_c35310		peptide ABC transporter substrate-binding protein	-1,18	1,81	3,27	3,81
DJ46_RS13275	BACI_c35780	<i>alkK</i>	long-chain fatty acid-CoA ligase	1,04	1,67	2,07	2,02
DJ46_RS17165	BACI_c42350	<i>rpmG1</i>	50S ribosomal protein L33	-1,06	0,26	4,46	2,31
DJ46_RS20200	BACI_c48710	<i>glgD</i>	glucose-1-phosphate adenylyltransferase subunit GlgD	-1,32	0,19	4,43	2,23
DJ46_RS22120	BACI_c52510		DUF3278 domain-containing protein	-0,52	1,51	2,46	2,28
DJ46_RS22795	BACI_c53840		D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	1,38	1,83	4,87	3,47
DJ46_RS23300	BACI_c54930	<i>mpA</i>	ribonuclease P protein component	0,10	-0,01	3,64	2,09
Pseudogen	BACI_pCIXO101070		conserved domain protein	0,00 ^b	0,00 ^b	2,64	2,80
n. ann.	BACI_pCIXO200650		conserved hypothetical protein	0,00 ^b	0,00 ^b	8,07	6,07

n. ann. = nicht annotiert; log2FC = Logarithmus des Fold Change zur Basis 2

^a Sequenzidentität < 80 %

^b Gen gar nicht bzw. sehr gering exprimiert

* nach eigener Analyse mit den InterPro-Tools von EMBL-EBI

3.1.6.5 Analyse der herunterregulierten Gene unter CO₂-Bedingung

Nach der Analyse der differentiell hochregulierten Gene erfolgte die Begutachtung der differentiell exprimierten Gene, die in CO₂ herunterreguliert wurden (s. Abbildung 20 B). Dabei lag der Fokus auf den gleichen drei Gensets wie im Kapitel zuvor, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen zu identifizieren. Folgende drei Genpools werden im weiteren Verlauf näher betrachtet:

- I. Herunterregulierte Gene in den *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen (13)
- II. Ausschließlich in den *B. anthracis*- Stämmen herunterregulierte Gene (24)
- III. Ausschließlich in den *Bcbva*- Stämmen herunterregulierte Gene (28)

Eine Auflistung der differentiell herunterregulierten Gene in den drei Gensets mit Angabe der dazugehörigen log₂FC-Werte für jeden der vier untersuchten *Bacillus*-Stämme ist in den Tabellen 38 – 40 im Anhang zu finden.

Bei den mindestens 4-fach herunterregulierten Genen in der CO₂-Bedingung handelte es sich bei allen drei Genpools ausschließlich um chromosomale Gene. In der Liste der 13 Gene, die sowohl in den *B. anthracis*- als auch *Bcbva*-Stämmen differentiell exprimiert waren, stach ein Operon aus sechs Genen (DJ46_RS12945 - DJ46_RS12975) heraus, die um das 4- bis 59-fache herunterreguliert waren. Deren Genprodukte sind an der Molybdopterin-Biosynthese beteiligt. Außerdem zeigten die Gene *alsS* und *alsD* bei Wachstum in CO₂ einen 4,7- bis knapp 87-fachen Expressionsabfall. Diese beiden Gene kodieren für die α -Acetolactat Synthase AlsS (*alsS*) und die α -Acetolactat Decarboxylase (*alsD*). Die Acetolactat Synthase ist ein Enzym, das bei Prokaryoten den ersten Schritt in der Synthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren (branched chain amino acids, BCAA) Valin, Leucin und Isoleucin katalysiert. Es ist bekannt, dass AtxA die Expression von Genen, die an der Synthese verzweigt-kettiger Aminosäuren beteiligt sind, negativ beeinflusst [104]. Um dieses Expressionsverhalten zu überprüfen, wurden in den vorliegenden Transkriptomdaten nach den Genen *ilvB*, *ilvN*, *ilvC*, *ilvD* und *ilvE* gesucht, deren Genprodukte für die Synthese aller drei BCAA's zuständig sind. Weiterhin wurden die für die Synthese von Leucin verantwortlichen Gene *leuA*, *leuC*, *leuD* und *leuB* überprüft sowie das speziell an der Isoleucin-Biosynthese beteiligte Gen *ilvA* [163]. Hier zeigte sich, dass die Gene in den beiden *B. anthracis*-Stämmen unter CO₂-Bedingung und somit Einfluss von AtxA herunterreguliert wurden, einige sogar signifikant mit einem log₂FC < - 2. Interessanterweise konnte für den Stamm *Bcbva* CA eine gegenteilige Expression der Gene beobachtet werden. Alle Gene wiesen eine starke Hochregulation in CO₂ auf, was in einigen Fällen sogar einem 4-fachen Expressionsanstieg und mehr entsprach. Für den *Bcbva* CI war das Expressionsmuster der BCAA-Gene nicht so eindeutig ausgeprägt wie bei den anderen

untersuchten Stämmen, allerdings war auch hier eher eine Tendenz in Richtung Expressionssteigerung unter CO₂-Bedingung festzustellen.

Bei den 24 ausschließlich in den beiden *B. anthracis*-Stämmen herunterregulierten Genen handelte es sich um einige für ABC-Transporter kodierende Gene sowie um Transkripte, deren Genprodukte an verschiedenen Stoffwechselfvorgängen beteiligt sind.

Unter den ausschließlich in *Bcbva* CI und CA herunterregulierten Genen fanden sich die zwei Gene *fliR* und *flhB* (BACI_c17180 und BACI_c17190), die eine fast 5- bis 18-fache Expressionsminderung aufwiesen. *FliR* und *FlhB* kodieren für die Proteine FliR und FlhB, die Teile des flagellaren Typ III-Sekretionssystems darstellen. Bei der Suche nach weiteren Genen, die bei der Bildung des Flagellums eine Rolle spielen, konnte festgestellt werden, dass die allermeisten dieser Gene unter CO₂-Bedingung sowohl in den *B. anthracis*- als auch *Bcbva*-Stämmen herunterreguliert wurden, wobei die log₂FC-Werte die für diese Arbeit gesetzte Signifikanzgrenze nicht erreichten ($-0,1 < \log_2FC < -2$). Eine Tendenz in Richtung Expressionssteigerung unter O₂-Bedingung bzw. Expressionsabfall unter CO₂-Bedingung war dennoch deutlich erkennbar. Zusätzlich zeigte ein Gen (BACI_c38830) eine 4- bis 8-fach verminderte Expression, das für ein *patatin-like phospholipase family protein* kodiert. Es wird vermutet, dass Patatin-like Phospholipasen eine Phospholipase- und Lipase-Aktivität besitzen und einen wichtigen Virulenzfaktor vieler Pathogene, u.a. Mykobakterium, darstellen [164].

3.1.7 Verifizierung der RNA-Sequenzierungsdaten

Für die Validierung der RNA-Seq Daten wurde die Expression von fünf verschiedenen Genen mit Hilfe der qRT-PCR Methode analysiert. Dafür wurden vier chromosomal-lokalisierte Gene und ein pXO2-lokalisiertes Plasmidgen ausgewählt, die in den Stämmen unterschiedlich differentiell exprimiert wurden. Nachfolgender Tabelle ist die Genauswahl und deren Regulation unter CO₂-Bedingung in den entsprechenden Stämmen zu entnehmen.

Tabelle 22: Genauswahl für die qRT-PCR zur Verifizierung der RNA-Seq Daten

Locus Tag	Genprodukt	hochreguliert in CO ₂ bei
BACI_pCIXO200870	CAAX amino terminal protease family protein	<i>B. anthracis</i> -Stämmen
BACI_c23220	DNA-bindendes Protein	<i>Bcbva</i> CI
BACI_c14620	Adenosin-phosphosulfat-Reduktase	<i>Bcbva</i> -Stämmen
BACI_c18140	carbon starvation protein	<i>B. anthracis</i> -Stämmen
BACI_c28060	hypothetisches Protein	allen Stämmen

Das Primerdesign zur Durchführung der qRT-PCR mittels SYBR Green erfolgte mit dem Programm GenScript Real-Time PCR Primer and Probes Design Tool (s. 2.5.2.1). Die Oligonukleotide wurden so generiert, dass die resultierenden PCR-Produkte zwischen 100 – 200 bp lang waren. Bevor die Primer für die Analyse der Genexpression verwendet wurden,

wurde deren Spezifität und Amplifikationseffizienz untersucht. Zum Nachweis der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurden die Methoden der konventionellen PCR und Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt (s. 2.5.2.2 und 2.5.2.3). Anhand von genomischer DNA wurde überprüft, dass alle Primerkombinationen die korrekten PCR-Produkte bei der optimalen Annealingtemperatur amplifizierten (Daten nicht gezeigt). Um die Bildung von unspezifischen Primer-Dimeren zusätzlich auszuschließen, wurden mit genomischer DNA in einer SYBR Green qRT-PCR Schmelzkurven erstellt. Dabei werden in der PCR über einen Dissoziationsschritt die entstandenen PCR-Produkte gemäß ihrer Schmelztemperatur denaturiert, wodurch eine Änderung des Fluoreszenzsignales bei einer bestimmten Temperatur auftritt. Eine saubere Schmelzkurve mit einem einzelnen Gipfel weist auf das Schmelzen eines einzelnen spezifischen PCR-Produktes hin, was bei allen generierten Primerpaaren der Fall war. Anschließend wurden die Amplifikationseffizienzen der PCR-Läufe mit den unterschiedlichen Primerkombinationen bestimmt. Hierfür wurde genomische DNA aus den untersuchten Stämmen isoliert und schließlich für die Herstellung einer DNA-Standardreihe verwendet (s. 2.5.1), mit deren Hilfe die fünf Primerkombinationen in der qRT-PCR auf ihre Effizienz getestet wurden. Dabei wird über die Geräte-Software die Anzahl der Genomkopien (dekadisch verdünnte DNA) gegen den sog. Ct-Wert (*Threshold Cycle*) der Reaktion aufgetragen. Der Ct-Wert gibt den Schwellenwert an, bei dem zum ersten Mal ein Anstieg des Fluoreszenzsignals über die unspezifische Hintergrundstrahlung hinaus erfasst wird [165]. Je höher die DNA-Molekülanzahl im Ansatz zu Beginn der Real-Time PCR, desto niedriger der Ct-Wert. Ermittelt wird die Effizienz (E) über die Steigung (m) der Standardkurve:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Bei einer maximalen Reaktionseffizienz von 100 % ($E = 1$) sinkt der Ct-Wert um 3,3 bei Erhöhung der Kopienzahl eines Zielgens um eine Zehnerpotenz. Dabei bedeutet eine Amplifikationseffizienz von 100 % eine Verdopplung der DNA-Menge im Ansatz mit jedem Zyklus der PCR-Reaktion, d. h. ein exponentieller Anstieg des Fluoreszenzsignals [138].

Die von der ABI7500 System Software kalkulierten Effizienzen sowie die Oligonukleotidsequenzen sind im Anhang (s. Tabelle 33 und Tabelle 41) aufgelistet. Für die Vergleichbarkeit der PCR-Läufe sollte die maximale Varianz zwischen den Effizienzen 10 % nicht überschreiten, was für alle getesteten Primerpaare zutreffend war und sie daher für die Analysen verwendet werden konnten.

Es wurde pro Stamm und Bedingung von allen drei biologischen Replikaten komplementäre DNA mit Random Primern hergestellt (s. 2.5.3.3) und die anschließende qRT-PCR mit dem SYBR Green I Fluoreszenzfarbstoff (s. 2.5.2.4) in 2 technischen Replikaten durchgeführt. Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (s. 2.5.2.4). Die

Expressionsergebnisse der Zielgene wurden gegen das *rpoB*-Gen normiert, das als nicht-reguliertes Haushaltsgen als endogene Kontrolle diente. Die relative Expression der Zielgene in den CO₂-Ansätzen wurde auf ein Kalibrator-Probenmaterial bezogen, das in dieser Analyse der Expression des zu untersuchenden Gens unter O₂-Bedingung entsprach. Eine genauere Beschreibung der Methode der relativen Quantifizierung der Genexpression anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ist dem Kapitel 3.3.1.3 zu entnehmen.

Die normalisierten Transkriptmengen aus der RNA-Sequenzierung (Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten) wurden gegen die normalisierten qRT-PCR Daten (Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten und 2 technischen Replikaten) als log₂FC-Werte für jedes Zielgen und pro Stamm graphisch dargestellt (s. Abbildung 21). Der lineare Zusammenhang zwischen den Ergebnissen wurde abschließend für jeden der vier untersuchten Stämme über den Korrelationskoeffizienten nach Pearson bestimmt (s. Tabelle 23).

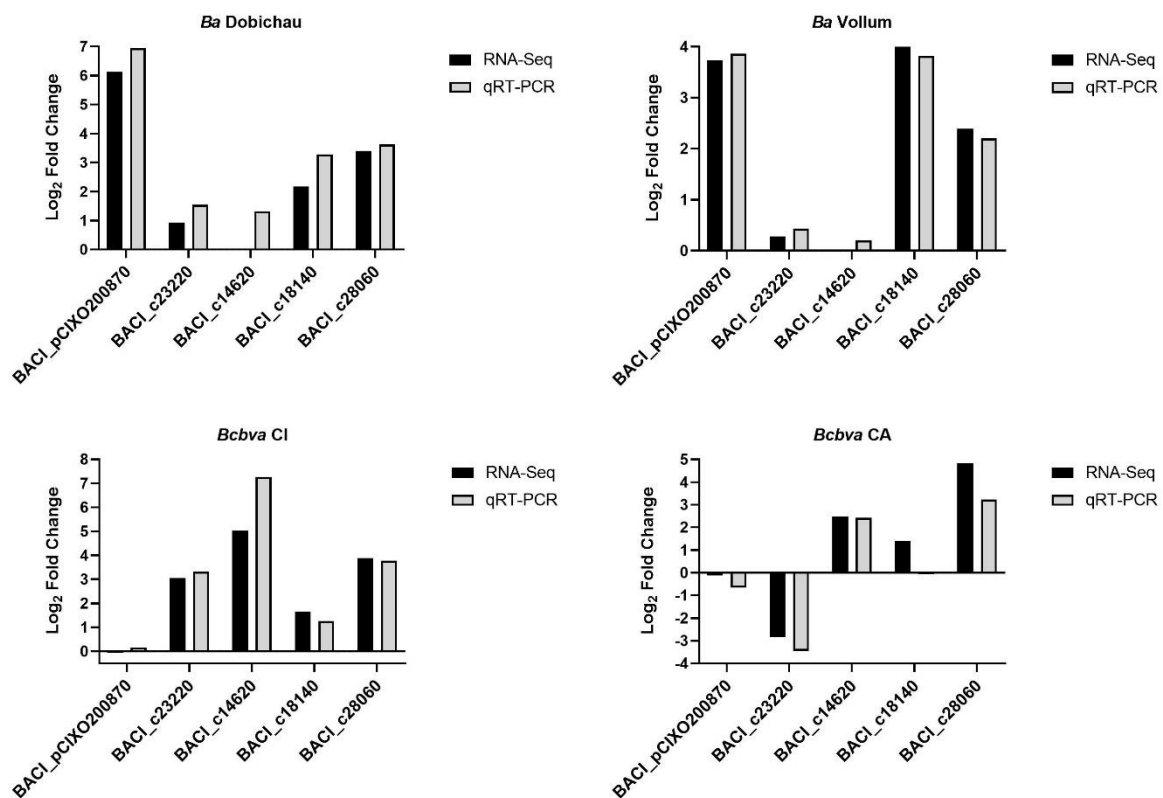


Abbildung 21: Vergleich der Expressionsdaten aus der qRT-PCR und RNA-Sequenzierung

Vergleichend dargestellt sind für jeden der vier untersuchten *Bacillus*-Stämme die Expressionswerte als log₂FC von fünf ausgewählten Zielgenen, ermittelt anhand der qRT-PCR bzw. RNA-Sequenzierungsmethode. Log₂FC = Logarithmus des Fold Change zur Basis 2.

Für jeden der vier Stämme lag der Korrelationseffizient nach Pearson, berechnet anhand der Expressionswerte der fünf Zielgene aus der RNA-Sequenzierung und qRT-PCR, größer als 0,95 ($p < 0,05$). Dementsprechend konnten die erhobenen RNA-Sequenzierungsdaten aus der Transkriptomanalyse durch eine weitere Methode zur Analyse der Genexpression mit hoher Korrelation verifiziert werden.

Tabelle 23: Korrelation der Genexpression aus der qRT-PCR und RNA-Sequenzierung

Bestimmung des Korrelationseffizienten nach Pearson mit Angabe des jeweiligen p-Wertes ($p < 0,05$) anhand der Expressionsdaten der fünf ausgewählten Zielgene aus der qRT-PCR und RNA-Sequenzierung für jeden untersuchten *Bacillus*-Stamm.

Stamm	Pearson's R	p-Wert
<i>Ba</i> Dobichau	0,98	0,002
<i>Ba</i> Vollum	1,00	0,000
<i>Bcbva</i> CI	0,95	0,012
<i>Bcbva</i> CA	0,98	0,004

3.2 Sekretomanalyse

Neben der Untersuchung des Transkriptoms stellte eine weitere allgemeine, vergleichende Analyse zwischen *Bcbva* und *B. anthracis* die Analyse des Proteoms dar. Dabei lag der Fokus auf den sekretierten Proteinen, die bei den *Bcbva*-Stämmen signifikant vermehrt auftraten. Das Ziel der Analysen war es, weitere *Bcbva*-spezifische Proteine zu identifizieren, die als potentielle Antigene fungieren könnten.

3.2.1 Wachstum in R-Minimalmedium und auf R-Minimalmedium Agar

Für die Analyse wurden die gleichen *B. anthracis*-Stämme, *B. anthracis* Vollum und *B. anthracis* Dobichau, wie für die RNA-Sequenzierung ausgewählt (s. 3.1.1). Im Falle der beiden *Bcbva*-Stämme fiel die Wahl für die Sekretomuntersuchungen auf die Deletionsmutanten *Bcbva* CI-H und *Bcbva* CA-H, da diese Stämmen aufgrund des deletierten *hasA*-Gens nicht mehr in der Lage sind, die Hyaluronsäure-Kapsel zu bilden (s. Tabelle 1). Der Verlust dieser Eigenschaft ermöglichte eine einfachere und sicherere Gewinnung von Kulturüberständen im S3-Labor. Die Bakterien pelletierten besser, sodass die Überstände leichter sterilfiltriert werden konnten, ohne die Filter zu verstopfen.

Für massenspektrometrische Untersuchungen ist die Anzucht der Bakterien in proteinfreien Medien am besten geeignet, da die Analysen nicht durch medieneigene Proteine gestört werden. Aufgrund dessen erfolgte die Kultivierung der vier *Bacillus*-Stämme in R-Minimalmedium (R-MM), ebenfalls unter wirtsähnlichen Bedingungen, bei 37 °C kombiniert mit 5 % CO₂. Das Medium enthielt bereits Natriumbikarbonat, sodass auf die Supplementierung mit diesem Zusatz verzichtet werden konnte. Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der Stämme über die Aufzeichnung von Wachstumskurven ermittelt (s. Abbildung 22). Zum Vergleich wurde ebenfalls das Wachstum der *Bcbva*-Wildtypstämme CI und CA in R-MM untersucht. Die gemessenen OD-Werte sind im Anhang (s. Tabelle 42) aufgeführt.

Bei allen Stämmen nahm mit fortschreitender Inkubationszeit die Zelldichte im Allgemeinen zu, im Vergleich zum Wachstum in BHI-Vollmedium (s. Abbildung 15) allerdings stark

verzögert. Nach 8 h befanden sich die Stämme noch immer in der exponentiellen Wachstumsphase, weshalb die OD₆₀₀ nach einer Wachstumsdauer von 24 h erneut gemessen wurde. Die *B. anthracis*-Stämme zeigten bis zum Messzeitpunkt von 5 h ein identisches Wachstumsverhalten, ab 6 h Kultivierungsdauer erreichte der *B. anthracis* Dobichau nicht mehr die Zelldichten des *B. anthracis* Vollum und blieb auch nach 24 h unter dessen Wert (s. Abbildung 22 B). Für den *Bcbva* CA konnte in R-MM in der exponentiellen Phase ein effizienteres Wachstum im Gegensatz zum *Bcbva* CI verzeichnet werden. Nach 24 h erreichten jedoch beide Stämme vergleichbare Zelldichten (s. Abbildung 22 C). Der Kurvenverlauf der beiden Deletionsmutanten war dem der *B. anthracis*-Stämme sehr ähnlich, im Vergleich zu den Wildtypstämmen jedoch deutlich abgeflacht. Allerdings waren im direkten Vergleich die gemessenen Zelldichten von *Bcbva* CI-H und CA-H zu jedem Zeitpunkt nahezu identisch (s. Abbildung 22 D). Beim Betrachten der Wachstumskurven aller Stämme fiel auf, dass nach 24 h Wachstumsdauer die Optischen Dichten aller Stämme annähernd gleich waren, nur für den *B. anthracis* Dobichau wurde ein vergleichsweise geringerer Wert aufgezeichnet (s. Abbildung 22 A).

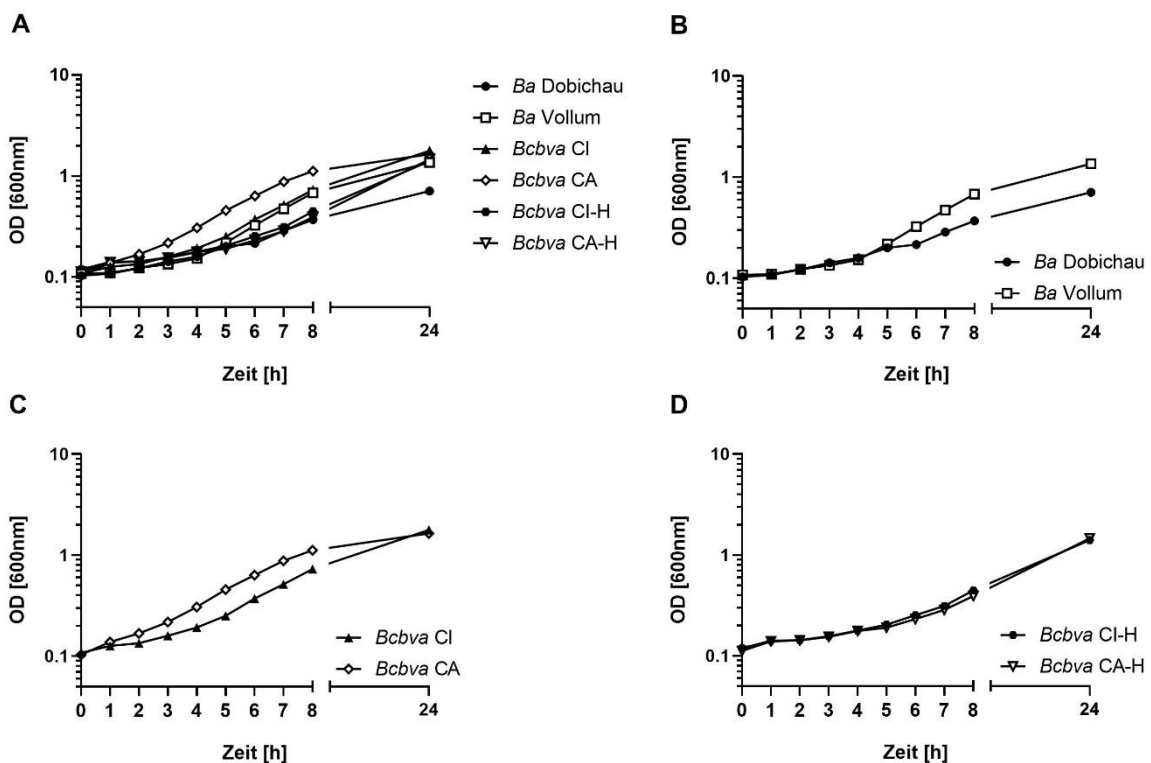


Abbildung 22: Wachstumskurven von *B. anthracis* und *Bcbva* in R-Minimalmedium

Dargestellt ist das Wachstum in R-MM bei 37 °C und 5 % CO₂ von allen sechs *Bacillus*-Stämmen (A), den *B. anthracis*-Stämmen (B), den *Bcbva*-Wildtypstämmen (C) und den *Bcbva*-Deletionsmutanten (D). OD = Optische Dichte.

Im Allgemeinen blieben erwartungsgemäß in R-MM die erreichten Zelldichten in der stationären Phase unter dem Niveau der gemessenen OD₆₀₀-Werte, die beim Wachstum in BHI-Medium aufgezeichnet wurden.

Die Ernte der Kulturüberstände für die Sekretomanalyse erfolgte von drei biologischen Replikaten nach 24 h Wachstum (s. 2.4.4), als die Stämme eine annähernd gleiche Zelldichte aufwiesen. Der abweichende Untersuchungszeitpunkt zu dem bei der RNA-Sequenzierung (Vergleich s. 3.1.2) wurde dabei als unerheblich betrachtet, da das primäre Ziel nicht darin bestand, einen direkten Zusammenhang zwischen Proteom- und Transkriptomdaten herzustellen.

Für die spätere Analyse des Sekretoms war es erforderlich, ebenfalls das Proteom der Zelle zu identifizieren, um im Vergleich signifikant sekretierte Proteine ermitteln zu können. Dafür wurden von dem R-Minimalmedium Agarplatten hergestellt und zunächst überprüft, ob die zu untersuchenden Stämme auf dem Festmedium wachsen können. Zum Vergleich wurden neben den *Bcbva*-Wildtypstämmen ebenfalls der kapselfreie Stamm *Bcbva* CAR-H, dem sowohl das pXO2-Plasmid als auch das *hasA*-Gen fehlt, untersucht. Die Bakterien wurden analog zum Flüssigmedium bei 37 °C kombiniert mit 5 % CO₂ bebrütet und die Koloniemorphologie nach 48 h Inkubationszeit beurteilt.

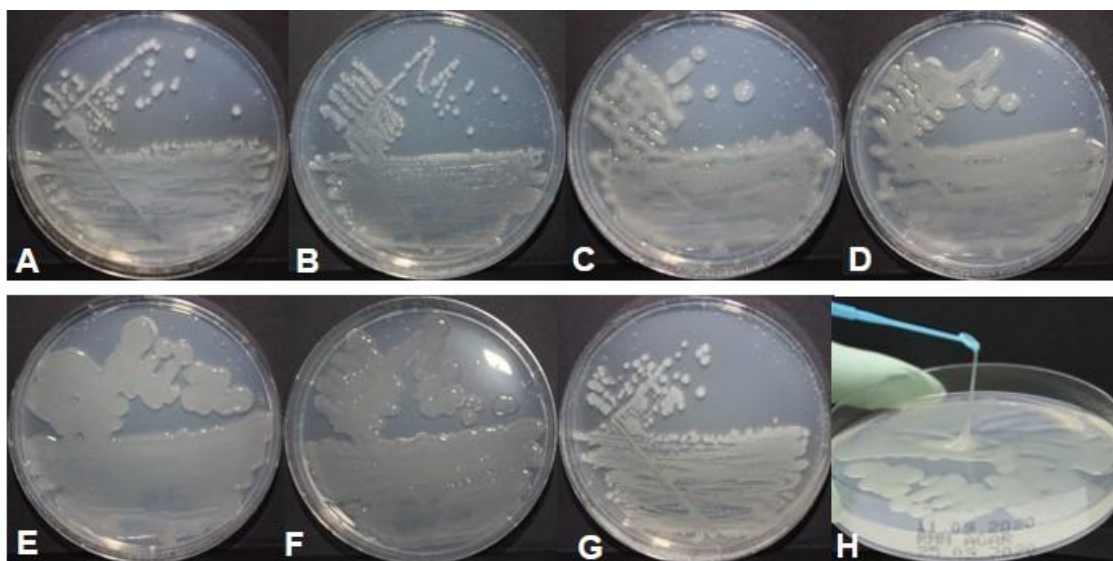


Abbildung 23: Wachstum von *B. anthracis* und *Bcbva* auf R-Minimalmedium Agar

Koloniemorphologie auf R-MM Agar nach 48 h Inkubationsdauer bei 37 °C und 5 % CO₂ von *B. anthracis* Vollum (A), *B. anthracis* Dobichau (B), *Bcbva* CI-H (C), *Bcbva* CA-H (D), *Bcbva* CI (E), *Bcbva* CA (F) und *Bcbva* CAR-H (G). Das schleimige Bakterienmaterial von *Bcbva* CI ließ sich zu langen Fäden ziehen (H).

Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, zeigten die Kolonien beider *Bcbva*-Primärisolate ein extrem schleimiges Aussehen (s. Abbildung 23 E und F), das deutlich stärker ausgeprägt war als bei *B. anthracis* (s. Abbildung 23 A und B). Das gallertige Bakterienmaterial von *Bcbva* CI ließ sich zu langen Fäden ziehen (s. Abbildung 23 H). Eine ähnlich schleimige

Koloniemorphologie konnte bei den *hasA*-deletierten Stämmen *Bcbva* CI-H und *Bcbva* CA-H beobachtet werden (s. Abbildung 23 C und D). Die Kolonien des plasmidfreien und dementsprechend kapsellosen Stammes *Bcbva* CAR-H waren rau und deutlich kleiner im Vergleich zu den anderen *Bcbva*-Isolaten, die Koloniegroße war mit der beider *B. anthracis*-Stämme vergleichbar (s. Abbildung 23 G).

Im Allgemeinen waren alle Stämme in der Lage, auf dem neuen, zuvor noch nie getesteten, R-MM Agar zu wachsen, wobei erwartungsgemäß eine Induktion der Kapselproduktion bei Wachstum unter CO₂-Bedingung in Anwesenheit von Natriumbikarbonat beobachtet werden konnte [97]. Das Festmedium war für die Kultivierung der Bakterien geeignet, sodass die Herstellung von Zellmaterial für die massenspektrometrische Analyse nach einer 24-stündigen Inkubationszeit von drei biologischen Replikaten erfolgte (s. 2.6.7.1).

3.2.2 Nachweis der Toxine in den Kulturüberständen

Bevor die Kulturüberstände für die massenspektrometrische Analyse des Sekretoms weiter aufgearbeitet wurden, sollte die Toxinproduktion der in R-Minimalmedium mit 5 % CO₂ angezogenen Bakterienstämme überprüft werden.

Die Proteine in den Überständen wurden zunächst elektrophoretisch aufgetrennt (s. 0). Bei anschließender Silberfärbung des SDS-Gels (s. 2.6.3) waren in den Präparationen viele Banden erkennbar, die Proteine unterschiedlicher Größe widerspiegeln, was auf einen hohen Anteil an Proteinen in den Kulturüberständen hinwies (s. Abbildung 24).

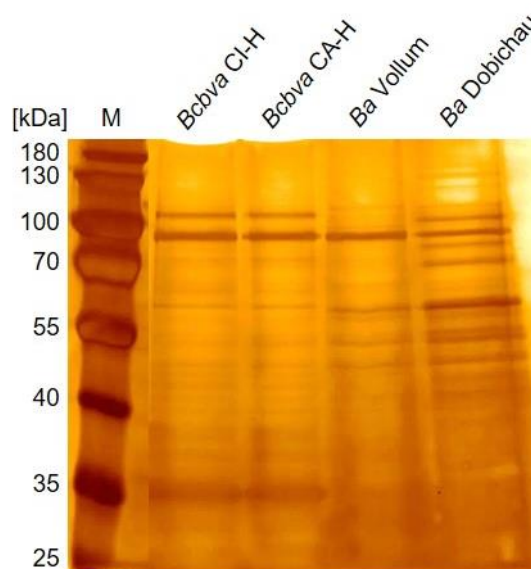


Abbildung 24: Proteinnachweis aus Kulturüberständen mittels Silberfärbung

Anhand der Silberfärbung gefärbtes SDS-Proteingel (12 %) von Kulturüberständen von *B. anthracis* und *Bcbva* nach 24-stündiger Anzucht in R-MM bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Anzahl und Intensität dieser Proteinbanden war bei *B. anthracis* Dobichau stärker ausgeprägt als bei den anderen untersuchten Bakterienstämmen. Sowohl bei *B. anthracis* als auch bei *Bcbva* waren im Silbergel Toxinbanden in der richtigen Größe von ca. 90 kDa anfärbbar. Zusätzlich war bei den *Bcbva*-Stämmen jeweils eine deutliche Bande auf einer Höhe von 35 kDa für pXO2-60 und von rund 110 kDa für das S-Layer Protein Sap sichtbar, die sich bei *B. anthracis* nicht darstellten (s. Abbildung 24). Anhand vorangegangener Untersuchungen, die das Ausschneiden letzterer Bande und eine anschließende massenspektrometrische Analyse beinhaltete, konnte die Sap-spezifische Bande eindeutig identifiziert werden.

Außerdem erfolgte der spezifische Nachweis von Toxinen im Immunoblot. Um die Toxinkomponenten PA und LF und das *Bcbva*-spezifische Protein pXO2-60 im Kulturüberstand der getesteten Stämme nachzuweisen, wurde die Methode des Western Blottings (s. 2.6.5) mit anschließender Detektion der Proteine durch spezifisch bindende Antikörper angewendet. Die ausgewählten Primärantikörper (s. 2.6.1) binden an das jeweilige Antigen und mit Hilfe eines Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers können die Proteinbanden danach auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden (s. 2.6.6). Abbildung 25 zeigt das Ergebnis des Nachweises von pXO2-60, PA und LF nach elektrophoretischer Auftrennung von jeweils 30 µl bakteriellem Kulturüberstand für jeden der vier untersuchten *Bacillus*-Stämme.

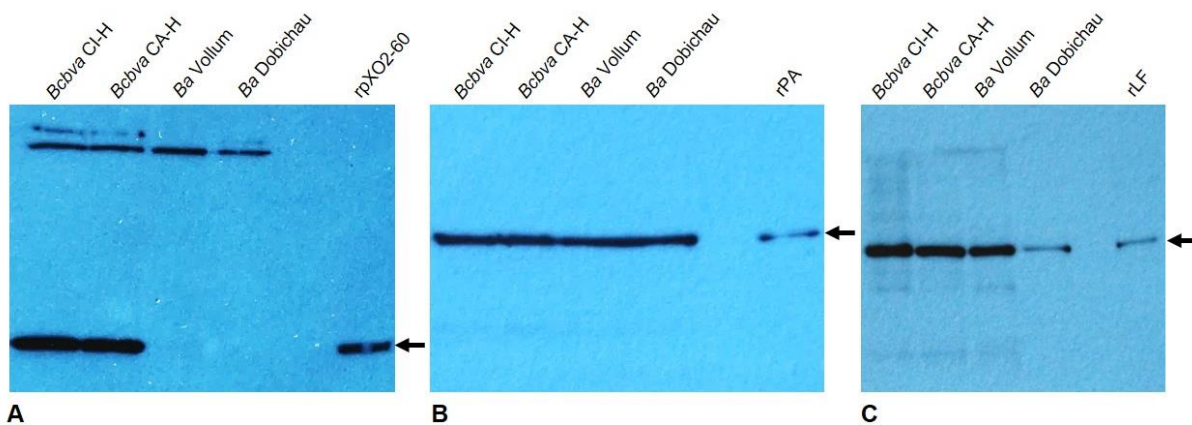


Abbildung 25: Nachweis von pXO2-60, Protektivem Antigen und Letalfaktor im Western Blot
Nachweis von pXO2-60 mittels des Mausserum M1.5 (A), Protektivem Antigen mittels mAB clone138 (B) und Letalfaktor mittels pc134 (C) aus Kulturüberständen von *B. anthracis* und *Bcbva* nach 24-stündiger Anzucht in R-MM bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Pfeile zeigen ein Molekulargewicht von 35 kDa (A), 83 kDa (B) und 90 kDa (C) an (12 % SDS-Gel).

Die spezifische Proteinbande für pXO2-60 hat ein MW von 35 kDa, was durch die Bande des mitgeführten Kontrollansatzes an rekombinantem pXO2-60 (rpXO2-60) bestätigt wurde (s. Abbildung 25 A). Das Protein konnte erwartungsgemäß in beiden *Bcbva*-Stämmen CI-H und CA-H nachgewiesen werden, wohingegen bei den *B. anthracis*-Stämmen keine pXO2-60-spezifische Bande detektierbar war. Da es sich bei dem verwendeten Primärantikörper zum

Nachweis von pXO2-60 um das Serum einer gegen *Bcbva* immunisierten Maus handelte, konnte zusätzlich die Produktion von PA dargestellt werden, erkennbar anhand der höher gelegenen Bande bei allen Stämmen. Die spezifische Proteinbande für PA hat ein MW von 83 kDa, wie im PA-spezifischen Immunoblot durch das als Positivkontrolle dienende rPA gezeigt werden konnte (s. Abbildung 25 B). Die Banden für das Protektive Antigen wiesen auf eine gleichmäßige Produktion und Sezernierung des Toxins in den Kulturüberstand bei allen Stämmen hin. Ein eindeutiger Nachweis von LF mit einem MW von 90 kDa, bewiesen anhand der Bande des mitgeführten rLF, war ebenfalls sowohl für *B. anthracis* als auch für *Bcbva* erfolgreich (s. Abbildung 25 C). Die LF-Banden waren bei allen Stämmen mit dem richtigen Molekulargewicht deutlich erkennbar, nur bei *B. anthracis* Dobichau etwas schwächer ausgeprägt. In den Kulturüberständen der drei anderen Stämme waren Abbauprodukte von LF detektierbar.

Insgesamt konnte somit bestätigt werden, dass die in R-Minimalmedium mit 5 % CO₂ angezogenen Bakterienstämme die bekanntermaßen unter induzierenden Bedingungen gebildeten Toxine bzw. Proteine sezernieren.

3.2.3 Kapselnachweis mittels Alcianblaufärbung

Zusätzlich zum Nachweis der Toxine sollte die Kapselproduktion in den zu untersuchenden Stämmen nach Wachstum in R-MM bzw. auf R-MM Agar überprüft werden. Dafür wurden sowohl die Kulturüberstände als auch sterilfiltrierte Überstände von resuspendiertem Koloniematerial (s. 2.4.4) elektrophoretisch aufgetrennt und die beiden Kapseltypen spezifisch anhand einer Alcianblaufärbung sichtbar gemacht (s. 2.6.4).

Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Kapselfärbung nach elektrophoretischer Auftrennung von jeweils 7,5 µl bakteriellem Kulturüberstand nach Anzucht in R-Minimalmedium. Bei den *Bcbva*-Ursprungsisolaten CI und CA konnten beide Kapseltypen nachgewiesen werden, wohingegen sich bei *B. anthracis* Vollum und *B. anthracis* Dobichau nur die charakteristische Bande für die PDGA-Kapsel anfärbte. In den Kulturüberständen der *hasA*-Deletionsstämme *Bcbva* CI-H und CA-H ließ sich ebenfalls nur die untere der beiden Banden darstellen, wodurch bestätigt werden konnte, dass die Mutanten nicht in der Lage waren, die HA-Kapsel zu synthetisieren. Auffällig war, dass die untersuchten *Bcbva*-Stämme CI-H und CA-H bei Wachstum in R-MM unter CO₂-Bedingung deutlich mehr PDGA-Kapsel zu produzieren scheinen als die Wildtypisolate und die beiden untersuchten *B. anthracis*-Stämme.

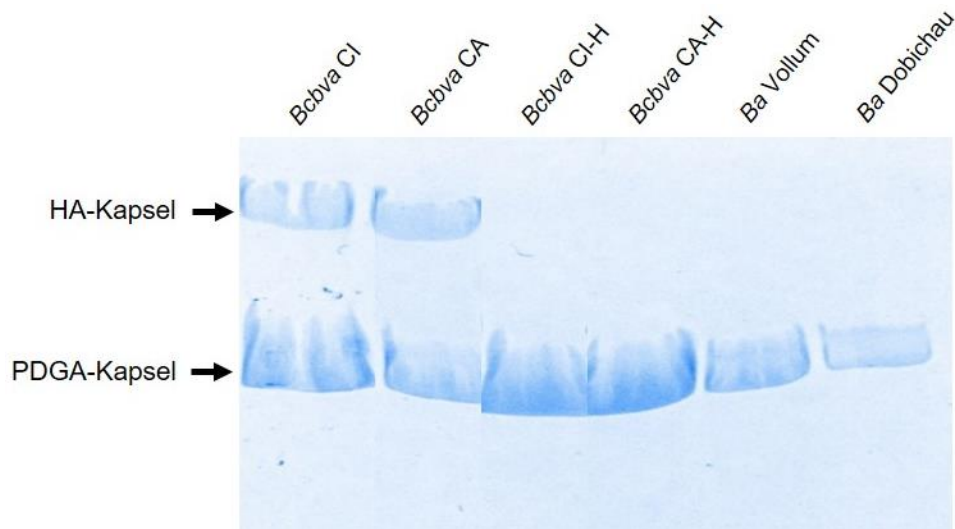


Abbildung 26: Kapselnachweis aus Kulturüberständen von *B. anthracis* und *Bcbva*

Mit Alcianblau gefärbtes Proteingel (5 %) für den Kapselnachweis in Kulturüberständen von *B. anthracis* und *Bcbva* nach 24-stündiger Anzucht in R-MM bei 37 °C und 5 % CO₂.

Ein identisches Ergebnis zeigte sich bei der Untersuchung von sterilfiltrierten Überständen von resuspendiertem Koloniematerial nach Wachstum der verschiedenen *Bacillus*-Stämme auf R-MM Agar (s. Abbildung 27). Die Kapselfärbung erfolgte hierbei analog zu der für die Kulturüberstände, allerdings wurden zusätzlich Proben der Stämme *Bcbva* CI-R und CA-R, die nur pXO1 besitzen und somit keine PDGA-Kapsel ausbilden können, sowie des pXO2-losen und *hasA*-mutierten Stammes *Bcbva* CAR-H, der weder die PDGA- noch die HA-Kapsel produzieren kann, analysiert.

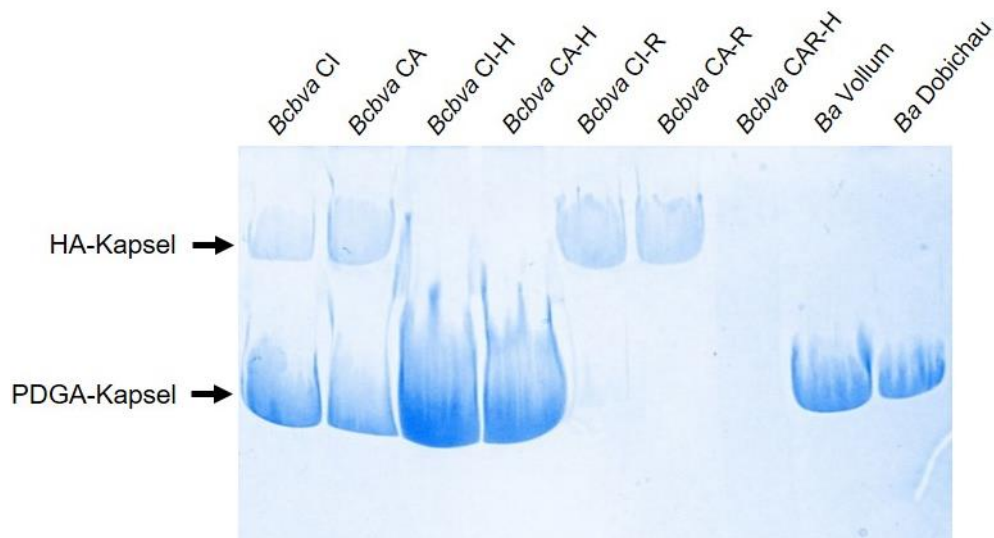


Abbildung 27: Kapselnachweis aus Überständen von resuspendiertem Koloniematerial von *B. anthracis* und *Bcbva*

Mit Alcianblau gefärbtes Proteingel (5 %) für den Kapselnachweis in Überständen von resuspendiertem Koloniematerial von *B. anthracis* und *Bcbva* nach 24-stündiger Anzucht auf R-MM Agar bei 37 °C und 5 % CO₂.

Den Erwartungen entsprechend synthetisierten die ausschließlich pXO1-tragenden Stämme *Bcbva* CI-R und CA-R keine PDGA-, sondern nur die HA-Kapsel. Bei dem komplett plasmidfreien Stamm *Bcbva* CAR-H erschien in der Färbung keine der beiden Kapselbanden. Im Vergleich zu den beiden *B. anthracis*-Vertretern zeigte sich auch hier bei den beiden *Bcbva*-Deletionsmutanten aufgrund der Bandenintensität eine stark erhöhte PDGA-Kapselproduktion nach Wachstum auf R-MM Agar mit 5 % CO₂.

Allgemein konnte die typischerweise auftretende Kapselbildung bei Anzucht unter induzierenden Bedingungen sowohl in den Kulturüberständen nach Wachstum der Bakterien in flüssigem R-MM als auch auf festem R-MM Agar nachgewiesen werden.

3.2.4 Identifizierung von sekretierten Proteinen der *Bcbva*-Stämme

Nachdem die Produktion von Virulenzfaktoren nach Anzucht in flüssigem bzw. auf festem R-Minimalmedium in den Kulturüberständen und Überständen des resuspendierten Koloniematerials der Zielstämme bestätigt wurde, konnten die Proben von *B. anthracis* Vollum und Dobichau und von *Bcbva* CI-H und CA-H für die massenspektrometrischen Analysen aufgearbeitet werden (s. 2.6.7). Pro Stamm wurde aus jeweils drei biologischen Replikaten das Proteom der Zelle (= Zelle) nach Wachstum auf R-Minimalmedium Agar und das Sekretom (= Kulturüberstand) nach Wachstum in R-Minimalmedium bestimmt. In nachfolgender Tabelle sind die quantifizierten Proteine pro Replikat der Zell- und Überstandsproben für jeden der vier untersuchten *Bacillus*-Stämme aufgeführt:

Tabelle 24: Übersicht über die Anzahl quantifizierter Proteine in den Zell- und Überstandsproben der *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämme. R = Replikat.

Stamm	Anzahl					
	Zelle			Kulturüberstand		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<i>Ba</i> Vollum	2405	2382	2121	1584	1297	1507
<i>Ba</i> Dobichau	2440	2441	2516	1961	1835	1944
<i>Bcbva</i> CI-H	2616	2678	2660	1109	768	664
<i>Bcbva</i> CA-H	2671	2600	2588	1184	573	581

Insgesamt konnte bei den Zellproben pro Stamm eine ähnliche Anzahl an Proteinen in allen Replikaten identifiziert werden, die sich auch zwischen den *B. anthracis*- und *Bcbva*-Isolaten kaum unterschied. Die Anzahl der quantifizierten Proteine in den Überstandsproben fiel grundsätzlich geringer aus. Bei *B. anthracis* Dobichau konnten die meisten sekretierten Proteine identifiziert werden, die Menge an Proteinen im Überstand von *B. anthracis* Vollum war ähnlich hoch. Auffällig war die vergleichsweise geringe Anzahl an sekretierten Proteinen

von *Bcbva* CI-H und CA-H, wobei jeweils im ersten Replikat mehr Proteine als im zweiten und dritten Replikat quantifiziert wurden.

Bei Gram-positiven Bakterien gehören zu den sekretierten Proteinen insbesondere Faktoren, die an der Pathogenität beteiligt sind. Solche Proteine können als mögliche Ziele für diagnostische Zwecke und/oder therapeutische Eingriffe dienen. Bakterien der *B. cereus* – Gruppe sezernieren eine Vielzahl von Faktoren, die für die Virulenz wesentlich sind, darunter zählen Toxine, Hämolysine, Proteasen und Lecithinasen. Mit dem Ziel der vorliegenden Arbeit, weitere *Bcbva*-spezifische Proteine zu identifizieren, die als potentielle Antigene fungieren könnten, fokussierte sich die weitere Analyse auf signifikant und ausschließlich im Sekretom der beiden *Bcbva*-Stämme vorkommende Proteine relativ zu den sekretierten Proteinen der beiden *B. anthracis*-Stämme. Nach der in Kapitel 2.6.7.5 beschriebenen bioinformatischen Auswertung der Proteomdaten konnten 33 sowohl im Sekretom (Kulturüberstand) von *Bcbva* CI-H als auch *Bcbva* CA-H auftretende potentiell diskriminierende Proteine nach Wachstum unter wirtsähnlichen Bedingungen identifiziert werden. Diese Proteine sind im nachfolgenden Volcano-Plot rot dargestellt (s. Abbildung 28). In der Darstellung spiegeln die grauen Punkte außerhalb der Kurve für die Signifikanz (auf der x-Achse als Difference von *Bcbva* zu *Ba* angegeben) die signifikant im Sekretom der *B. anthracis*-Stämme auftretenden Proteine wider. Alle übrigen Datenpunkte liegen unter den gesetzten Cutoffs und sind daher als nicht signifikant anzusehen.

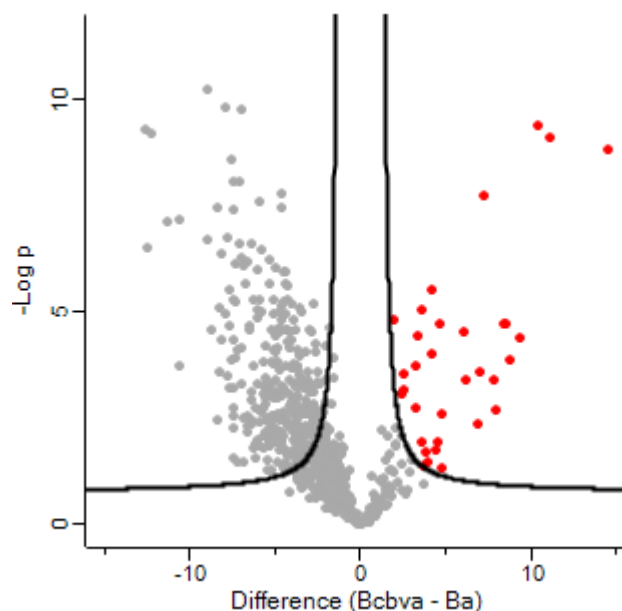


Abbildung 28: Volcano Plot der sekretierten Proteine der *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämme

Die schwarze Kurve markiert die Signifikanzgrenze von 1 % FDR (False Discovery Rate). Die roten Datenpunkte stellen 33 signifikant im Sekretom der *Bcbva*-Stämme vorkommende Proteine dar. Graue Datenpunkte außerhalb der Signifikanzkurve symbolisieren signifikant im Sekretom der *B. anthracis*-Stämme vorkommende Proteine. Die restlichen grauen Datenpunkte fallen unter die Signifikanzkurve und sind daher als nicht signifikant anzusehen.

Eine detaillierte Auflistung der 33 *Bcbva*-Proteine mit Angabe der dazugehörigen log₂FC- und FC-Werte ist in Tabelle 25 zu finden. Dabei handelte es sich um 31 chromosomal-kodierte und zwei pXO2-kodierte Proteine. In Klammern ist die Protein ID gemäß Uniprot angegeben.

Das Protein mit dem höchsten Unterschied in der Abundanz zwischen dem *B. anthracis*- und *Bcbva*-Sekretom, mit einem Fold Change von fast 23.000, war das S-Layer Protein Sap (D8H375), das auch schon bei der Untersuchung der Kulturüberstände im Silbergel bei den beiden *Bcbva*-Deletionsmutanten sichtbar war (s. 3.2.2, Abbildung 24). Zusätzlich wurde ein weiteres, um das 118-fach vermehrt sekretiertes, putatives S-Layer Protein identifiziert (D8H4M7). Das Genprodukt des bereits in der Transkriptomanalyse bei allen untersuchten Stämmen stark unter CO₂-Bedingung hochregulierten *pXO2-60*-Gens (D8HAL3) wies im *Bcbva*-Überstand einen FC von 357 im Gegensatz zum *B. anthracis*-Sekretom auf. Da eine CO₂-abhängige Regulation der Genexpression für *pXO2-60* bekannt ist und das Protein aufgrund eines vorzeitigen Stoppcodons von *B. anthracis* nicht sezerniert werden kann (s. 1.4.5), verifizierte dieses Ergebnis sowohl die gewonnenen Proteomdaten als auch zusätzlich die Daten aus der RNA-Sequenzierung. Bei dem zweiten pXO2-kodierten Protein handelte es sich um das Kapselprotein CapE (D8HAK2), das ein Membranprotein darstellt [36]. Das *capE*-Gen wurde als einziges des *capBCADE*-Operons in der vorliegenden Transkriptomanalyse nicht differentiell in CO₂ hochreguliert. Es handelt sich um das letzte Gen des Operons, das für ein nur 47-Aminosäuren langes Peptid kodiert, weshalb die mRNA schneller abgebaut werden könnte. Wie schon bei den stark exprimierten CO₂-Genen von *Bcbva* CI und CA beobachtet werden konnte, wurden auch im Sekretom der untersuchten *Bcbva*-Stämme mehrere ABC-Transporter detektiert, die von Genen des *opp*-Operons kodiert werden (D8H115, D8GXT1, D8GXQ4, D8GXQ5). Dabei war das *oppA5*-Gen (BACI_c06660) und das *oppA3*-Gen (BACI_c02340) sowie das Transkript BACI_c35270 des ABC-Transporters D8H6K9 bereits in der Liste der ausschließlich in den *Bcbva*-Stämmen hochregulierten Gene unter CO₂-Bedingung zu finden. Da die Analyse des Transkriptoms und Proteoms allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Wachstum der Bakterien erfolgte, kann ein direkter Vergleich der Daten nur bedingt erfolgen. Es ist dementsprechend nicht verwunderlich, wenn Genprodukte von identifizierten differentiell exprimierten Genen der *Bcbva*-Stämme aus der RNA-Sequenzierung nicht in der vorliegenden Liste der 33 sekretierten *Bcbva*-Proteine vorkommen. Weiterhin wurde ein putatives Lipoprotein der NlpC/P60 Familie (D8H2W5) mit einem 624-fach großen Unterschied von *Bcbva* CI-H und *Bcbva* CA-H sekretiert sowie ein weiteres putatives Lipoprotein (D8H3T6), das ein knapp 21-fach erhöhtes Vorkommen im Kulturüberstand der beiden Stämme aufwies. Außerdem fanden sich in der Liste zwei Internalin-Proteine (D8H0Q9 und D8H6B9), das von *chb1* kodierende Chitin-bindende Protein (D8H133), das vom *soj*-Gen kodierende sporulationsinhibierende Protein Soj (D8H561) und ein putatives Enterotoxin (D8H2X7). Erwähnenswert war die

Identifikation von fünf Proteinen (D8H1U7, D8GXG0, D8GWC2, D8H4V4 und D8H1U7), deren Funktion mit dem Transport von Eisenverbindungen assoziiert ist.

Tabelle 25: Potentiell diskriminierende und sekretierte Proteine der zwei *Bcbva*-Stämme im Vergleich zu den *B. anthracis*-Stämmen

Protein ID (<i>Bcbva</i> CI)	Proteinname	Genname / Locus Tag (<i>Bcbva</i> CI)	Molekulargewicht [kDa]	Difference (log2FC) <i>Bcbva</i> → <i>Ba</i>	Difference (FC) <i>Bcbva</i> → <i>Ba</i>	p-Wert (-log p)
D8H375	S-layer protein	<i>sap</i> / BACI_c09260	87,10	14,48	22857,82	8,82
D8H115	Oligopeptide ABC transporter	<i>oppA5</i> / BACI_c06660	67,18	11,13	2237,23	9,06
D8H1U7*	Iron compound ABC transporter	BACI_c50970	36,54	10,37	1325,30	9,34
D8H2W5	Putative lipoproteins NlpC/P60 family	BACI_c52250	61,39	9,29	624,47	4,39
D8GXG0	Cell surface protein; Iron transport associated	BACI_c45390	26,69	8,69	413,10	3,87
D8HAL3	Uncharacterized protein	<i>pXO2-60</i> / BACI_pCIXO200710	35,26	8,48	357,06	4,71
D8GXF9	Conserved membrane protein	BACI_c45380	97,33	8,34	325,02	4,73
D8H0Q9	putative Internalin	BACI_c05600	119,48	7,93	244,25	2,71
D8H133	Chitin-binding protein	<i>chb1</i> / BACI_c27570	49,94	7,74	214,45	3,41
D8GX41	Quinolinate phosphoribosyltransferase	<i>nadC</i> / BACI_c44160	30,40	7,24	151,34	7,71
D8GWC2	Ferrichrome ABC transporter; Periplasmatic protein	<i>fhuD2</i> / BACI_c43550	34,74	7,02	129,83	3,59
D8H4M7	Putative S-layer protein	BACI_c32340	40,38	6,89	118,28	2,36
D8H2X7	Possible enterotoxin/cell wall-binding protein	BACI_c08260	46,08	6,10	68,55	3,40
D8H6B9	Internalin protein	BACI_c13650	9,98	6,09	67,91	4,51
D8H561	Sporulation initiation inhibitor protein Soj	<i>soj</i> / BACI_c54860	27,40	4,78	27,54	2,60
D8H6K9	Putative oligopeptide ABC transporter	BACI_c35270	63,81	4,71	26,23	1,35
D8H8N4	RNA polymerase sigma factor	<i>sigG</i> / BACI_c38590	33,07	4,65	25,06	4,73
D8GXW4	Uncharacterized protein	BACI_c23680	20,47	4,46	22,04	1,95

D8H3T6	putative Lipoprotein	BACI_c52750	15,04	4,36	20,54	1,77
D8H193	Dipeptide epimerase	<i>ykfB</i> / BACI_c28180	38,63	4,19	18,31	4,02
D8H4Q7	Putative LPXTG-motif cell wall anchor domain protein	BACI_c32650	65,17	4,11	17,33	5,51
D8H0T9	Uncharacterized protein	BACI_c05900	19,44	3,94	15,30	1,46
D8H0S1	Ankyrin repeat protein	BACI_c05720	31,54	3,77	13,62	1,69
D8H1W6	Uncharacterized protein	BACI_c07000	56,16	3,67	12,75	1,39
D8GXT1	Oligopeptide ABC transporter	<i>oppA4</i> / BACI_c02610	64,28	3,53	11,59	1,92
D8GXQ4	Oligopeptide ABC transporter	<i>oppA2</i> / BACI_c02330	61,11	3,53	11,53	5,02
D8H4N5	Putative Beta-lactamase	BACI_c32420	47,41	3,31	9,92	4,44
D8H417	Conserved domain protein	BACI_c53560	25,44	3,26	9,61	3,73
D8HAK2	Polyglutamate capsule biosynthesis protein CapE	<i>capE</i> / BACI_pCIXO200600	5,36	3,18	9,07	2,73
D8GXQ5	Oligopeptide ABC transporter	<i>oppA3</i> / BACI_c02340	61,61	2,54	5,82	3,54
D8H4V4	Iron compound ABC transporter	BACI_c53740	35,43	2,50	5,67	3,16
D8H1U7*	Iron compound ABC transporter	BACI_c50970	39,91	2,37	5,16	3,07
D8GY68	Beta-lactamase	<i>bla2</i> / BACI_c24760	33,36	1,95	3,86	4,83

* Dopplung basierend auf diskriminierenden und geteilten Sequenzen

FC = Fold Change; log2FC = Logarithmus des Fold Change zur Basis 2

3.3 Analyse der Sporulation

In der vorliegenden Arbeit stellte neben der Transkriptom- und Proteomanalyse die Untersuchung der Sporenbildung die dritte vergleichende Analyse zwischen *Bcbva* und *B. anthracis* dar. Wie bereits in Kapitel 1.6 beschrieben, besitzt *Bcbva* wie *B. subtilis* im essentiellen Sporulationsgen *sigK* eine 22 kb große Insertion, die während des Sporulationsvorganges mit Hilfe einer Rekombinase ausgeschnitten wird. Im Gegensatz dazu besitzen fast alle anderen Stämme der *B. cereus*-Gruppe inkl. *B. anthracis* diese Insertion im *sigK*-Gen nicht (Ausnahme *B. cereus* AH820, Stand Mai 2021). Aufgrund dessen war das Ziel, die Expression und Regulation ausgewählter Sporulationsgene mittels quantitativer reverser Transkriptase-PCR im zeitlichen Verlauf näher zu betrachten und die Untersuchung durch elektronenmikroskopische Aufnahmen des Sporulationsvorganges zu komplettieren.

3.3.1 Untersuchung der Genexpression und Genregulation bei der Sporenbildung

3.3.1.1 Auswahl der Zielstämme und Zeitpunkte für die RNA-Extraktion

Zunächst wurden auch für diese Analyse geeignete Zielstämme ausgewählt. Bei *B. anthracis* handelte es sich um die gleichen Vertreter wie bei der Transkriptom- und Proteomanalyse, d.h. *B. anthracis* Vollum und *B. anthracis* Dobichau. Die Wahl bei den *Bcbva*-Stämmen fiel wiederum auf die Wildtypisolate CI und CA und auf zwei Sporulationsmutanten (s. Tabelle 1). Bei *Bcbva* CI-12 handelt es sich um einen Subklon aus *Bcbva* CI, der eine Frameshift-Mutation und ein daraus resultierendes vorzeitiges Stopcodon im *spo0A*-Gen besitzt. *Spo0A* stellt den übergeordneten Regulator dar, der den Übergang vom vegetativen Wachstum zur Sporulation bestimmt. Die zweite Sporulationsmutante *Bcbva* CA-2 ist ein Subklon aus *Bcbva* CA, dessen *spoVG*-Gen aufgrund eines vorzeitigen Stopcodons mutiert vorliegt. *SpoVG* kodiert für einen pleiotropen Regulator, der in *B. anthracis* die Sporulation durch positive Regulation des integralen Membranproteins *SpoIIE*, welches an der asymmetrischen Septumteilung bei Einleitung des Sporulationszyklus beteiligt ist, beeinflusst. Das Vorliegen der Mutationen in den beiden sporulationsdefizienten Stämmen wurde in vorhergegangenen Untersuchungen mittels Illumina-Sequenzierung identifiziert, in der vorliegenden Arbeit anhand von Sanger-Sequenzierung nochmals überprüft und bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in flüssigem Medium G bei 37 °C kombiniert mit atmosphärischem Sauerstoffgehalt (O₂-Bedingung). Aufgrund von Daten, die aus vorhergegangenen Experimenten mittels konventioneller PCR generiert wurden, war bekannt, dass in Medium G die Sporenbildung bei *Bcbva* und *B. anthracis* mit Eintritt in die stationäre Wachstumsphase beginnt. Auf dieser Grundlage aufbauend sollten die mRNA-Extraktionen

zu drei verschiedenen Zeitpunkten ab dem Ende der exponentiellen und Anfang der stationären Phase erfolgen. Um die Untersuchungszeitpunkte für alle sechs Zielstämme zu ermitteln, wurden erneut Wachstumskurven in dem Sporulationsmedium unter O_2 -Bedingung aufgezeichnet (s. Abbildung 29). Eine tabellarische Übersicht der gemessenen OD-Werte für die erstellten Wachstumskurven ist im Anhang (s. Tabelle 43) zu finden.

Im Allgemeinen war bei allen Stämmen ein annähernd gleicher Wachstumsverlauf mit ähnlichen Zelldichten zu beobachten (s. Abbildung 29 A). Die beiden *B. anthracis*-Stämme zeigten eine etwas verlängerte exponentielle Wachstumsphase im Vergleich zu den *Bcbva*-Stämmen, sodass der Übergang von exponentieller in stationäre Phase erst nach 5 h Inkubationszeit zu verzeichnen war (s. Abbildung 29 B). Im Gegensatz dazu traten die vier *Bcbva*-Vertreter bereits nach 4 h Wachstum in die stationäre Phase ein (s. Abbildung 29 C und D). Einzeln betrachtet waren die Kurvenverläufe der *B. anthracis*-Stämme, *Bcbva*-Ursprungsisolate und *Bcbva*-Sporulationsmutanten untereinander nahezu identisch.

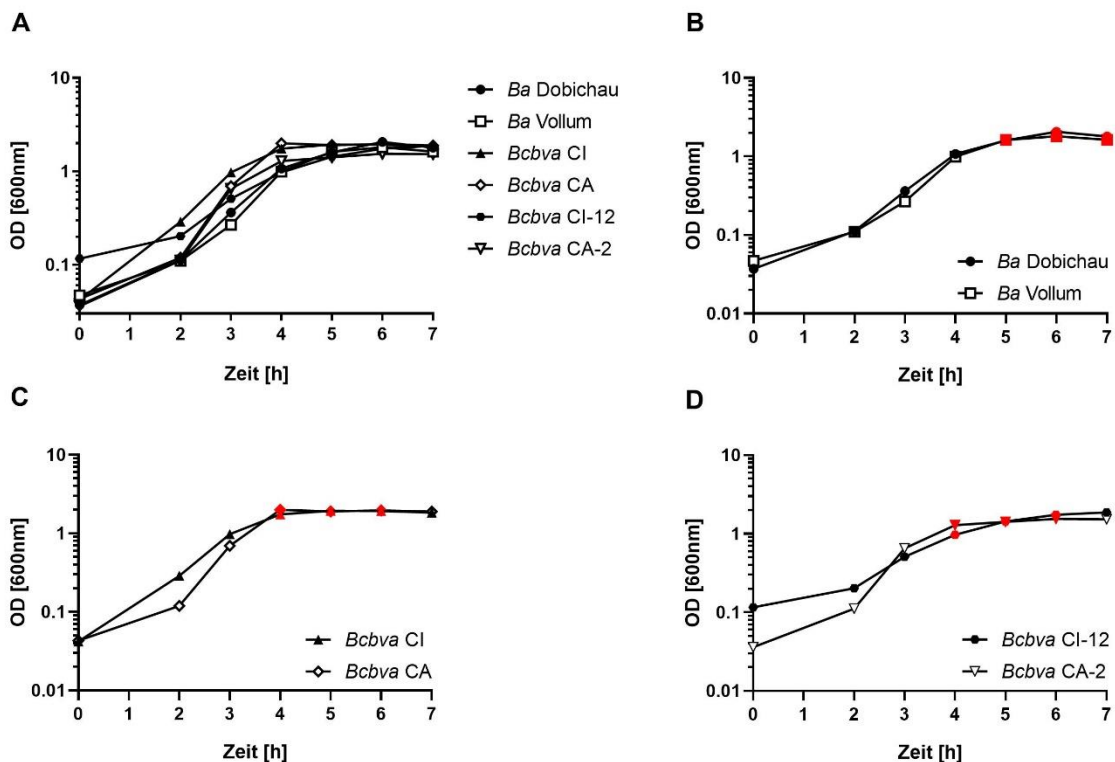


Abbildung 29: Wachstumskurven von *B. anthracis* und *Bcbva* in Medium G

Dargestellt ist das Wachstum in Medium G bei 37 °C von allen sechs *Bacillus*-Stämmen (A), den *B. anthracis*-Stämmen (B), den *Bcbva*-Wildtypstämmen (C) und den *Bcbva*-Sporulationsmutanten (D). Die rot markierten Datenpunkte symbolisieren die ausgewählten Untersuchungszeitpunkte. OD = Optische Dichte.

Anhand der Wachstumskurven wurden die drei RNA-Extraktionszeitpunkte für *B. anthracis* Vollum und *B. anthracis* Dobichau auf 5 h, 6 h und 7 h Inkubationsdauer festgelegt, die Untersuchungszeitpunkte für die vier *Bcbva*-Stämme lagen bei 4 h, 5 h und 6 h (s. Abbildung 29, rot markierte Datenpunkte).

Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden neben der RNA-Extraktion zusätzlich Präparate für Gram- und Rakettefärbungen angefertigt, um die Sporenbildung unter dem Lichtmikroskop beurteilen zu können. In beiden Färbungen waren sowohl bei den *B. anthracis*-Stämmen als auch bei *Bcbva* CI und CA bereits ab dem ersten Zeitpunkt helle Sporenanlagen in den vegetativen Zellen erkennbar. Diese Beobachtung konnte ebenfalls für die beiden anderen Untersuchungszeitpunkte festgestellt werden. Unter dem Mikroskop waren in den Rakette-Präparaten zu keinem Zeitpunkt freie, grün angefärbte Endsporen zu sehen. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse beispielhaft für den *Bcbva* CI dargestellt. Bei den Sporulationsmutanten *Bcbva* CI-12 und *Bcbva* CA-2 konnten zu keinem Zeitpunkt Anlagen von Endsporen in den vegetativen Zellen beobachtet werden.

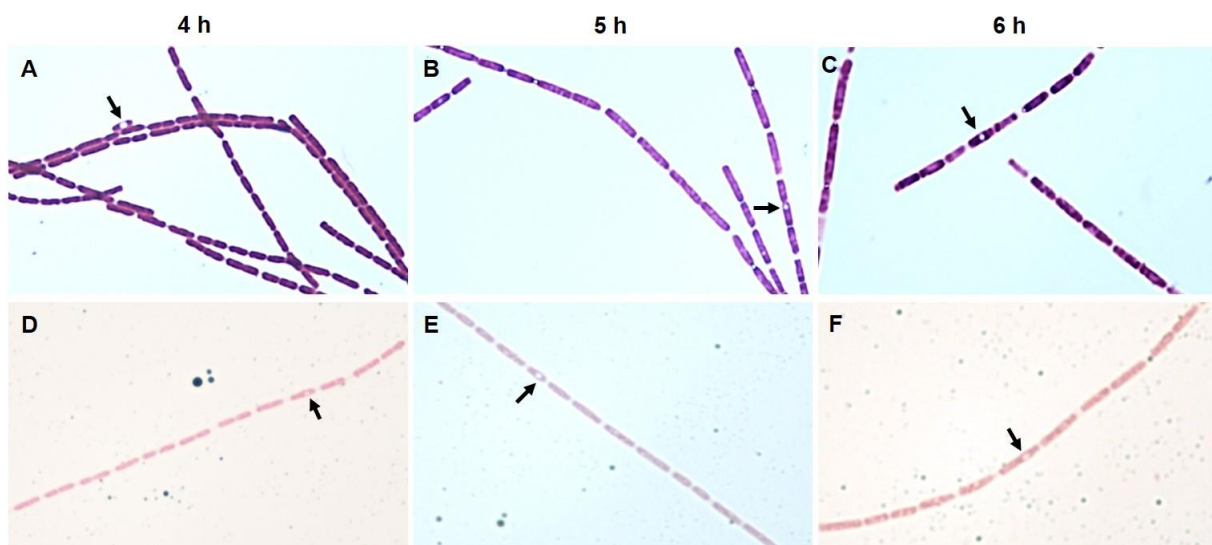


Abbildung 30: Gram- und Rakettefärbung von *Bcbva* CI

Gram-Färbung (A-C) und Sporenfärbung nach Rakette (D-F) nach 4 h, 5 h und 6 h Inkubation in Medium G bei 37 °C. Die schwarzen Pfeile markieren helle Sporenanlagen innerhalb der Mutterzelle.

3.3.1.2 Auswahl der Zielgene

Um vergleichende Untersuchungen zur Genexpression und -regulation bei der Sporenbildung durchführen zu können, mussten im nächsten Schritt Zielgene ausgewählt werden, die Tabelle 26 zu entnehmen sind. Es wurde darauf geachtet, dass bei der Auswahl für jedes Stadium des Sporulationsprozesses ein entsprechend beteiligtes Gen vertreten ist. Dadurch sollte der zeitliche Verlauf der Sporulation bei der Analyse der Genexpression nachvollzogen werden. Bei *sigB* handelt es sich um das Gen für den Sigmafaktor σ^B der generellen Stressantwort bei *B. subtilis*. Dessen Genexpression sollte untersucht werden, da die Induktion dieses Transkriptionsfaktors eine deutliche Hemmung der Sporenbildung bewirken würde. SigB induziert die Expression der Aspartyl-Phosphatase Spo0E, die für die Blockade der Sporulationsinitiation über Dephosphorylierung und Inaktivierung von Spo0A verantwortlich ist [166]. Die SigB-Aktivität stellt ein Bindeglied zwischen den dominanten und sich

wahrscheinlich gegenseitig ausschließenden adaptiven Reaktionen, Sporulation und genereller Stressantwort, dar und beeinflusst somit das Zellschicksal der Bakterien.

Tabelle 26: Genauswahl für die qRT-PCR zur Untersuchung der Sporulation

Genname / Locus Tag	Genfunktion	Funktionsort	Entwicklungsstadium
<i>sigB</i>	genereller Sigmafaktor der Stressantwort	Mutterzelle	Hemmung der Sporenenitiation
<i>sigF</i>	sporulations-spezifischer Sigmafaktor	Vorspore	Asymmetrische Septumteilung
<i>spoVG</i>	sporulations-spezifisches Regulatorprotein	Mutterzelle	Asymmetrische Septumteilung
<i>spoIIE</i>	sporulations-spezifische Serin-Phosphatase	Mutterzelle	Asymmetrische Septumteilung
<i>sigE</i>	sporulations-spezifischer Sigmafaktor	Mutterzelle	Beginn Engulfment
<i>spoIIID</i>	Regulator der Mutterzell-Genexpression	Mutterzelle	Beginn Engulfment
<i>sigG</i>	sporulations-spezifischer Sigmafaktor	Vorspore	Ende Engulfment
BACI_c43240	Rekombinase	Mutterzelle	Ende Engulfment
<i>sigK</i>	sporulations-spezifischer Sigmafaktor	Mutterzelle	Ende Engulfment / Sporendifferenzierung
<i>murF</i>	Protein des Sporencortex	Vorspore	Bildung des Cortex
<i>cotD</i>	Protein der Sporenhülle	Vorspore	Bildung der Sporenhülle
<i>cotZ1</i>	Protein der Sporenhülle	Vorspore	Bildung der Sporenhülle
<i>sasP1</i>	DNA-schützendes Protein	Vorspore	Sporendifferenzierung

Die Entwicklung der Endospore wird sowohl zeitlich als auch hierarchisch durch sporenspezifische Sigmafaktoren reguliert. Für die Analyse wurde das Gen *sigF* des Sigmafaktors σ^F ausgewählt, da es zu Beginn der Sporulation in der Vorspore exprimiert wird. *spoVG* kodiert für den pleiotropen Regulator SpoVG, der die Expression von *spoIIE* moduliert. Das Membranprotein SpoIIE initiiert die asymmetrische Septumteilung und ist demzufolge auch in den ersten Schritten des Sporulationszyklus involviert. Im weiteren Verlauf kommt es zur Aktivierung von *sigE* in der Mutterzelle, und durch die Transkription des σ^E -Regulons wird

das Gen *spolIID* für das Regulatorprotein SpoIIID aktiviert, woraufhin die Expression der für das Engulfment nötigen Proteine erfolgt. Der Abschluss des Engulfments führt zur Expression von *sigG* und somit zur Aktivierung des Sigmafaktors σ^G in der Vospore. In der Folge wird *sigK* in der Mutterzelle exprimiert. Durch die Aktivität von σ^K werden etwa 100 Gene aktiviert, unter die auch *murF*, *cotD*, *cotZ1* und *sasP1* fallen. Deren Genprodukte setzen den Cortex (u.a. MurF) und die Sporenhülle (u.a. CotD CotZ) zusammen oder binden als kleine säurelösliche Proteine (u.a. SasP1) an die DNA der Spore und schützen diese vor DNA-schädigenden Substanzen. Zusätzlich sollte das Gen für die Rekombinase (BACI_c43240) untersucht werden, die während des Sporulationsvorganges die sich bei *Bcbva* im *sigK*-Gen befindliche Insertion ausschneidet, welche bei *B. anthracis* nicht vorkommt.

Die Durchführung zur Generierung der Primer, zum Ausschluss der Bildung von Primer-Dimeren mittels konventioneller PCR, zur Erstellung von Schmelzkurven unter Verwendung genomischer DNA und zur Bestimmung der Amplifikationseffizienzen anhand von DNA-Verdünnungsreihen erfolgte analog zu der für die Verifizierung der RNA-Seq Daten anhand ausgewählter Zielgene, beschrieben in Kapitel 3.1.7. Die entsprechenden Ergebnisse sowie Oligonukleotidsequenzen sind im Anhang (s. Tabelle 33 und Tabelle 44) aufgeführt.

3.3.1.3 Relative Quantifizierung der Genexpression

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Analyse von den insgesamt drei hergestellten biologischen Replikaten pro Stamm für die vier voll virulenten Stämme (*B. anthracis* Vollum, *B. anthracis* Dobichau, *Bcbva* CI und *Bcbva* CA) von zwei biologischen Replikaten und für die beiden Sporulationsmutanten (*Bcbva* CI-12 und *Bcbva* CA-2) von einem biologischen Replikat komplementäre DNA mit Random Primern hergestellt. Diese Reduzierung war aufgrund des Umfangs der durchzuführenden Arbeitsschritte notwendig. Die anschließende qRT-PCR mit dem SYBR Green I Fluoreszenzfarbstoff wurde in 2 technischen Replikaten mit Dreifachbestimmungen ausgeführt. Die Untersuchung der Mutanten erfolgte mit nur einem technischen Replikat in Dreifachbestimmung. Im Anschluss wurde die relative Quantifizierung der Genexpression anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode vorgenommen.

Bei der relativen Quantifizierung der Genexpression durch Normierung gegen ein Haushaltsgen nach Pfaffl [139] wird die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein zweites Gen, das konstitutiv exprimiert wird, bezogen. Dieses Gen wird als endogene Kontrolle bezeichnet und war in der vorliegenden Arbeit *rpoB* (die β -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase). Bei diesem Analyseverfahren wird eine Expressionsrate ermittelt, die zum Vergleich von beispielweise verschiedenen Wachstumsbedingungen oder Zeitpunkten herangezogen werden kann. Dadurch sollen Störfaktoren wie eine unterschiedliche Zellzahl bei der RNA-Extraktion und unterschiedliche Effizienz bei der RNA-Aufreinigung oder Reversen Transkriptase-Reaktion durch Vergleich mit dem Haushaltsgen zu einer geringeren

Varianz der Untersuchungsergebnisse führen. Durch die Rechenformel der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (s. 2.5.2.4) heben sich die unterschiedlichen Probeneffekte in den einzelnen Rechenschritten wieder auf. Die relative Expression des zu untersuchenden Zielgens in den experimentellen Proben wird bei dieser Auswertungsmethode auf ein sog. Kalibrator-Probenmaterial bezogen. Im vorliegenden Fall der Sporulationsanalyse handelte es sich dabei um die RNA-Präparation des ersten Zeitpunktes, der für eine bessere Verständlichkeit im weiteren Verlauf als Referenzzeitpunkt t_0 bezeichnet wird. Die RNA-Präparationen der zwei nachfolgenden Zeitpunkte stellten die Untersuchungszeitpunkte t_1 und t_2 dar (s. Tabelle 27). Die relativen Expressionen der Zielgene zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten wurden stets auf den Kalibratorwert bezogen (d.h. t_1 zu t_0 bzw. t_2 zu t_0).

Tabelle 27: Referenz- und Untersuchungszeitpunkte für die relative Quantifizierung der Genexpression anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Stamm	Zeitpunkt	Wachstumsdauer (h)	$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode
<i>B. anthracis</i> Vollum / <i>B. anthracis</i> Dobichau	t_0	5	Ct Kalibrator
	t_1	6	Ct Zielgen Untersuchungszeitpunkt 1
	t_2	7	Ct Zielgen Untersuchungszeitpunkt 2
<i>Bcbva</i> CI und CA / <i>Bcbva</i> CI-12 und CA-2	t_0	4	Ct Kalibrator
	t_1	5	Ct Zielgen Untersuchungszeitpunkt 1
	t_2	6	Ct Zielgen Untersuchungszeitpunkt 2

Die berechneten Expressionssteigerungen ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Werte) der Zielgene für die zwei Untersuchungszeitpunkte der sechs ausgewählten Stämme sind im Anhang in den Tabellen 45 - 47 aufgeführt. Eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse pro Stamm ist nachfolgend den Abbildungen 31 – 33 zu entnehmen. In den Graphiken entsprechen die Werte über 1,0 einer Expressionssteigerung, markiert anhand der gestrichelten roten Linie. In dem Bereich unterhalb der roten Linie ($< 1,0$) sind die Genexpressionsunterschiede als nicht signifikant anzusehen. Das Ende einer Säule repräsentiert den $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Mittelwert aus zwei bzw. einem biologischen Replikat(en). Die Darstellung der jeweiligen Werte der biologischen Replikate (Mittelwerte aus den zwei technischen Replikaten) erfolgt für t_1 anhand kreisförmiger und für t_2 anhand dreieckiger Datenpunkte.

Die Expression der Sporulationsgene war relativ zum Zeitpunkt t_0 in allen Stämmen zu den Untersuchungszeitpunkten t_1 und t_2 entweder erhöht (Werte $> 1,0$) oder als nicht signifikant zu

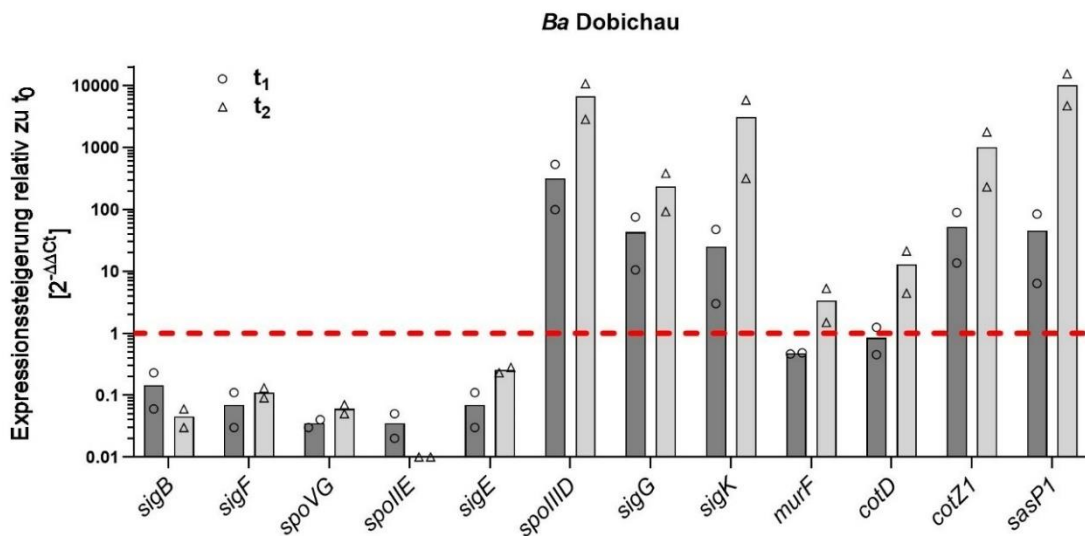
betrachten (Werte zwischen 0 und 1,0). Dabei handelte es sich in einigen Fällen um sehr hohe Expressionssteigerungen mit Werten bis über 10000. Es gab kein Zielgen, dessen Expression bei t_1 und t_2 signifikant niedriger war (Werte $< -1,0$) als zum Referenzzeitpunkt.

Die Expression von *sigB* war weder zum Zeitpunkt t_1 noch zum Zeitpunkt t_2 in den Stämmen *B. anthracis* Dobichau, *Bcbva* CA und *Bcbva* CA-2 erhöht. Bei den anderen drei Stämmen zeigte sich bei t_1 ein leichter Expressionsanstieg, der sich bei *Bcbva* CI auf das 10-fache belief. Allerdings lag der Genexpressionsunterschied zum zweiten Untersuchungszeitpunkt bei *B. anthracis* Vollum und *Bcbva* CI unterhalb der Signifikanzgrenze von 1,0, bei *Bcbva* CI-12 war die Expressionssteigerung um das 1,4-fache minimal.

Beim Betrachten der Ergebnisse von *B. anthracis* Dobichau (s. Abbildung 31 A) konnten keine erhöhten Expressionsraten der Zielgene *sigF*, *spoVG*, *spoIIIE* und *sigE*, die in den frühen Stadien der Sporenbildung exprimiert werden, zu beiden Zeitpunkten festgestellt werden. Zum Zeitpunkt t_1 war die Expression von *spoIIID* mit einer 315-fachen Steigerung am höchsten, für die Sigmafaktoren *sigG* und *sigK* und für die Gene *cotZ1* und *sasP1*, die zeitlich während der Sporulation später exprimiert werden, zeigte sich eine 25– bis 50–fache Erhöhung. Für *murF* und *cotD* hingegen konnte noch keine signifikante Expressionssteigerung beobachtet werden. Die Daten vom Untersuchungszeitpunkt t_2 ergaben, dass die Expressionsraten relativ zu t_0 bei allen zuletzt genannten sieben Genen höher ausfielen als beim Vergleich von t_1 zu t_0 . Es konnte für die Gene *murF* und *cotD* nun ebenfalls eine signifikante Erhöhung um das 3- bzw. 12-fache beobachtet werden. Der höchste Anstieg wurde für das Gen *sasP1* mit einer 10063-fachen Steigerung verzeichnet. Die Expressionssteigerungen der Gene *spoIIID*, *sigG*, *sigK* und *cotZ1* beliefen sich auf das 200– bis 7000-fache.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *B. anthracis* Dobichau zeigten sich bei *B. anthracis* Vollum (s. Abbildung 31 B) zum Zeitpunkt t_1 niedrige, aber signifikant erhöhte Expressionen der frühen Sporulationsgene *sigF* und *spoVG*. Für die Gene *spoIIIE*, *sigE*, *spoIIID* und *sigG* wurde ebenfalls ein Expressionsanstieg berechnet, wobei *sigG* mit einer 23-fachen Steigerung die höchste Expression bei t_1 aufwies. Beim Untersuchungszeitpunkt t_2 fiel auf, dass wie bei *B. anthracis* Dobichau eine Expressionssteigerung erst für *spoIIID* und die nachfolgend exprimierten Gene *sigG*, *sigK*, *cotZ1* und *sasP1* auftrat. Der Anstieg für *spoIIID* betrug das fast 90-fache, die signifikanten Steigerungen der vier anderen Gene rangierten zwischen dem 8- bis 37-fachen, was höhere Expressionsraten im Vergleich zu der t_1 -Analyse darstellte. Interessanterweise wurde für die Gene *murF* und *cotD* kein signifikanter Anstieg zum Zeitpunkt t_2 beobachtet, und zum Zeitpunkt t_1 lagen die Expressionswerte nur geringfügig über der Signifikanzgrenze. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die Expressionsraten im Allgemeinen bei *B. anthracis* Vollum niedriger waren als bei *B. anthracis* Dobichau.

A



B

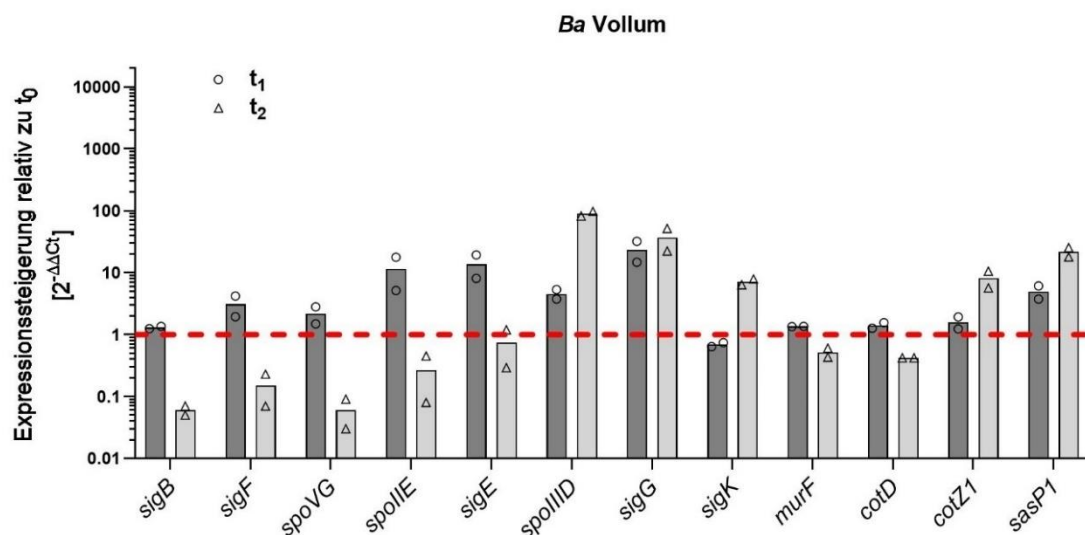


Abbildung 31: relative Quantifizierung der Sporulationsgene für *B. anthracis*

Expressionssteigerungen der untersuchten Sporulationsgene bei *B. anthracis* Dobichau (A) und *B. anthracis* Vollum (B) zu den Untersuchungszeitpunkten t₁ und t₂ relativ zum Referenzzeitpunkt t₀. Die Werte über 1,0 entsprechen einer Expressionssteigerung, markiert anhand der gestrichelten roten Linie. In dem Bereich unterhalb der roten Linie (< 1,0) sind die Genexpressionsunterschiede als nicht signifikant anzusehen. Das Ende einer Säule repräsentiert den 2^{-ΔΔCt}-Mittelwert aus zwei biologischen Replikaten. Die Darstellung der jeweiligen Werte der biologischen Replikate (Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten) erfolgt für t₁ anhand kreisförmiger und für t₂ anhand dreieckiger Datenpunkte.

Die Analyse bei *Bcbva* CI (s. Abbildung 32 A) ergab, dass für das frühe Sporulationsgen *sigF* zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Expressionsanstieg verzeichnet werden konnte. Jedoch waren bei t₁ die Expressionen von *spoVG*, *spoIIE* und *sigE* noch signifikant um das 3- bis fast 6-fache erhöht, was zum Zeitpunkt t₂ wiederum nicht mehr zutraf. Der

höchste, um das 621-fache, Anstieg war bei t_1 auch hier für *spoIIID* zu sehen, die Steigerungen der später exprimierten Gene *sigG*, *murF* und *cotD* beliefen sie auf das 2- bis 6-fache, die Gene *sigK*, *cotZ1* und *sasP1* zeigten eine 83- bis 158-fache Erhöhung. Die Expressionsanstiege der eben genannten Gene waren zum Zeitpunkt t_2 nochmals höher, außer bei den Genen *murF* und *cotZ1*. Der höchste Anstieg um das 1467-fache wurde für *spoIIID* berechnet, die Steigerungen der anderen Gene rangierten zwischen dem 17- und fast 500-fachen. Das Gen für die Rekombinase zeigte bei t_1 einen Anstieg um das 50-fache, bei t_2 handelte es sich bereits um eine 426-fache Expressionssteigerung. Auch beim *Bcbva* CI war auffällig, dass die Expression des *murF*-Gens zum Zeitpunkt t_1 , jedoch nicht zum Zeitpunkt t_2 signifikant erhöht war, wie es bereits bei *B. anthracis* Vollum beobachtet wurde.

Abweichend zu den Ergebnissen vom *Bcbva* CI wurde beim *Bcbva* CA (s. Abbildung 32 B) der höchste Genexpressionsunterschied zum Zeitpunkt t_1 bei den Genen *spoIIIE* und *sigE* mit einem fast 90-fachen Anstieg verzeichnet. Die Gene *sigF* und *sigG* zeigten ebenfalls eine 10- bzw. 67-fache Erhöhung. Interessanterweise konnte für *spoVG* als zeitlich früh exprimiertes Gen während der Sporulation weder bei t_1 noch bei t_2 eine signifikant erhöhte Expression relativ zu t_0 nachgewiesen werden. Die Expressionen des *spoIIID*- und Rekombinasegens waren zum Zeitpunkt t_1 ebenfalls nicht erhöht, die späten Sporulationsgene *sigK*, *cotZ1*, *cotD* und *sasP1* wiesen niedrige Steigerungen um das 2- bis 3-fache auf. Im Vergleich fielen die Expressionsraten zum zweiten Untersuchungszeitpunkt für *sigF*, *spoIIIE* und *sigE* niedriger aus als zum ersten Untersuchungszeitpunkt, dafür waren die Anstiege ab der Expression von *spoIIID* und für alle zeitlich nachfolgenden Gene größer. Hier war die höchste Steigerung wieder bei *spoIIID* um das 146-fache zu finden. Die Expressionserhöhung der Gene *sigG*, *sigK*, *cotZ1*, *sasP1* und des Gens für die Rekombinase betrug das 30- bis 116-fache, der Anstieg von *cotD* belief sich auf das 6-fache. Der Expressionsunterschied des *murF*-Gens lag zu keinem Untersuchungszeitpunkt über der Signifikanzgrenze von 1,0.

Im Gegensatz zu den beiden *B. anthracis*-Stämmen und *Bcbva*-Ursprungsisolaten waren bei beiden Sporulationsmutanten *Bcbva* CI-12 und *Bcbva* CA-2 (s. Abbildung 33 A und B) keine oder nur minimal signifikant erhöhte Expressionssteigerungen bei allen untersuchten Sporulationsgenen festzustellen. Einzig auffällig war die 11-fache Erhöhung der Expression von *sigF* bei *Bcbva* CI-12 zum Zeitpunkt t_2 .

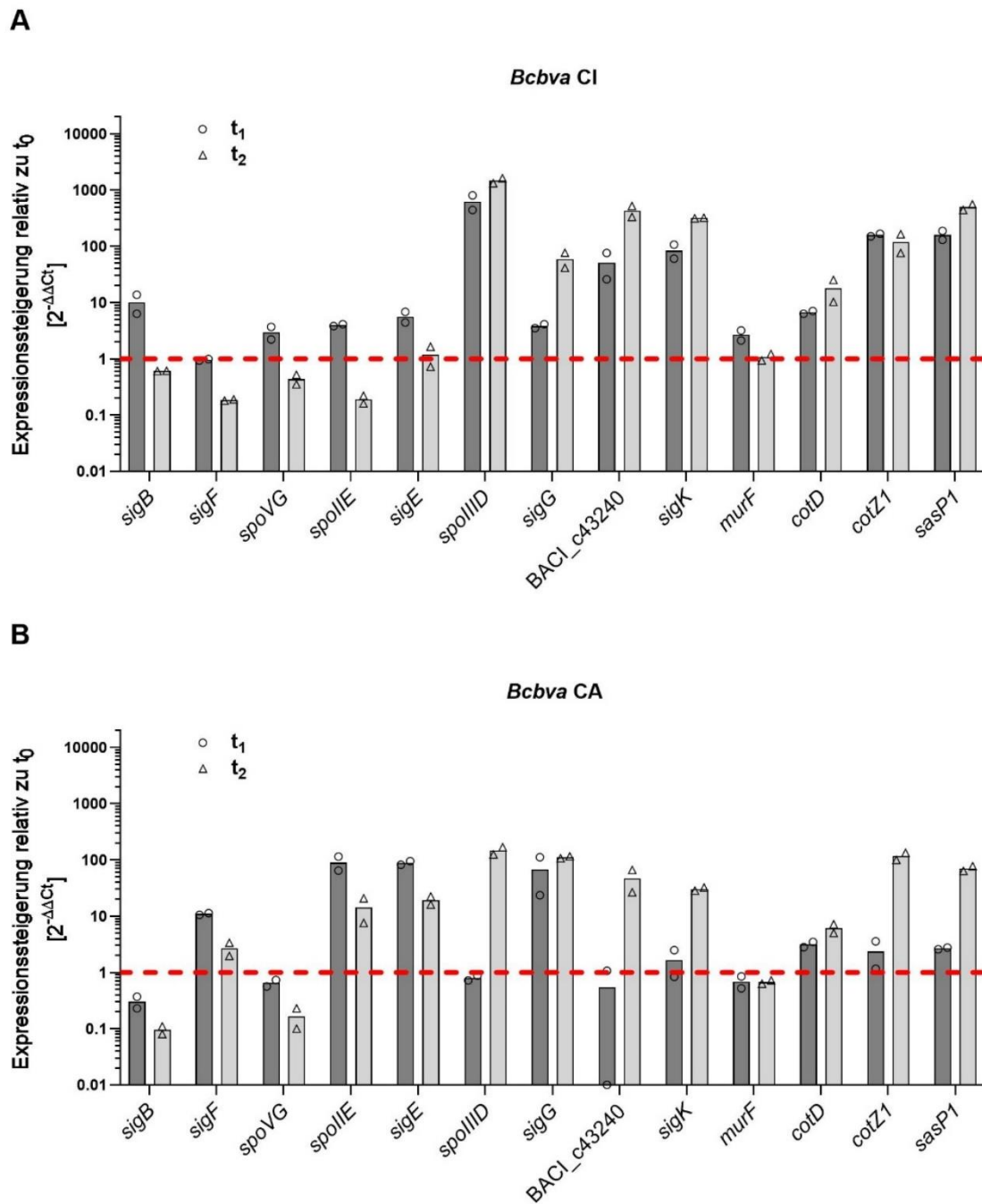


Abbildung 32: relative Quantifizierung der Sporulationsgene für *Bcbva*

Expressionssteigerungen der untersuchten Sporulationsgene bei *Bcbva* CI (A) und *Bcbva* CA (B) zu den Untersuchungszeitpunkten t_1 und t_2 relativ zum Referenzzeitpunkt t_0 . Die Werte über 1,0 entsprechen einer Expressionssteigerung, markiert anhand der gestrichelten roten Linie. In dem Bereich unterhalb der roten Linie ($< 1,0$) sind die Genexpressionsunterschiede als nicht signifikant anzusehen. Das Ende einer Säule repräsentiert den $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Mittelwert aus zwei biologischen Replikaten. Die Darstellung der jeweiligen Werte der biologischen Replikate (Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten) erfolgt für t_1 anhand kreisförmiger und für t_2 anhand dreieckiger Datenpunkte.

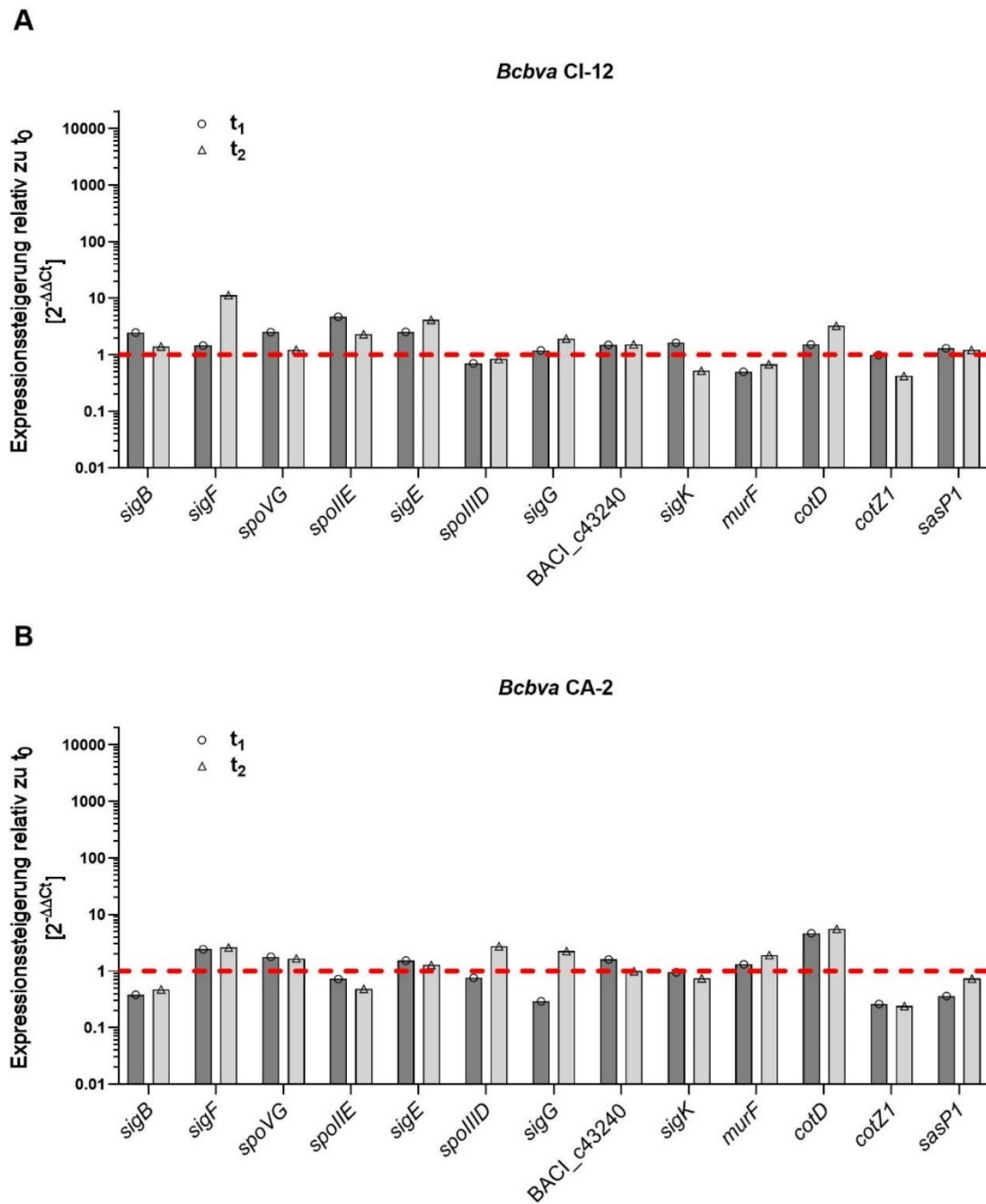


Abbildung 33: relative Quantifizierung der Sporulationsgene für die *Bcbva*-Sporulationsmutanten

Expressionssteigerungen der untersuchten Sporulationsgene bei *Bcbva* CI-12 (A) und *Bcbva* CA-2 (B) zu den Untersuchungszeitpunkten t_1 und t_2 relativ zum Referenzzeitpunkt t_0 . Die Werte über 1,0 entsprechen einer Expressionssteigerung, markiert anhand der gestrichelten roten Linie. In dem Bereich unterhalb der roten Linie ($< 1,0$) sind die Genexpressionsunterschiede als nicht signifikant anzusehen. Das Ende einer Säule repräsentiert den $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Mittelwert aus einem biologischen Replikate. Die Darstellung der jeweiligen Werte erfolgt für t_1 anhand kreisförmiger und für t_2 anhand dreieckiger Datenpunkte.

3.3.2 Untersuchung der Sporenbildung im Elektronenmikroskop

Die Sporenbildung sollte neben der molekularbiologischen Analyse zusätzlich im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht werden. Um die einzelnen Stadien von der vegetativen Zelle bis zur freien Spore darstellen zu können, wurden zunächst Vorversuche mit den Surrogat-Stämmen *B. anthracis* Sterne und *Bcbva* CAR-H durchgeführt. Dafür wurden die Stämme in Medium G angezogen und stündlich zwischen 2 h und 10 h Wachstum sowie nach 24 h Inkubationsdauer Präparate für Gram- und Raketefärbungen angefertigt (Daten nicht gezeigt). Anhand der Ergebnisse wurden acht Zeitpunkte für die Arbeiten im S3-Labor ausgewählt, bei denen die verschiedenen Entwicklungsstadien der Spore lichtmikroskopisch beobachtet werden konnten. Die Herstellung der Proben für die Elektronenmikroskopie erfolgte anschließend für den *B. anthracis* Dobichau und *Bcbva* CI sowie *Bcbva* CA-2 nach 2 h, 4 h bis 9 h und 24 h Wachstum in Medium G unter O₂-Bedingung, für die Sporulationsmutante *Bcbva* CI-12 nach 2 h und 24 h Inkubation (s. 2.4.6).

3.3.2.1 Bestimmung und Quantifizierung von Sporulationsstadien

Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen (s. 2.4.8) wurden für die Stämme *B. anthracis* Dobichau und *Bcbva* CI acht Entwicklungsstadien von der vegetativen Zelle bis zur freien Endospore definiert, die in der Abbildung 34 dargestellt sind. Die entsprechenden Beschreibungen zu den einzelnen Stadien sind der Tabelle 28 zu entnehmen.

Tabelle 28: definierte Sporulationsstadien in der Elektronenmikroskopie

Stadium	Beschreibung
1	vegetative Zelle
2	lytische Zelle
3	Zelle in Teilung
4	Beginn Engulfment
5	Engulfment abgeschlossen
6	Engulfment abgeschlossen und Beginn Sporendifferenzierung
7	differenzierte und intrazelluläre Spore
8	extrazelluläre Spore

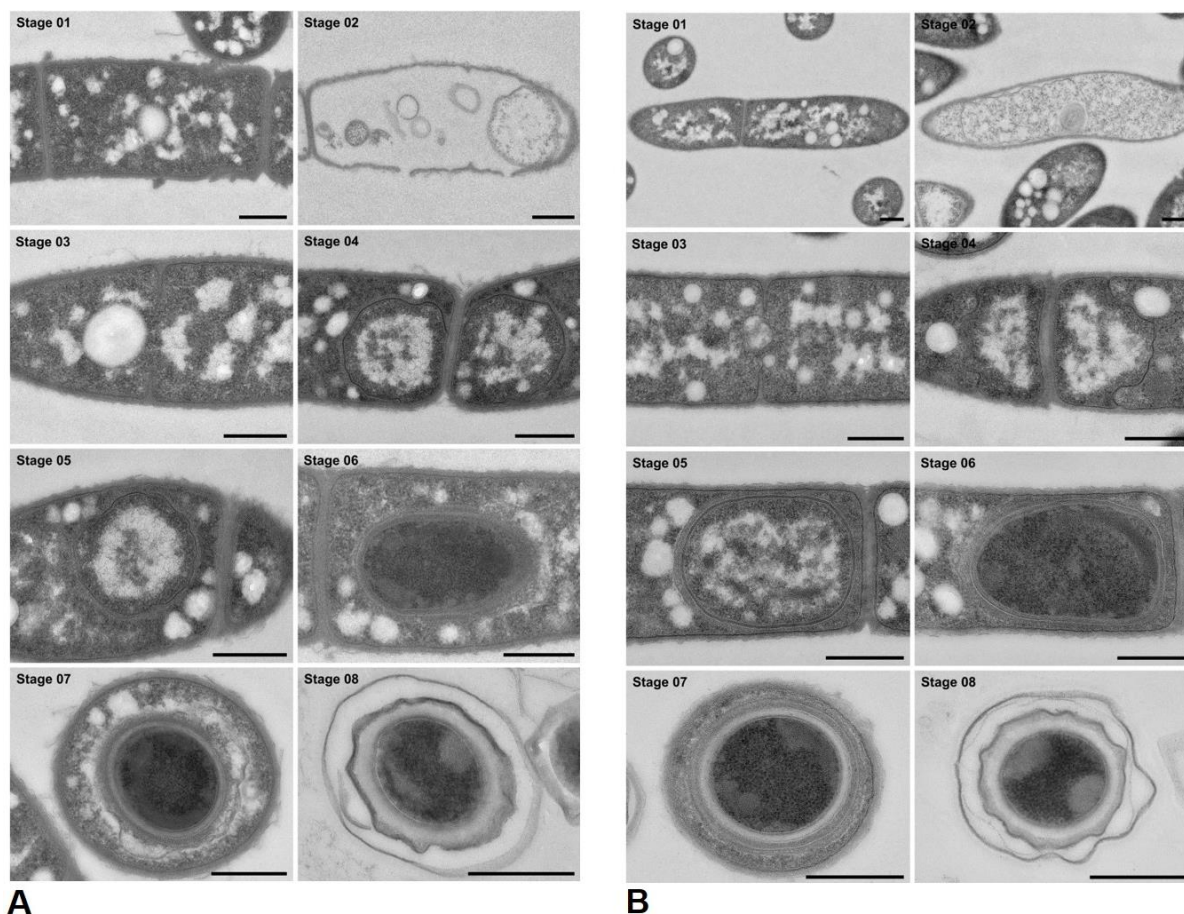


Abbildung 34: Sporulationsstadien von *B. anthracis* und *Bcbva* im Elektronenmikroskop

TEM-Aufnahmen der definierten Entwicklungsstadien während der Sporulation von *B. anthracis* Dobichau (A) und *Bcbva* CI (B). Das Wachstum der Bakterien erfolgte in Medium G, mit Probenahmen nach jeweils 2 h, 4 h – 9 h und 24 h Inkubation. Die repräsentativen Aufnahmen der Sporulationsstadien korrelieren nicht zwangsläufig mit den Probenahmezeitpunkten. Maßstabsbalken entsprechen 500 nm.

In den einzelnen Entwicklungsstadien der Sporulation waren morphologisch keine Unterschiede zwischen den Zellen von *B. anthracis* Dobichau und *Bcbva* CI zu beobachten (s. Abbildung 34 A und B).

Für eine quantitative Auswertung der Stadienhäufigkeit wurden repräsentative Stichproben an Präparaten und Dünnschnitten erzeugt und die Anzahl der Zellen, die sich in einem gleichen Entwicklungsstadium befanden, gezählt (s. Tabelle 48 und Tabelle 49 im Anhang). Eine Auflistung der prozentualen Anteile an Zellen im jeweiligen Stadium pro Zeitpunkt ist für *B. anthracis* Dobichau in der Tabelle 29 zu finden, für *Bcbva* CI sind die Ergebnisse in Tabelle 30 aufgeführt.

In beiden Stämmen nahm der Anteil an vegetativen Zellen (Stadium 1) mit der Wachstumsdauer ab, dominierte jedoch bei *B. anthracis* Dobichau vor allem zu den ersten drei Zeitpunkten (2 h, 4 h und 5 h) und bei *Bcbva* CI zu den ersten zwei Zeitpunkten (2 h und 4 h). Sowohl bei *B. anthracis* als auch bei *Bcbva* befand sich bereits nach 2 h und 4 h Wachstumdauer ein geringer Anteil an Zellen, zwischen 2,4 % und 6,8 %, in Stadium 3, was bei *B. anthracis* Dobichau sogar noch für den Referenzzeitpunkt t_0 (5 h) zutraf. Beim Vergleich

der beiden Zeitpunkte, die als Kalibrator für die relative Quantifizierung der Genexpression dienten, konnte kaum ein Unterschied in den Prozenten festgestellt werden. Jedoch ist zu beachten, dass beim *Bcbva* CI der Referenzzeitpunkt t_0 einer Wachstumsdauer von 4 h entsprach. Beim afrikanischen Stamm haben bereits nach 5-stündiger Inkubationsdauer (entspricht t_1) 4,8 % der Zellen mit dem Engulfment (Stadium 4) begonnen. Dieses Entwicklungsstadium trat bei *B. anthracis* Dobichau erst nach 6 h auf (entspricht t_1), allerdings lag der Anteil mit 34,1 % deutlich höher als bei *Bcbva* CI. Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt, der bei *B. anthracis* nach 7 h und bei *Bcbva* nach 6 h Wachstum definiert wurde, hatten rund 21 % bzw. 22 % der Zellen das Engulfment abgeschlossen (Stadium 5). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich beim klassischen *B. anthracis*-Vertreter parallel 12,9 % der Zellen im Stadium der Sporendifferenzierung, wohingegen beim *Bcbva*-Wildtypisolat jenes Stadium 6 erst 2,9 % der Zellen erreichten. Der Anteil stieg auf 12,6 % nach 7-stündiger Inkubationsdauer. Beim Betrachten der Ergebnisse für eine Wachstumsdauer von 8 h fiel auf, dass bei *B. anthracis* Dobichau der Anteil an Zellen im Entwicklungsstadium 5 und 6 gleich hoch war (23,5 %), während sich bei *Bcbva* CI fast doppelt so viele Zellen in der Sporendifferenzierung (22,4 %) als am Ende des Engulfments (12,9 %) befanden. Zum Zeitpunkt 9 h entsprach bei *B. anthracis* Dobichau der Anteil an Zellen in Stadium 6 fast dem Anteil an vegetativen Zellen und es konnten bereits 2,8 % differenzierte und intrazelluläre Sporen (Stadium 7) beobachtet werden. Bei *Bcbva* CI kam zum gleichen Zeitpunkt zu einem vergleichsweise geringeren Anteil an Stadium 6-Zellen als bei *B. anthracis* ein Anteil von 9,0 % sich in Stadium 7 befindenden Sporen hinzu. Nach einer Wachstumsdauer von 24 h lagen neben vegetativen Zellen 18,4 % extrazelluläre Sporen in der Probe von *B. anthracis* Dobichau vor, bei *Bcbva* CI handelte es sich um fast 57 % freie Sporen.

Interessanterweise trat bei *Bcbva* CI schon nach einer 5-stündigen Inkubationsdauer ein sehr hoher Anteil an lytischen Zellen (Stadium 2) auf. Im Vergleich zu *B. anthracis* Dobichau, bei dem nach 7 h 4 % an Zellen und nach 9 h gerade einmal doppelt so viele in Stadium 2 vorlagen, betrug der Anteil an lytischen Zellen beim afrikanischen Stamm zwischen den Zeitpunkten 6 h und 9 h 20 % bis knapp 26 %.

Im Allgemeinen konnte bei beiden Stämmen im zeitlichen Verlauf eine Zunahme an Zellen in den aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien der Sporenbildung festgestellt werden. Die Zellen von *Bcbva* schienen dabei schneller in die ersten Sporulationsstadien einzutreten als die von *B. anthracis*. Nach einer Wachstumsdauer von 7 h war diese Auffälligkeit nicht mehr vorherrschend und das Auftreten von Zellen, die sich im gleichen Stadium befanden, glich sich an. Die divergierenden Stadienhäufigkeiten spiegelten dennoch Unterschiede bei der Sporulation zwischen den beiden Spezies wider.

Tabelle 29: quantitative Auswertung der Stadienhäufigkeit für *B. anthracis* Dobichau

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen in dem jeweiligen Sporulationsstadium pro Zeitpunkt. Ermittelt anhand von repräsentativen Stichproben an elektronenmikroskopischen Präparaten und Dünnschnitten.

Dauer [h]	Stadium [%]							
	1	2	3	4	5	6	7	8
2	96,0	0,5	3,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
4	92,8	0,5	6,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5*	93,9	0,9	5,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6**	60,5	0,4	4,7	34,1	0,4	0,0	0,0	0,0
7***	53,5	4,1	2,8	5,1	21,7	12,9	0,0	0,0
8	43,0	5,7	2,2	1,7	23,5	23,5	0,4	0,0
9	39,8	8,1	1,6	0,0	8,1	39,4	2,8	0,0
24	80,9	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	18,4

* entspricht t₀; ** entspricht t₁; *** entspricht t₂

Tabelle 30: quantitative Auswertung der Stadienhäufigkeit für *Bcbva* CI

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen in dem jeweiligen Sporulationsstadium pro Zeitpunkt. Ermittelt anhand von repräsentativen Stichproben an elektronenmikroskopischen Präparaten und Dünnschnitten.

Dauer [h]	Stadium [%]							
	1	2	3	4	5	6	7	8
2	96,3	0,4	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4*	97,2	0,4	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5**	84,9	7,4	2,9	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0
6***	50,0	20,0	0,4	5,8	20,8	2,9	0,0	0,0
7	35,7	25,6	1,7	0,0	24,4	12,6	0,0	0,0
8	39,8	23,7	0,4	0,0	12,9	22,4	0,8	0,0
9	40,0	23,9	0,4	0,0	1,6	25,1	9,0	0,0
24	40,8	0,0	0,0	0,3	1,9	0,0	0,3	56,7

* entspricht t₀; ** entspricht t₁; *** entspricht t₂

Bei der Untersuchung der Mutanten *Bcbva* CI-12 und *Bcbva* CA-2 in der Elektronenmikroskopie wurde das erwartungsgemäße Ausbleiben der Sporenbildung bestätigt. Es konnten weder einzelne Entwicklungsstadien noch extrazelluläre Sporen beobachtet werden, weshalb im Folgenden repräsentative Aufnahmen der Zellen nach jeweils 2 h und 24 h Wachstumsdauer gezeigt werden (s. Abbildung 35).

Bei der *spoVG*-Mutante *Bcbva* CA-2 waren in den Präparaten der untersuchten Zeitpunkte (acht Zeitpunkte wie bei *B. anthracis* Dobichau und *Bcbva* CI) vegetative bzw. sich teilende Zellen zu sehen, die mit der Zeit lysierten, bis nach 24 h die meisten Bakterien extrahiert (= tot) vorlagen. Die *spo0A*-Mutante *Bcbva* CI-12 zeigte zum Zeitpunkt 2 h einige morphologisch veränderte Bakterien hinsichtlich ihrer Form (s. Abbildung 35 A), aber auch hier waren die

Bakterien nach 24-stündiger Wachstumsdauer ähnlich extrahiert wie die der anderen Sporulationsmutante.

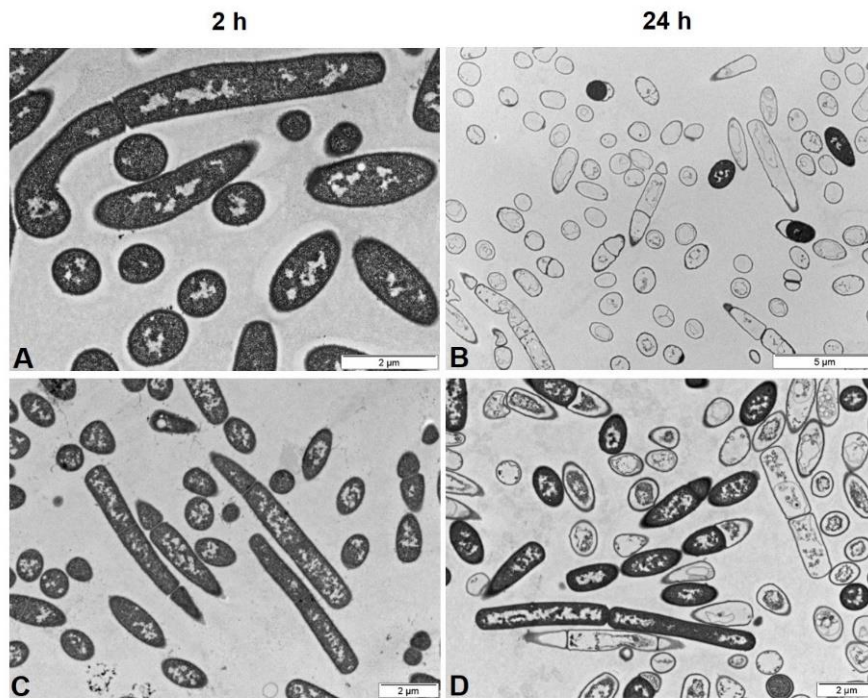


Abbildung 35: Untersuchung der Sporulationsmutanten im Elektronenmikroskop

Repräsentative TEM-Aufnahmen von *Bcbva* CI-12 (A und B) und *Bcbva* CA-2 (C und D) nach Anzucht in Medium G unter O₂-Bedingung für 2 bzw. 24 Stunden.

4 Diskussion

Bacillus cereus biovar *anthracis* ist ein neuartiger Erreger, der tödlich verlaufende Milzbrand-ähnliche Erkrankungen bei Menschenaffen und anderen Wildtieren in afrikanischen Regenwaldregionen verursacht [91, 92, 95]. Sowohl auf mikrobiologischer als auch molekularer Ebene weisen die Bakterien deutliche Unterschiede zum klassischen Milzbranderreger *B. anthracis* auf [62]. Die *Bcbva*-Isolate besitzen jedoch beide Virulenzplasmide von *B. anthracis* (Toxinplasmid pXO1 und Kapselplasmid pXO2) mit einer Identität von fast 100 % und können dadurch die Anthrax-Toxine und die Anthrax-Kapsel aus Polyglutaminsäure synthetisieren [93]. Allerdings unterscheidet sich das Chromosom eindeutig von dem der typischen und extrem monomorphen Spezies *B. anthracis* und ähnelt eher dem anderer Mitglieder der *B. cereus*-Gruppe. In Tierversuchen wiesen *B. anthracis* und *Bcbva* eine ähnliche Virulenz auf, ein Unterschied ergab sich aber aufgrund der Fähigkeit von *Bcbva* zur Synthese einer zweiten Kapsel aus Hyaluronsäure [97]. Sowohl bei *Bcbva* als auch bei *B. anthracis* wird die Genregulation durch ein funktionelles AtxA-Regulon bestimmt [97], aber in Vorversuchen wurden bereits Unterschiede bei der Regulation einiger chromosomaler Gene, u. a. für S-Layer-Proteine und Sporulation, gezeigt. Für Seroprävalenz-Studien in der Elfenbeinküste wurde das Antigen pXO2-60 eingesetzt, da es nur von *Bcbva*, aber aufgrund einer Mutation in der Sequenz des Signalpeptids nicht von *B. anthracis* gebildet wird. Dadurch stellt es einen geeigneten Antigenmarker zur Unterscheidung von *B. anthracis*- und *Bcbva*-Infektionen dar [103, 106].

In der vorliegenden Arbeit sollten die neuartigen *Bcbva*-Ursprungs isolate anhand von drei verschiedenen Analyseverfahren unter wirtsähnlichen- (Anwesenheit von Natriumbikarbonat und CO₂) bzw. Sporulationsbedingungen mit Stämmen des klassischen *B. anthracis* verglichen werden. Für die Untersuchung der globalen Genexpression und zur Erfassung des gesamten Transkriptoms wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Die Analyse des Proteoms mit dem Fokus auf den sekretierten Proteinen der *Bcbva*-Stämme sollte zur Identifizierung weiterer *Bcbva*-spezifischer Proteine führen, die neben pXO2-60 als potentielle Antigene fungieren könnten. Schließlich sollten vergleichende Expressionsanalysen Einblicke in die Kinetik der Expression und Regulation ausgewählter Sporulationsgene sowohl bei Wildtypisolaten als auch bei Sporulationsmutanten von *B. anthracis* und *Bcbva* gewähren.

Es wird davon ausgegangen, dass die Unterschiede innerhalb von Vertretern der *B. cereus*-Gruppe (u.a. *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*), die besonders bei der Ökologie und Pathogenität auftreten, nicht nur auf der unterschiedlichen Genomsequenz beruhen, sondern zu einem großen Teil auch auf der unterschiedlichen Genregulation. Die gewonnenen Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit sollen zur Aufklärung dieser Unterschiede beitragen, da die *Bcbva*-Stämme taxonomisch gesehen an der Grenze zwischen *B. anthracis* und *B. cereus* / *B. thuringiensis* eingruppiert werden können.

4.1 Transkriptomanalyse

4.1.1 Experimentelles Design der RNA-Sequenzierung

Die ersten Veröffentlichungen, die den Begriff RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) prägten, erschienen im Jahr 2008 [167-170]. Die Methode ist im letzten Jahrzehnt aufgrund sinkender Kosten und der Popularisierung von gemeinsam genutzten Sequenzier-Ressourcen an vielen Forschungseinrichtungen immer häufiger eingesetzt worden. Mithilfe der RNA-Seq Technologie kann anhand der Hochdurchsatz-Sequenzierung das gesamte Profil des Transkriptoms erstellt werden. Das Transkriptom ist der vollständige Satz aller zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle transkribierten Gene für ein bestimmtes Entwicklungsstadium oder einen physiologischen Zustand. Das Verständnis des Transkriptoms ist wesentlich für die Interpretation der funktionellen Elemente des Genoms und für die Aufklärung der molekularen Bestandteile von Zellen und Geweben, aber auch für das Verständnis von Krankheiten und evolutionären Prozessen.

Der Einsatz von RNA-Sequenzierung zur Transkriptomanalyse und -charakterisierung findet sowohl in Eu- als auch in Prokaryoten insbesondere seit jüngster Zeit Anwendung und wurde ebenfalls bereits für *B. anthracis* beschrieben [171-177]. Voruntersuchungen an *Bcbva*-Stämmen deuten darauf hin, dass sich die Genregulation, insbesondere das Zusammenwirken plasmidaler und chromosomaler Regulons, von der Regulation beim typischen *B. anthracis* unterscheidet. Erste Expressionsanalysen erfolgten mittels qRT-PCR, konnten die bestehenden Unterschiede aber nur zu einem geringen Teil erklären. Aufgrunddessen sollte in der vorliegenden Arbeit eine weitergehende und vollständige Untersuchung des gesamten Transkriptoms mittels RNA-Seq durchgeführt werden. Die vergleichende Transkriptomanalyse des klassischen *B. anthracis* mit dem neuartigen Erreger *Bcbva* nach Anzucht unter zwei verschiedenen Wachstumsbedingungen unter Anwendung einer erst kürzlich etablierten Methode stellt außerdem eine interessante Neuheit innerhalb dieses Forschungsgebietes dar. Die Durchführung einer Transkriptomanalyse ist sehr komplex, weshalb es zwingend notwendig war, ein verlässliches experimentelles Design für die RNA-Präparation, die Herstellung der cDNA-Bibliotheken, die Sequenzierung und die Datenanalyse bereitzustellen. Von Bedeutung ist die Tatsache, dass die RNA-Sequenzierung das Next Generation Sequencing (NGS) nutzt, um die Anzahl und Anwesenheit von RNA-Transkripten in einer Probe zum Zeitpunkt der Untersuchung nachzuweisen. Das bedeutet, dass die Auswahl des Zeitpunktes der RNA-Extraktion entscheidend war, da das Transkriptom nur zu diesem Augenblick erfasst werden kann und sich schlussendlich die Ergebnisse auf diesen einen sehr spezifischen Zeitpunkt in der Wachstumsphase der Bakterien beziehen. Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, sollte die Extraktion der RNA zum Ende der exponentiellen und Anfang der stationären Phase nach Kultivierung der Stämme in O₂- bzw. CO₂-Bedingung

erfolgen, da die Expression bekannter Virulenzfaktoren (Toxin- und Kapselgene) unter wirtsähnlichen Bedingungen zu diesem Zeitpunkt am höchsten ist [59, 151, 152]. Mit dem Ziel, neben einem umfassenden globalen Überblick zur Genregulation weitere Einblicke in das Pathogenitätsgeschehen von *Bcbva* zu erlangen, war die Wahl dieses Untersuchungszeitpunktes ausschlaggebend. Zusätzlich sollte der mRNA-Gehalt in der Zelle maximal sein sowie das Wachstumsverhalten der verschiedenen Bakterienstämme in den zwei Kultivierungsbedingungen weitestgehend synchron verlaufen, um eine ähnliche Zellzahl und einen ähnlichen metabolischen Zustand zu gewährleisten. Anhand der aufgezeichneten Wachstumskurven (s. Abbildung 15, S.69) konnten beim Untersuchungszeitpunkt nach 4,5 h Inkubationsdauer, der bei allen Stämmen den Übergang von der späten exponentiellen in die beginnende stationäre Phase markierte, ähnliche Zelldichten über die Messung der OD₆₀₀ zwischen den gewählten Kultivierungsbedingungen festgestellt werden. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass es nicht zu verfälschten Ergebnissen aufgrund unterschiedlicher Wachstumskinetiken und daraus resultierend unterschiedlicher Ausbeuten an mRNA aufgrund verschiedener Zelldichten kommt. Die Hochregulation in CO₂-Atmosphäre des Toxingens *pagA* und des Kapselgens *capB* sowie des *pXO2-60* Gens für das *Bcbva*-spezifische Antigen, deren Expressionen über den CO₂/Natriumbikarbonat-abhängigen Regulator AtxA kontrolliert werden, konnte in der Real-Time PCR bestätigt werden (s. Abbildung 17, S. 73) und verifizierte den ausgewählten Untersuchungszeitpunkt für die RNA-Sequenzierung als geeigneten Zeitpunkt zur Klärung der offenen Fragestellung bzgl. Genregulation und Pathogenitätsmechanismen.

Die vergleichende Transkriptomanalyse wurde mit den zwei *Bcbva*-Ursprungsisolaten CI und CA sowie mit zwei *B. anthracis*-Stämmen durchgeführt, wobei die Wahl neben *B. anthracis* Vollum auf das Wildtypisolat *B. anthracis* 14RA5914 Dobichau fiel, das 2014 nach einem Milzbrandausbruch in einer Viehherde aus der Milz einer Kuh isoliert wurde [131]. Da es sich bei *B. anthracis* Vollum um einen weit verbreiteten Laborstamm handelt und es bekanntermaßen zu physiologischen Anpassungen dieser Stämme an die günstigen Laborbedingungen bzgl. des Wachstums- und Sporulationsverhaltens kommt [178, 179], sollten durch die Untersuchung des *B. anthracis* Dobichau detektierte veränderte, d.h. adaptierte, Regulationsmechanismen ausgeglichen werden, die aufgrund der Verwendung eines Laborstammes zu Fehlinterpretationen der Daten geführt hätten. Erwähnenswert ist in diesem Kontext, dass in der vorliegenden Arbeit für die Aufzeichnung der Wachstumskurve ein schlechtes Wachstum der Vorkultur von *B. anthracis* Vollum auftrat. Folglich erreichte die angeimpfte Hauptkultur nicht die angestrebte Start-OD von 0,2 – 0,3, wodurch die gemessenen Zelldichten in der lag- und exponentiellen Phase niedriger als die der anderen untersuchten Bakterienstämme waren, sich aber zum RNA-Extraktionszeitpunkt angeglichen hatten (s. Abbildung 15 A, S. 69).

Für den Erfolg eines RNA-Sequenzierungsexperimentes ist eine ausreichend hohe Quantität und eine besonders gute Qualität der isolierten RNA entscheidend. Dafür bedarf es eines Extraktionsprotokolls, mit dem mRNA aus bakteriellen Kulturen möglichst rein und in ausreichender Menge extrahiert werden kann. Während eukaryotische mRNA mit kommerziellen Kits selektiv nach einfachen Protokollen über spezielle Bindungssäulen isoliert werden kann, ist dies bei Prokaryoten allerdings nicht möglich. Eukaryotische mRNA besitzt am 3'-Ende einen Anhang aus mehreren Adeninbasen, die durch Polyadenylierung nach der Transkription angehängt werden. Dieser sog. Poly-A-Schwanz wird in mRNA-Aufreinigungskits dafür verwendet, die nur in sehr geringen Mengen vorhandene mRNA aus der zuvor aufbereiteten Präparation von Gesamt-RNA durch Bindungsmatrizes zu isolieren. Nach dem Entfernen der ribosomalen RNA kann anschließend die mRNA isoliert gewonnen werden. Die Extraktion von mRNA aus Prokaryoten wird jedoch dadurch erschwert, dass dort der Poly-A-Schwanz fehlt. Für eine Anreicherung der mRNA durch das Entfernen von rRNA aus Prokaryoten existieren allerdings nur wenige Methoden, die zusätzlich mit sehr hohem Aufwand und hohen Kosten verbunden sind [180] oder nur für die Anwendung bestimmter Prokaryoten geeignet sind [181]. Bei *Bacillus* wird die Extraktion der mRNA zusätzlich dadurch erschwert, dass die Bakterien durch ihre Gram-positive Zellwand Lysepuffern gegenüber äußerst beständig sind. Hinzu kommt die generell geringe Stabilität bakterieller mRNA, die nur eine ungefähre Halbwertszeit von wenigen bis 20 min besitzt [153]. All diese Faktoren führen dazu, dass eine effektive mRNA-Extraktion sehr schwierig ist. In der vorliegenden Arbeit wurde ein in der Arbeitsgruppe von ZBS 2 etabliertes RNA-Extraktionsprotokoll bestehend aus einer Kombination aus denaturierendem Lysepuffer, Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung und Aufreinigung der Gesamt-RNA über kommerzielle Bindungssäulen verwendet, das für die gefahrlose Anwendung in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 entwickelt wurde. Für die Methode der RNA-Sequenzierung musste jedoch die Menge an aufzureinigender Bakterienkultur angepasst werden, um ausreichend hohe RNA-Konzentrationen für die nachfolgenden Arbeitsschritte zu erzielen. Die fluorometrische Quantifizierung der RNA mittels Qubit erfolgte vor der DNase-Behandlung, wobei anhand der Messung keinerlei Aussage über den mRNA-Gehalt in den jeweiligen Proben getroffen werden kann. Die erhaltenen Konzentrationen an Gesamt-RNA schwankten zwischen den Stämmen und Wachstumsbedingungen recht stark (s. Anhang Tabelle 36, S. 179). Die Ursache hierfür liegt vermutlich an dem hohen Anteil an rRNA im Eluat, der 80 % der zellulären RNA bei Prokaryoten ausmacht [153]. Der mRNA-Bestandteil in den Präparationen wird konstant gering sein und kaum von den unterschiedlich großen Mengen an Gesamt-RNA beeinflusst werden. Es ist anzunehmen, dass je nach Effizienz der Aufspaltung der vegetativen Zellen der Gehalt an Gesamt-RNA deutlich stärker schwankt als der der mRNA. Es wurde die identische Menge an Gesamt-RNA (2 µg je Probe) in den nachfolgenden Behandlungsschritt mit DNase

eingesetzt. Die Proben wurden danach stets auf DNA-Reste getestet, indem sie als Template in der Real-Time PCR für den Nachweis von *rpoB* und *pagA* eingesetzt wurden. Erst wenn in beiden Reaktionen kein Amplifikationssignal nachweisbar war, galt die RNA-Präparation als frei von DNA und wurde weiterverwendet. Die anschließende Quantifizierung ergab konstante RNA-Konzentrationen zwischen den untersuchten Bakterienstämmen und Wachstumsbedingungen (s. Anhang Tabelle 37, S. 179), sodass wiederum ähnliche Mengen an DNase-behandelter Gesamt-RNA in den rRNA-Abreicherungs-schritt eingesetzt werden konnten. Um die Handhabung der instabilen RNA auf möglichst wenige Arbeitsschritte zu beschränken, wurde darauf verzichtet, die RNA-Konzentration nach der Depletion der rRNA nochmals im Qubit zu messen. Hier wurde der Erfolg der Behandlung anhand des Bioanalyzers bzw. Fragment Analyzers überprüft, mit Hilfe derer bereits die Qualität der RNA-Proben nach der DNase-Behandlung als sehr gut eingestuft werden konnte (s. Tabelle 16, S. 71).

Ein weiterer wichtiger Parameter für das Design eines effizienten und optimalen RNA-Seq Experiments ist die Entscheidung über die Anzahl an biologischen Replikaten [182]. Zhang *et al.* beobachtete, dass die Anzahl der detektierten differentiell exprimierten Gene kontinuierlich anstieg, wenn die Anzahl der Replikate erhöht wurde [183]. Mindestens drei biologische Replikate pro Bedingung werden empfohlen, um Genexpressionsunterschiede basierend auf einer statistischen Analyse zu erkennen [184, 185]. Um eine statistisch relevante Auswertung der RNA-Seq Daten zu gewährleisten, jedoch unter Berücksichtigung der Limitierung bzgl. des Arbeitens mit großen, hochinfektiösen Kulturvolumina in einem S3-Labor, wurden pro Stamm und Wachstumsbedingung drei biologische Replikate hergestellt und untersucht. Auf technische Replikate wurde verzichtet, da für RNA-Seq Studien bereits beschrieben wurde, dass die Reproduzierbarkeit dieser in der Regel besonders hoch ist [169, 184]. Es konnte gezeigt werden, dass die biologischen Replikate eines jeden untersuchten Stammes pro Kultivierungsbedingung in der Hauptkomponentenanalyse ein nahe beieinanderliegendes Cluster formten (s. Abbildung 18, S. 75). Dennoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass sich alle Bakterien in den drei biologischen Replikaten zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion immer in identischen Wachstumsphasen befanden, auch wenn die über die OD₆₀₀ gemessenen Zelldichten ähnlichen waren (s. Anhang Tabelle 35, S. 179). Ein wichtiger Schritt bei der RNA-Sequenzierung ist das Alignment der RNA-Reads an das entsprechende Referenzgenom. Einerseits dient dies der Informationsgewinnung zur Herkunft des Transkripts und andererseits kann eine Aussage über dessen Häufigkeit durch die Anzahl an zugeordneten RNA-Reads pro Genmerkmal getroffen werden. Voraussetzung dafür ist eine qualitativ hochwertige Gesamtgenomsequenz inklusive Annotation des zu untersuchenden Stammes. Von den beiden *B. anthracis*-Stämmen Vollum und Dobichau sowie vom Stamm *Bcbva* CI waren annotierte Genome aus der NCBI Datenbank verfügbar. Die Annotation des

Genoms vom Stamm *Bcbva* CA wurde mit den bereits vorhandenen Illumina- und Minlon-Sequenzen im Rahmen dieser Studie durchgeführt (noch nicht publiziert).

Zusammenfassend bot die Auswahl des Untersuchungszeitpunktes und der Zielstämme, die hohe Qualität und Quantität der verwendeten RNA, die Reproduzierbarkeit der biologischen Replikate in der RNA-Seq Analyse und die qualitativ hochwertig annotierten Referenzgenome der untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämme eine verlässliche Datengrundlage für die in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptomanalyse, die die Voraussetzung schaffte, die gesetzten Ziele und Fragestellungen zur Genregulation im Vergleich zwischen *Bcbva* und klassischem *B. anthracis* näher zu beleuchten und aufzuklären.

4.1.2 Differentielle Genexpressionsanalyse

Ein wichtiges Anwendungsgebiet der RNA-Sequenzierung ist die vergleichende Analyse von Genexpressionslevels zwischen zwei oder mehreren Bedingungen wie verschiedenen Spezies, Kultivierungsbedingungen, Behandlungen, Lebensstadien, Geweben, Geschlechtern uvm. [186]. Die Methode der RNA-Seq ermöglicht die Bestimmung der Expression spezifischer Gene in jedem Gewebe zu jeder Zeit, auch in Nicht-Modellorganismen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA-Sequenzierung für eine globale Expressionsanalyse bei *B. anthracis* und *Bcbva* verwendet, um differentiell regulierte Gene zwischen den beiden Spezies in der wirtsähnlichen Bedingung (CO₂-Bedingung) im Vergleich zur Umgebungsbedingung (O₂-Bedingung) zu identifizieren. Dadurch sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem klassischen und neuartigen Milzbranderreger hinsichtlich der Genexpression bzw. -regulation und Pathogenitätsmechanismen aufgedeckt werden. Es gibt bereits zahlreiche weitere Studien, bei denen eine umfassende Genexpressionsanalyse inklusive der Identifizierung differentiell regulierter Gene unter verschiedenen Bedingungen bei *B. anthracis* durchgeführt wurde. Unter anderem erfassten Bergman *et al.* das Transkriptom-Profil der Bakterien während der Infektion von Wirtsmakrophagen [140], Pohl *et al.* führte eine umfassende Transkriptom- und Proteomanalyse bei *B. anthracis* als Reaktion auf oxidativen Stress durch [187], Carlson *et al.* untersuchten die globale Genexpression des Milzbranderreger während des Wachstums in Rinderblut [188] und Sharma *et al.* befassten sich mit dem Einfluss der Überexpression von Protektivem Antigen auf die transkriptionelle Aktivität bei *B. anthracis* [189]. Desweiteren wurde in zwei Studien der Einfluss von Temperatur, Natriumbikarbonat/CO₂ und Glucose auf die Genexpression zum Einen mittels Microarray-Analyse [190] und zum Anderen mittels RNA-Sequenzierung mit dem Fokus auf CodY-regulierte Gene [173] getestet. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse aus der vorliegenden Transkriptomanalyse mit den publizierten Daten ist allerdings problematisch und nur bedingt möglich, da sich die experimentellen Designs in manchen Fällen stark voneinander unterscheiden. Es gibt jedoch drei Publikationen, von Passalacqua *et al.* (2009),

McKenzie *et al.* (2014) und Raynor *et al.* (2018), die vergleichbare experimentelle Bedingungen für ihre differentiellen Genexpressionsanalysen ausgewählt haben [69, 172, 176]. Das Ziel der Untersuchungen lag in der Identifizierung differentiell exprimierter Gene beim Vergleich von CO₂- und O₂-Bedingung (Passalacqua *et al.* und McKenzie *et al.*), in der Erfassung des Einflusses des Regulators AtxA auf die Genexpression (McKenzie *et al.* und Raynor *et al.*) sowie auf dem Vergleich von *B. anthracis* mit anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe (Passalacqua *et al.*). In der vorliegenden Transkriptomanalyse wurden ebenfalls die zwei Wachstumsbedingungen, CO₂ und O₂, miteinander verglichen, wobei der Fokus auf die erstgenannte Kultivierungsbedingung gelegt wurde. Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass das Wachstum von *B. anthracis* in Gegenwart von erhöhtem CO₂ und Natriumbikarbonat (5 % CO₂ und 0,8 % NaHCO₃) die Ausbeute an Toxin und Kapselproduktion unter dem Einfluss des globalen Regulators der Genexpression AtxA erhöht [64, 75, 191]. Die CO₂-Stimulation von bakteriellen Virulenzfaktoren ist nicht ungewöhnlich [192]. Beispiele dafür sind das Toxic Shock Syndrome Toxin 1 von *Staphylococcus aureus* [193], das Toxin von *Vibrio cholerae* 01 [194] und der Mga-Virulenzregulator von Streptokokken der Gruppe A (*Streptococcus pyogenes*) [195, 196]. Es wird davon ausgegangen, dass das Wachstum unter erhöhten CO₂-Bikarbonat-Bedingungen die Umgebung des Säugetierwirts nachahmt. Daher sind Experimente, die unter diesen Bedingungen durchgeführt werden, wahrscheinlich von größerer physiologischer Bedeutung [74]. Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit, ähnlich wie bei Passalacqua *et al.* [69], verschiedene Vertreter der *B. cereus*-Gruppe (*B. anthracis* und *Bcbva*) miteinander verglichen. Eine direkte Gegenüberstellung der drei erwähnten Genexpressionsstudien mit der vorliegenden Transkriptomanalyse ist in Tabelle 31 aufgeführt. Natürlich fallen auch hier Unterschiede im experimentellen Design auf, die bei einem Vergleich der Daten in den nachfolgenden Kapiteln als Limitation bzgl. der Aussagekraft zu berücksichtigen sind. Es wurden bei allen Studien unterschiedliche Anzuchtmedien verwendet und die RNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Wachstum der Bakterien isoliert. Folglich befanden sich die Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen, sodass das Zellgeschehen auf transkriptioneller Ebene zu verschiedenen Zeitpunkten erfasst wurde. Es ist jedoch bekannt, dass die Genregulation Wachstumsphasen-abhängig ist [59, 197]. Zusätzlich differiert die Anzahl der verwendeten biologischen Replikate, was, wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben, einen Einfluss auf die Datenauswertung und die Detektion von differentiell exprimierten Genen (DEG's) hat. Passalacqua *et al.* verwendeten noch die Microarray-Methode, während die vorliegende und die zwei anderen publizierten Studien die RNA-Sequenzierung anwandten (s. 1.7). Die bestehenden Unterschiede verdeutlichen auf der anderen Seite aber auch, dass die in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptomanalyse mit den verwendeten Stämmen und unter den gewählten Bedingungen in diesem Forschungsgebiet so noch nicht durchgeführt wurde.

Tabelle 31: Vergleich der experimentellen Designs von drei publizierten Genexpressionsstudien an *B. anthracis* (und *B. cereus*) mit der vorliegenden Transkriptomanalyse

Methode	untersuchte Stämme	Anzuchtmedium / Bedingung	Zeitpunkt der RNA-Extraktion	biologische Replikate	Untersuchungsziel
vorliegende Studie					
RNA-Seq	<i>Ba</i> Vollum und <i>Ba</i> Dobichau (pXO1 ⁺ , pXO2 ⁺), <i>Bcbva</i> Cl und <i>Bcbva</i> CA (pBCXO1 ⁺ , pBCXO2 ⁺)	BHI-Medium / O ₂ und CO ₂ (0,8 % NaHCO ₃ und 5 % CO ₂)	Ende exponentielle und Anfang stationäre Phase (OD ₆₀₀ 2,5 – 2,9)	drei	vergleichende differentielle Genexpressionsanalyse zwischen <i>Ba</i> und <i>Bcbva</i> unter O ₂ - vs. CO ₂ -Bedingung
Passalacqua et al., 2009					
Microarray	<i>Ba</i> Sterne (pXO1 ⁺ , pXO2 ⁻), <i>B. cereus</i> G9241 (pBCXO1 ⁺), <i>B. cereus</i> 10987	Modified G Medium / O ₂ und CO ₂ (0,8 % NaHCO ₃ und 15 % CO ₂)	mittlere exponentielle Phase (OD ₆₀₀ 0,4 – 0,5)	vier	vergleichende differentielle Genexpressionsanalyse der drei Stämme unter O ₂ - vs. CO ₂ -Bedingung
McKenzie et al., 2014					
RNA-Seq	<i>Ba</i> Ames 35 (pXO1 ⁺ , pXO2 ⁻), <i>Ba</i> Ames 35 Δ atxA	NBY-Medium / O ₂ und CO ₂ (0,8 % NaHCO ₃ und 15 % CO ₂)	mittlere bis späte exponentielle Phase (OD ₆₀₀ ca. 2,0)	zwei	Vergleich von RNA-Expressionsprofilen zwischen Wildtyp- und Δ atxA-Stamm unter O ₂ - vs. CO ₂ -Bedingung
Raynor et al., 2018					
RNA-Seq	<i>Ba</i> Ames (pXO1 ⁺ , pXO2 ⁺), <i>Ba</i> Ames atxAacpAacpB-null mutant (IPTG-induzierbare PCVR's*)	Casamino acid Medium/ CO ₂ (0,8 % NaHCO ₃ und 5 % CO ₂)	frühe stationäre Phase (OD ₆₀₀ 1,2 – 1,7)	drei	Expressionsanalysen zur Regulatoraktivität von AtxA, AcpA und AcpB (PCVR's in <i>B. anthracis</i>) unter CO ₂ -Bedingung

* Phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase regulation Domain-Containing Virulence Regulators

4.1.2.1 Anzahl und Verteilung differentiell exprimierter Gene zwischen den untersuchten Stämmen und auf genetischen Elementen

Für den Stamm *B. anthracis* Vollum wurde der geringste Gesamtanteil an DEG's mit 35 % in Anbetracht der Gesamtanzahl an kodierenden Sequenzen des kompletten Genoms ermittelt. Der *Bcbva* CA hingegen wies den größten Anteil an differentiell exprimierten Genen mit rund 66 % auf. Die Stämme *B. anthracis* Dobichau und *Bcbva* CI rangierten anteilmäßig zwischen den beiden anderen Stämmen (58 % bzw. 50 %), lagen aber mit dem Prozentsatz eher beim *Bcbva* CA (s. Tabelle 17, S. 76). In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei *B. anthracis* Dobichau, *Bcbva* CI und *Bcbva* CA um Wildtypisolate handelt, die nicht jahrelang unter Laborbedingungen passagiert wurden, wie der üblicherweise verwendete Stamm *B. anthracis* Vollum, sind die unterschiedlich detektierten Gesamtanzahlen an DEG's in der CO₂-Bedingung möglicherweise nicht überraschend. Bei den weiteren Analysen der identifizierten differentiell regulierten Gene wurden nur noch jene betrachtet, die unter den gesetzten log₂FC-Cutoff $\geq + 2$ bzw. $\leq - 2$ fielen. Dabei glichen sich die Anzahlen an DEG's bei den beiden *B. anthracis*-Stämmen und dem *Bcbva* CI an (zwischen 10 % – 14 %), aber auch hier war für den *Bcbva* CA mit 25 % der größte Anteil zu verzeichnen (s. Tabelle 17, S. 76). Die Aufteilung in hoch- bzw. herunterregulierte Gene bei Wachstum in CO₂-Atmosphäre konnte wiederum bei allen untersuchten Stämmen zu fast gleichen Anteilen festgestellt werden (s. Tabelle 18, S. 78). Dahingehend war kein Unterschied in den Transkriptom-Profilen der *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämme feststellbar. Bei Betrachtung der stammspezifischen Verteilung der DEG's fiel jedoch besonders der zahlenmäßig große Anteil an explizit im *Bcbva* CA hochregulierten Genen (352) und herunterregulierten Genen (379), vor allem im Vergleich zum *Bcbva* CI (97 hoch- und 72 herunterregulierte Gene), auf (s. Abbildung 20, S. 79). Dieser gravierende Unterschied deutet darauf hin, dass die beiden *Bcbva*-Isolate unter wirtsähnlichen Bedingungen einer deutlich unterschiedlichen Genregulation und -expression zu unterliegen scheinen. Diese Beobachtung liefert eine interessante Grundlage für weiterführende Untersuchungen mit einer höheren Anzahl an *Bcbva*-Isolaten von der Elfenbeinküste (CI) und aus Kamerun (CA), um die aus der vorliegenden Analyse erhaltenen Daten gegebenenfalls zu reproduzieren und damit zu verifizieren.

Im Gegensatz zu den *Bcbva*-Isolaten zeigte sich zwischen den beiden *B. anthracis*-Vertretern kein deutlicher Unterschied in der Anzahl an differentiell hoch- und herunterregulierten Genen. Ein weiteres interessantes Ergebnis war allerdings die unter CO₂-Bedingung vorkommende höhere Anzahl an spezifisch bei den beiden *Bcbva*-Isolaten hochregulierten Genen (41) zu der vergleichsweise geringeren Genanzahl, die explizit bei den beiden *B. anthracis*-Stämmen (6) detektiert wurde. Dies könnte einerseits darauf hindeuten, dass es bei *Bcbva* auch schon eine lange gemeinsame Evolution von Chromosom und Plasmiden gibt, so wie es bei *B. anthracis*

der Fall ist [74]. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass manche Gene aufgrund der „DNA-Topologie“ ihrer Promotor-Region bereits prädestiniert dafür sind, über AtxA unter wirtsähnlichen Bedingungen reguliert zu werden [63]. Ein Transfer der gesamten „Regulations-Maschinerie“ mit *atxA* und weiteren (bisher vielleicht noch gar nicht bekannten) Genen in einen *B. cereus*-Stamm und folglich Überprüfung, ob sich daraufhin eine Änderung in der Genregulation einstellt, könnte der Überprüfung dieser Theorien dienen.

Bei Betrachtung der Verteilung der DEG's auf das Chromosom und die Plasmide stach die hohe Anzahl an hochregulierten pXO2-Genen bei fast allen untersuchten Stämmen (Ausnahme *Bcbva* CI) heraus (s. Tabelle 18 und Abbildung 19, S. 78). In der Literatur wurden bisherige Transkriptomstudien fast ausschließlich mit attenuierten Stämmen ohne pXO2 durchgeführt, wodurch die Hochregulation dieser Plasmidgene bisher nicht festgestellt werden konnte. Eine Ausnahme stellt die Analyse von Raynor *et al.* dar, die einen voll virulenten *B. anthracis*-Stamm untersuchten und ebenfalls Transkripte für 110 Gene auf pXO2 nachweisen konnten, von denen 21 um das Vierfache oder mehr durch mindestens einen der drei PCVR's (*AtxA*, *AcpA* oder *AcpB*) reguliert wurden [176]. Da sowohl die Toxin- als auch Kapselgene auf den beiden Plasmiden pXO1 und pXO2 lokalisiert sind, war das Ergebnis, dass in allen Stämmen die Plasmidgene unter CO₂-Bedingung vermehrt hoch- anstatt herunterreguliert wurden, nicht überraschend. Dennoch stach auch hier der *Bcbva* CA als einziger Stamm heraus, bei dem sieben pXO1-Gene um das mindestens Vierfache herunterreguliert wurden, während bei den anderen Isolaten kein einziges Gen dieses Plasmids eine Expressionsminderung unter CO₂ aufwies. Interessanterweise wurde bei *Bcbva* CI ein Gen auf dem nur in diesem Stamm vorkommenden und noch nicht näher charakterisierten Plasmid pCI-14 herunterreguliert, das als hypothetisches Protein annotiert ist. Eine genauere Betrachtung der einzelnen Plasmidgene sollte zukünftig in weiteren Untersuchungen erfolgen, um dahingehend spezifischere Informationen zu erlangen.

Insgesamt lassen die Ergebnisse aus der Analyse über die Aufteilung der differentiell exprimierten Gene die Aussage zu, dass sich die *Bcbva*-Isolate auf transkriptioneller und regulatorischer Ebene voneinander unterscheiden. Allgemein ist auffällig, dass sich das Transkriptom-Profil vom *Bcbva* CA von dem der anderen drei Stämme abgrenzen lässt und eine nähere Betrachtung sinnvoll wäre, um auch innerhalb der *Bcbva*-Spezies mögliche Divergenzen und Anpassungen an wirtsähnliche Bedingungen aufzudecken.

4.1.2.2 Genexpression bekannter Virulenzfaktoren unter CO₂-Bedingung

Die nähere Betrachtung der differentiell regulierten Gene fokussierte sich im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit auf bestimmte Gensets, wobei zunächst hochregulierte Gene unter CO₂-Bedingung begutachtet wurden (s. 3.1.6.4). Zuerst erfolgte die Auflistung der 24 DEG's mit einem log₂FC-Cutoff $\geq + 2$, die sowohl in den beiden untersuchten *B. anthracis*- als auch

Bcbva-Stämmen hochreguliert wurden (s. Tabelle 19, S. 83). Dabei wurden ausschließlich homologe Gene zwischen den Spezies mit einer Nukleotidübereinstimmung von mindestens 80 % einbezogen.

Hierbei zeigte sich, dass insgesamt eine größere Anzahl an Plasmidgenen als chromosomaler Gene hochreguliert wurde. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da unter wirtsähnlichen Bedingungen Virulenzgene wie Toxin- und Kapselgene, die auf pXO1 und pXO2 lokalisiert sind, exprimiert werden. In der Tat konnten sowohl Gene des Kapseloperons mit Expressionsanstiegen um das 7- bis 545-fache als auch das *pagA*-Gen für das Protektive Antigen mit einer 6- bis 33-fachen Steigerung als differentiell reguliert identifiziert werden. Zu den in der vorliegenden Transkriptomanalyse unter CO₂-Bedingung hochregulierten Genen gehörte ebenfalls das *pXO2-60/pXO2-61*-Operon. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Sekretion des *Bcbva*-spezifischen Antigens pXO2-60 nur nach Wachstum in CO₂-Atmosphäre und nicht unter Umgebungsbedingungen erfolgt [103] (s. 1.4.5). Das Gen *pXO2-61* kodiert für den Sporulationsinhibitor SkiA, dessen Expression positiv über AtxA reguliert wird. Bei SkiA handelt es sich um einen negativen Regulator des *atxA*-Repressorproteins, was zu einer positiven Rückkopplungsschleife für die AtxA-Transkription führt. Das hat zur Folge, dass der erhöhte AtxA-Spiegel zu einer erhöhten *skiA*-Transkription führt, wodurch es unter Toxin-induzierenden Bedingungen (CO₂-Bedingung) zu verzögerter und verminderter Sporulation kommt. Dale *et al.* postuliert, dass es sich um einen bei *B. anthracis* entwickelten Mechanismus handelt, um eine vorzeitige Sporulation während des Infektionsgeschehens zu verhindern [75] (s. 1.3.5.1). Aufgrund der in dieser Studie beobachteten erhöhten *pXO2-61*-Expression unter wirtsähnlichen Bedingungen scheint es auch bei den *Bcbva*-Stämmen eine inverse Beziehung zwischen Toxin-Produktion und Sporulation in Verbindung mit dem AtxA-Level zu geben. Das Gen *pXO2-60* liegt downstream von *pXO2-61*. Obwohl das Protein pXO2-60 bei *B. anthracis* nicht sekretiert und vermutlich auch nicht synthetisiert wird [103], wurde wie für *pXO2-61* auch für *pXO2-60* eine verstärkte Expression des Gens unter CO₂-Bedingungen bzw. eine Regulation über AtxA gezeigt [104], was mit der Operonstruktur erklärt werden kann.

Ein weiteres, um das 41- bis 194-fach differentiell exprimiertes pXO2-Gen bei allen untersuchten Stämmen war *pagR*, das ein Paralog des pXO1-kodierten Transkriptionsfaktors *pagR* darstellt [154, 198]. Hierbei handelt es sich vermutlich ebenfalls um einen Virulenzfaktor, da das pXO2-lokalisierte *pagR*-Gen mit der Abschwächung der Virulenz im Pasteur II-Impfstamm assoziiert wurde [154]. Das pXO1-lokalisierte *bsIA*-Gen, das eine 26- bis rund 120-fache Expressionssteigerung aufwies, kodiert für ein S-Layer Protein, das die Virulenz bei *B. anthracis* über die Adhäsion an Wirtszellen vermittelt [155-157]. Die Transkriptomdaten legen außerdem nahe, dass der L-Lysin-Katabolismus wichtig für das Wachstum in CO₂-Atmosphäre bei den *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen zu sein scheint, da das *kamA*-

Transkript (L-Lysin 2,3-Aminomutase) in dieser Bedingung 18- bis rund 42-fach häufiger vorkommt [199]. Interessanterweise wurde das für ein Sporenkeimungsprotein kodierende Gen *gerN* bei allen Isolaten als differentiell exprimiert detektiert, mit einer 12- bis 56-fachen Steigerung unter CO₂-Bedingung. Aus der Literatur ist bekannt, dass *gerN* für die Inosin-abhängige Keimung von *B. cereus*-Sporen erforderlich ist und es sich bei dem Protein um ein Na⁺/H⁺ - K⁺ Antiporter handelt [159, 200]. Jene Transporter sind wahrscheinlich zentral an der Endosporen-Keimung beteiligt, da es in den frühen Stadien des Prozesses zu einem signifikanten Fluss von Na⁺-, K⁺- und H⁺-Ionen nach außen sowie die anschließende Wiederaufnahme von K⁺-Ionen kommt. In dem Zusammenhang konnte auch die Hochregulation drei weiterer, für Natrium-Kalium-Antiporter kodierender Gene, beobachtet werden. Über die Gründe, weshalb es zu einer verstärkten Expression von Genen, die in der Sporenkeimung involviert sind, bei Wachstum unter wirtsähnlichen Bedingungen in den *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen kommt, kann in der vorliegenden Arbeit nur spekuliert werden. Eine Vermutung wäre, dass die Genprodukte neben ihrer Funktion in der Sporenkeimung eine frühzeitige Sporulation im Wirt verhindern, um die Zelle während des Infektionsgeschehens im vegetativen Zustand zu halten.

Alle bisher erwähnten Gene wurden in mindestens einer der in Tabelle 31 beschriebenen publizierten Genexpressionsstudien in der CO₂-Bedingung stärker exprimiert als in der gewählten Vergleichsbedingung. Diese Übereinstimmungen verifizieren neben den Voruntersuchungen (s. 3.1.4) und der Validierung anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (s. 3.1.7) die gewonnenen Daten aus der RNA-Sequenzierung. Sie lassen zudem die Schlussfolgerung zu, dass die erforderlichen Virulenzfaktoren, die bereits für *B. anthracis* bekannt sind und beschrieben wurden, bei einer simulierten Infektion des Wirts auch bei *Bcbva* vorkommen und deren Genregulation und -expression durch AtxA und in Gegenwart von CO₂ und Natriumbikarbonat wie bei *B. anthracis* induziert werden.

Da weitere bekannte Virulenzgene nicht in der Liste der hochregulierten Gene bei allen Stämmen mit dem gesetzten FC-Cutoff auftauchten, wurde nach deren Expressionsverhalten spezifisch in den Daten gesucht. Dabei fiel auf, dass die log₂FC-Werte in manchen Fällen nur knapp unter dem Threshold lagen, daher konnte bei einigen Genen trotzdem eine eindeutige Expressionssteigerung nach Wachstum in CO₂-Atmosphäre festgestellt werden. Dies betraf die Regulatorgene *acpA* [67] und *acpB* [68], die auf dem Plasmid pXO2 liegen und die Genexpression für die Kapselbildung aktivieren. Die Expression von *acpA* und *acpB* selber wird durch AtxA in Gegenwart von Bikarbonat reguliert. In Abwesenheit von *atxA* ist das Transkriptionslevel von *acpB* stark herabgesetzt, während dieser Effekt bei *acpA* etwas weniger stark ausgeprägt ist [65]. Da alle Gene, bis auf *capE*, des Kapseloperons bei den vier untersuchten Stämmen signifikant hochreguliert wurden, war ein zeitgleicher Expressionsanstieg der beiden Transkriptionsaktivatoren zu erwarten gewesen. Das Gen

capE wurde nur im *Bcbva* CA signifikant um das 64-fache stärker in CO₂ exprimiert. Bei *capE* handelt es sich um das letzte Gen des *cap*-Operons und würde bei einer Degradation der mRNA als erstes Gen abgebaut werden, weshalb es möglicherweise bei den anderen drei Stämmen nicht nachgewiesen werden konnte.

Bei der Überprüfung der Expression des globalen Regulatorgens *atxA* war nur bei *B. anthracis* Dobichau ein Anstieg um das 2,6-fache verzeichnet worden. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da die Genexpression von *atxA* selbst konstitutiv ist und die Höhe der Expressionssteigerung unter wirtsähnlichen Bedingungen mit den Angaben aus der Literatur übereinstimmt, in der ein 2,5-facher Anstieg beschrieben wird [68, 69]. Anhand der Daten aus der durchgeführten Transkriptomanalyse konnte nur das *pagA*-Gen als eines der drei plasmidkodierten Exotoxinkomponenten, die das Milzbrandtoxin bei *B. anthracis* produzieren, als signifikant differentiell reguliert eingestuft werden. Daher war es von großem Interesse, die Genexpression der zwei anderen Toxingene, *lef* und *cya*, ebenfalls zu kontrollieren. Dabei wurde erstaunlicherweise festgestellt, dass nur bei den beiden *B. anthracis*-Stämmen eine Hochregulation für das Letalfaktor-kodierende Gen stattfand (aber $\log_2FC < 2$), bei *Bcbva* CI und CA konnte kaum ein Expressionsunterschied zu der O₂-Bedingung ermittelt werden. Sowohl McKenzie *et al.* [172] als auch Raynor *et al.* [176] konnten eine Expressionssteigerung von *lef* über die AtxA-Regulation und durch Wachstum in CO₂-Atmosphäre bei *B. anthracis* bestätigen. In der Studie von Passalacqua *et al.* [69] konnte diese Hochregulation nicht nur bei *B. anthracis*, sondern auch bei dem untersuchten Stamm *B. cereus* G9241 unter CO₂-Bedingung beobachtet werden. Nach Anzucht in Bikarbonat-Medium in CO₂-Atmosphäre wurde in den Kulturüberständen der *Bcbva*-Isolate die Sekretion von PA, LF und EF nachgewiesen [62], sodass bereits bekannt ist, dass die Expression der Toxingene bei *Bcbva* wie bei *B. anthracis* über AtxA reguliert und durch Wachstum in CO₂-Atmosphäre aktiviert wird. Das Ausbleiben einer Expressionssteigerung von *lef* bei den *Bcbva*-Stämmen in der durchgeführten Transkriptomanalyse kann deshalb nur auf den gewählten Untersuchungszeitpunkt zurückzuführen sein. Möglicherweise wurde die RNA aus den *Bcbva*-Kulturen in einer Wachstumsphase der Zellen extrahiert, in der noch nicht alle Toxingene hochreguliert wurden. Das bedeutet, dass zu einem etwas späteren Zeitpunkt ein Expressionsanstieg des *lef*-Gens vermutlich auch bei den *Bcbva*-Ursprungsisolaten hätte nachgewiesen werden können. Bei keinem der untersuchten Vertreter von *B. anthracis* oder *Bcbva* konnte hingegen eine erhöhte Expression des EF-kodierenden Gens *cya* unter wirtsähnlichen Anzuchtbedingungen nachgewiesen werden. Stattdessen ergab die Analyse eine 2,5-fach höhere Expression des Gens bei *Bcbva* CA nach Anzucht unter O₂-Bedingung. Dieses Ergebnis war überraschend, da in der Fachliteratur allgemein als Höhepunkt der Toxingenexpression, in Gegenwart von Natriumbikarbonat und CO₂, die späte exponentielle Wachstumsphase angegeben wird [151, 191]. Jedoch konnte in der Doktorarbeit von

S. Dupke, angefertigt in der Arbeitsgruppe ZBS 2, ebenfalls eine Expressionssteigerung von *cya* unter nicht-induzierenden Bedingungen bei *Bcbva* beobachtet werden [201]. Bei der Überprüfung der Promotor-Region des Gens konnten keine Unterschiede zwischen *B. anthracis* und *Bcbva* festgestellt werden. Die Microarray-Analyse von Passalacqua *et al.* ergab zwar eine Expressionsteigerung von *cya* unter CO₂-Bedingung in dem untersuchten *B. anthracis*-Stamm, sie fiel jedoch deutlich geringer aus als die der Gene von PA oder LF [69]. Der größte Teil der Regulationsmechanismen der Toxingene findet auf Transkriptionsebene durch die Verfügbarkeit von CO₂/Natriumbikarbonat und durch den globalen Regulator AtxA statt, der nur bei *B. anthracis*, *Bcbva* und einigen wenigen *B. cereus*-Stämmen mit einem pXO1-ähnlichem Plasmid vorhanden ist [53]. Allerdings sind bisher kaum exakte Details über die genauen molekularen Abläufe aufgedeckt worden und somit bleiben bis heute die meisten Fragen zur CO₂- und Bikarbonat-induzierten Regulation der Anthrax-Toxingene offen [202].

Die Virulenz von *B. anthracis* wird neben der Toxin- und PDGA-Kapselproduktion über eine zusätzliche parakristalline Struktur von Proteinen, dem S-Layer, der sich auf der Oberfläche des Bakteriums selbst assembliert, vermittelt. Die Oberfläche von einer Reihe von verschiedenen Bakterien und fast aller Archea besteht aus einem S-Layer [203]. Es gibt viele Ansichten in der Literatur über mögliche Funktionen dieser Struktur. S-Layer könnten als Exoskelette, als Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen, als Gerüststrukturen für oberflächenlokalisierte Enzyme und Adhäsine, als Molekularsiebe für die Nährstoffaufnahme und als Kontaktzone mit der extrazellulären Umgebung, einschließlich der Wirtszellen im Falle von pathogenen Bakterien, fungieren [204]. In *B. anthracis* erscheinen an der Zelloberfläche während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase nacheinander und sich gegenseitig ausschließende S-Layer-Schichten, die aus dem Surface-Array-Protein (Sap) oder dem Extractable Antigen 1 (EA1) (als *eag* kodiert) bestehen [205]. Beide Proteine werden nicht gleichzeitig synthetisiert. Die Sap-Synthese findet während der gesamten exponentiellen Wachstumsphase statt, und das *sap*-Transkriptionsniveau nimmt stark ab, wenn die Zellen in die stationäre Phase eintreten. Die *eag*-Transkription und die EA1-Produktion steigen an, wenn das *sap*-Expressionsniveau sinkt. Sap unterdrückt die *eag*-Transkription, und EA1 ist ein Autorepressor [205]. Das Abgleichen der *sap*- und *eag*-Sequenz lieferte die Erkenntnis, dass zwar die *eag*-Gene und EA1-Proteine bei *B. anthracis* und *Bcbva* zu etwa 90 % identisch sind, sich die *sap*-Gene aber nur am Anfang der Sequenz ähneln, da in diesem Bereich die SLH-Domäne kodiert wird. In Voruntersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die Expression der S-Layer Gene bei *Bcbva* Wachstumsphasen-abhängig ist und zeitlich versetzt abläuft (Daten nicht gezeigt). Umso erstaunlicher war das Ergebnis aus der Analyse der Transkriptomdaten, dass bei den *B. anthracis*-Isolaten für *eag* kein Expressionsanstieg verzeichnet werden konnte, obwohl zum gewählten Zeitpunkt der RNA-Extraktion (Ende

exponentieller und Anfang stationärer Phase) die *eag*-Transkription ansteigen müsste. Bei *Bcbva* CA konnte eine 3,3-fache Steigerung und bei *Bcbva* CI eine 16-fache Steigerung festgestellt werden. Die Expression von *sap* zeigte erwartungsgemäß in keinem untersuchten Stamm eine differentielle Regulation zwischen den Wachstumsbedingungen. Passalacqua *et al.* beobachtete hingegen bei *B. anthracis* Sterne eine signifikant höhere Expression von *eag* in CO₂-Atmosphäre, wohingegen für *sap* auch hier keine transkriptionellen Unterschiede festgestellt wurden [69].

Die Kontrolle der Daten des Haushaltsgens *rpoB* ergab sowohl bei *B. anthracis* als auch bei *Bcbva* keine Expressionsänderungen zwischen den beiden Wachstumsbedingungen. Dadurch eignete sich *rpoB* hervorragend als Referenzgen für die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression (s. 3.1.7 und 3.3.1.3).

4.1.2.3 Spezies-spezifische Hochregulation von Genen unter CO₂-Bedingung

Der nächste Schritt in der Analyse der vorliegenden Transkriptomdaten war die genauere Betrachtung der hochregulierten CO₂-Gene mit einem $\log_2\text{FC} \geq + 2$ aus den jeweiligen Schnittmengen der beiden untersuchten Spezies. Dabei wurden sechs übereinstimmende Gene zwischen *B. anthracis* Vollum und Dobichau als differentiell reguliert identifiziert, wohingegen die Anzahl bei *Bcbva* CI und CA bei 41 hochregulierten Genen lag (s. 3.1.6.4, Tabelle 20 und Tabelle 21, S. 85 und 86). Die nähere Diskussion über die unterschiedlichen Anzahlen an ermittelten DEG's zwischen den Spezies erfolgte bereits in Kapitel 4.1.2.1.

Bei den *B. anthracis*-Stämmen konnte spezifisch ein vermeintliches pXO₂-lokalisiertes Operon bestehend aus zwei Genen (DJ46_RS00195 und DJ46_RS00200) detektiert werden, wobei eines für eine membrangebundene Metalloprotease kodiert. In publizierten Genexpressionsstudien ist eine Hochregulation dieser Gene unter CO₂-Bedingung nicht zu finden, da fast ausschließlich attenuierte *B. anthracis*-Stämme ohne das Kapselplasmid untersucht wurden. Bei Raynor *et al.* werden diese zwei Gene nicht aufgeführt [176]. Metalloproteasen haben sich als wichtige Effektoren und Virulenzfaktoren von pathogenen Bakterien erwiesen [206]. Als Beispiele innerhalb der *B. cereus*-Gruppe sind hier vor allem LF als zinkabhängige Metalloprotease oder die InhA1-Metalloprotease, die *B. cereus*-Sporen die Fähigkeit verleiht, aus Makrophagen zu entkommen, zu nennen [207-209].

Zu den ausschließlich in den *Bcbva*-Stämmen hochregulierten Genen zählten u.a. fünf Gene des *opp*-Operons (BACI_c02340, BACI_c06660, BACI_c06690, BACI_c06700, BACI_c09470), die für eine Oligopeptid-Permease in Form eines ABC-Transporters kodieren [210]. Zusätzlich waren die Genprodukte von *oppA5* und *oppA3* in den Kulturüberständen der *Bcbva*-Isolate im Vergleich zu den Überständen der *B. anthracis*-Vetreter stark angereichert. Oligopeptid-Permeasen werden von Bakterien benötigt, um Peptide als Nährstoffquellen zu

nutzen. Darüber hinaus sind sie an Signaltransduktionswegen beteiligt, die die bakterielle Entwicklung, Virulenz und den konjugalen Plasmidtransfer regulieren [211-213].

Ein erwähnenswertes Ergebnis ist die 7,5- bis 11-fache Hochregulation des *hlyII*-Gens bei *Bcbva* unter CO₂-Bedingung, die weder bei Passalacqua *et al.* noch bei McKenzie *et al.* oder Raynor *et al.* in *B. anthracis* oder *B. cereus* G9241 auftrat [69, 172, 176]. *HlyII* kodiert in *B. cereus* für den bekannten Virulenzfaktor Hämolyisin II, das den Makrophagen-Zelltod durch Apoptose aufgrund seiner porenbildenden Aktivität induziert [162]. *HlyII* ist einer der wenigen sezernierten Virulenzfaktoren von *B. cereus*, der nicht durch PlcR, dem zentralen Transkriptionsregulator für Virulenzgene in *B. cereus*, reguliert wird [214]. PlcR ist aufgrund unterschiedlicher Mutationen in *B. anthracis* und *Bcbva* nicht aktiv (s. 1.3.5.2 und 1.4.3). Die *hlyII*-Gensequenz von *B. anthracis* weist ebenfalls einen Frameshift auf, sodass *HlyII* wahrscheinlich nicht funktionsfähig ist [215]. Dafür verursacht bei *B. anthracis* der Letalfaktor als spezifische Zink-Metallo-Protease die Inaktivierung der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinasen (MAPKK) und verursacht damit den Tod von Makrophagen [47, 216, 217]. Folglich induzieren *B. cereus* und *B. anthracis* die Makrophagen-Apoptose durch die Verwendung unterschiedlicher bakterieller Faktoren. Der in der vorliegenden Transkriptomanalyse beobachtete Anstieg der *hlyII*-Transkription bei *Bcbva* CI und *Bcbva* CA unter wirtsähnlichen Bedingungen lässt die Schlussfolgerung zu, dass im Gegensatz zu *B. cereus* die Genexpression dieses Virulenzfaktors bei *Bcbva* über AtxA reguliert zu sein scheint.

Allgemein kann trotz eingehender Literatur- und Datenbankrecherche anhand der vorhandenen Informationen nicht eingeschätzt werden, ob es sich bei den explizit erwähnten bzw. restlich aufgeführten *Bcbva*-spezifischen DEG's um Virulenzfaktoren handelt. Die generierte Liste mit den 41 hochregulierten *Bcbva*-Genen bietet jedoch eine solide Datengrundlage, um interessante und potentielle Kandidatengene, die für die Vermittlung der Virulenz eine Rolle spielen könnten, auszusuchen und gezielt Deletionsmutanten herzustellen. Von besonderem Interesse wäre hierbei die Untersuchung einer AtxA-Deletionsmutante, um festzustellen, ob die beobachtete differentielle Expression dieser Gene in der CO₂-Wachstumsbedingung auch tatsächlich auf die Aktivität des Regulators zurückzuführen ist. Ein Augenmerk könnte ebenso auf die beiden plasmid-lokalisierten Gene (BACI_pCIXO101070 und BACI_pCIXO200650) gelegt werden, die bei *B. anthracis* als Pseudogen bzw. gar nicht annotiert sind und bisher nur als hypothetische Proteine geführt werden.

4.1.2.4 Herunterregulierte Gene unter CO₂-Bedingung

Nach der Analyse der hochregulierten Gene wurde ein Blick auf die Transkriptionsunterschiede der herunterregulierten Gene zwischen CO₂- und O₂-Bedingung geworfen (s. 3.1.6.5). Zunächst lag der Fokus wieder bei den differentiell exprimierten Genen

mit einem $\log_2FC \leq -2$, die bei allen untersuchten Stämmen signifikant herunterreguliert wurden (s. Anhang Tabelle 38, S. 181). Hierbei konnte ein 4,7- bis knapp 87-facher Expressionsabfall der Gene *alsS* und *alsD* identifiziert werden, deren Genprodukte die ersten Schritte in der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) Valin, Leucin und Isoleucin bei Prokaryoten katalysieren. Über eine AtxA-vermittelte Repression von BCAA-Biosynthese-Operons und BCAA-Transporter-Genen wurde bereits in anderen Veröffentlichungen berichtet [104, 176, 177]. Raynor *et al.* identifizierte AcpB als einen zusätzlichen negativen Regulator dieser Gene. Von den 17 Genen, die an der BCAA-Biosynthese beteiligt sind, wurde in ihrer Analyse die Expression von 13 dieser Gene durch AtxA und AcpB unterdrückt [176]. Umso erstaunlicher war das Ergebnis aus dem vorliegenden RNA-Sequenzierungsexperiment, dass die verantwortlichen Synthesegene für alle drei BCAA's (*ilvB*, *ilvN*, *ilvC*, *ilvD*, *ilvE*) bzw. nur für Leucin (*leuA*, *leuC*, *leuD*, *leuB*) und Isoleucin (*ilvA*) in den *B. anthracis*-Stämmen zwar unter CO₂-Bedingung und somit Einfluss von AtxA herunterreguliert wurden, in manchen Fällen sogar signifikant, für *Bcbva* CA wiederum eine gegenteilige Expression der Gene beobachtet wurde. Das bedeutet, dass für diesen Stamm ein Anstieg der Transkription der BCAA-Gene in CO₂-Atmosphäre zu verzeichnen war, sodass anzunehmen ist, dass AtxA hier die Genexpression nicht reprimiert sondern aktiviert. Bei *Bcbva* CI war dieses Expressionsmuster nicht so deutlich ausgeprägt, eine Tendenz in Richtung Expressionssteigerung unter CO₂-Bedingung war dennoch erkennbar. Somit scheint es einen deutlichen Unterschied in der Transkriptionsregulation der Gene für die verzweigtkettigen Aminosäuren durch AtxA zwischen *B. anthracis* und *Bcbva* zu geben. Ebenso ist auch hier die Diskrepanz im Expressionsverhalten hinsichtlich der Ausprägung des Expressionsunterschieds zwischen den Wachstumsbedingungen innerhalb der *Bcbva*-Spezies wieder auffällig.

Obwohl nur in den beiden *Bcbva*-Stämmen eine signifikante, 5- bis 18-fache Expressionsminderung der Flagellengene *fliR* und *flhB* verzeichnet werden konnte (s. Anhang Tabelle 40, S. 182 und 183), ergab die Überprüfung der Expression weiterer Gene, die bei der Bildung des Flagellums eine Rolle spielen, eine Repression unter CO₂-Bedingung sowohl in den *B. anthracis*- als auch *Bcbva*-Stämmen. Der für diese Arbeit gesetzte \log_2FC -Cutoff wurde in den meisten Fällen jedoch nicht erreicht. *B. anthracis*-Stämme sind typischerweise unbeweglich, was höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass zehn bekannte Motilitäts- und Chemotaxis-assoziierte Gene durch Mutationen inaktiv sind [218]. Bei den *Bcbva*-Isolaten sind diese Gene jedoch intakt, was zur Beweglichkeit der Stämme führt [93]. Die Expression der Flagellengene wird allerdings unter simulierten wirtsähnlichen Bedingungen reprimiert, sodass unsere Daten mit der Literatur konform gehen [219].

Zusammenfassend ließen sich anhand der durchgeführten Transkriptomanalyse sowohl in der Hoch- als auch Herunterregulation von Genen, darunter auch bekannter Virulenzfaktoren,

unter wirtsähnlichen Bedingungen Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen den untersuchten *B. anthracis* und *Bcbva*-Stämmen feststellen. In zukünftigen Untersuchungen gilt es vor allem, die identifizierten Unterschiede in der Genexpression näher zu charakterisieren, auch in Hinblick auf die beobachteten Diskrepanzen zwischen *Bcbva* CI und *Bcbva* CA.

4.2 Sekretomanalyse

4.2.1 Verwendung von R-Minimalmedium für die MS-Analyse

Bisher konnte als einziges *Bcbva*-spezifisches Antigen das Protein pXO2-60 identifiziert werden, das nach Wachstum in CO₂-Atmosphäre sekretiert wird. Aufgrund eines vorzeitigen Stoppcodons in der entsprechenden Sequenz des Signalpeptids kommt es bei *B. anthracis* hingegen nicht zu einer Proteinsekretion. Die Eignung pXO2-60-basierter serologischer Assays zum zuverlässigen Nachweis von Antikörpern gegen *Bcbva* beim Menschen konnte bereits bewiesen werden (s. 1.4.5) [103, 106]. Das Ziel der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sekretomanalyse war die Detektion weiterer potentieller Antigene, die spezifisch im Überstand von *Bcbva* im Vergleich zu *B. anthracis* vorkommen. Dafür wurde das analytische Verfahren der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LCMS/MS) angewandt (s. 2.6.7.4). Hierfür war der Test eines proteinfreien Mediums zur Anzucht der Bakterien von großem Interesse. In der Massenspektrometrie ist die Reduktion der Komplexität von Proben um Proteinkontaminationen aus dem Mediumüberstand von großer Bedeutung. Dies liefert qualitativ bessere Resultate, sodass es möglich ist, Proteine geringer Abundanz und ohne Anreicherung nachzuweisen [220]. Ein starkes Hintergrundsignal durch medieneigene Proteine verursacht Probleme in der Analyse, wodurch die Detektion von Immunogenen erschwert wird.

Die aufgezeichneten Wachstumskurven (s. Abbildung 22, S. 92) spiegeln das Wachstumsverhalten der untersuchten Stämme nach Anzucht in R-Minimalmedium [135] unter wirtsähnlichen Bedingungen wider. Das Medium enthält bereits Natriumbikarbonat und die Kulturen wurden bei 37 °C kombiniert mit 5 % CO₂ inkubiert. Die Wachstumscharakteristika der *B. anthracis*- und *Bcbva*-Deletionsstämme waren nahezu identisch, sodass nach 24-stündiger Anzucht ähnliche Zelldichten erreicht wurden. Das erheblich bessere Wachstum der Bakterien in BHI-Medium (Vergleich s. Abbildung 15, S. 69) kann durch die bessere Nährstoffversorgung erklärt werden, da BHI neben Aminosäuren und Zuckern auch Proteinhydrolysate wie Pepton (Gemisch aus Peptiden und Aminosäuren) enthält, weshalb es sich jedoch nicht als Anreicherungsmedium für nachfolgende Proteomanalysen eignet.

Nach der Herstellung der Kulturüberstände konnte anhand des silbergefärbten SDS-Proteingels eine hohe Vielfalt an Proteinbanden festgestellt werden (s. Abbildung 24, S. 94), was ein Indiz für die Eignung des R-MM zur Anzucht der Bakterien ist. Für die Analyse des

Sekretoms war es zusätzlich erforderlich, das Proteom der Bakterienzellen zu bestimmen, um beim Vergleich von Überstands- und Zellproteom signifikant sekretierte Proteine ermitteln zu können. Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit dem R-Minimalmedium Agar-Agar zugefügt, um es als Festmedium zu verwenden und das Koloniematerial für die massenspektrometrische Analyse aufarbeiten zu können. Da es bisher keine Veröffentlichungen über die Verwendung dieses R-Minimalmediums als Agarplatten gibt, musste zunächst überprüft werden, ob die Bakterien auf dem neuartigen Nährmedium wachsen können. Alle getesteten Stämme waren dazu in 5 % CO₂-Atmosphäre in der Lage (s. Abbildung 23, S. 93). Es wurden sowohl *B. anthracis*- und *Bcbva*-Wildtypstämme als auch *Bcbva*- Δ *hasA*-Mutanten (*Bcbva* CI-H und *Bcbva* CA-H) und ein plasmidloser *Bcbva*-Stamm (*Bcbva* CAR-H) untersucht, sodass bereits anhand der Koloniemorphologie die Fähigkeit zur Kapselproduktion nachvollzogen werden konnte. Um jedoch, wie bei der RNA-Sequenzierung, eine experimentelle Grundlage zu kreieren, die die Voraussetzung für eine solide Datenerhebung schafft, wurde überprüft, ob die untersuchten Vertreter von *B. anthracis*- und *Bcbva* nach Wachstum unter induzierenden Bedingungen auch in R-MM die Toxine und Kapsel bilden. Für den spezifischen Nachweis von zwei Toxinkomponenten mit monoklonalen Antikörpern und pXO2-60 mit Mäuseserum im Western Blot wurden die bakteriellen Kulturüberstände der einzelnen Stämme zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von PA, LF und pXO2-60 erfolgte im Anschluss durch Sichtbarmachung auf Röntgenfilm und kann der Abbildung 25 auf Seite 95 entnommen werden. Alle drei Proteine konnten eindeutig in den Kulturüberständen nachgewiesen werden. Für den Kapselnachweis mittels Alcianblaufärbung wurden sowohl die Kulturüberstände als auch sterilfiltrierte Überstände von resuspendiertem Koloniematerial verwendet (s. Abbildung 26 und Abbildung 27, S. 97). Es erschienen erwartungsgemäß bei den entsprechend untersuchten Stämmen die passenden Banden für die PDGA- und HA-Kapsel. Hierbei war auffällig, dass sowohl in den Kulturüberständen als auch in dem Überstand von resuspendiertem Koloniematerial anhand der Bandenstärke eine vergleichsweise vermehrte Produktion der PDGA-Kapsel bei *Bcbva* CI-H und *Bcbva* CA-H als bei den *B. anthracis*-Stämmen oder *Bcbva*-Ursprungsisolaten angenommen werden kann. Hier könnte gemutmaßt werden, dass die übermäßige Produktion der Anthrax-Kapsel eine Kompensation der fehlenden HA-Kapsel aufgrund der *hasA*-Deletion darstellt.

Anhand der Ergebnisse kann das Fazit gezogen werden, dass sich das R-Minimalmedium sowohl in flüssiger als auch fester Form als Anzuchtmedium für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämme eignet. Da es sich um ein proteinfreies Medium handelt, kann daraus gewonnener Kulturüberstand oder Zellmaterial für massenspektrometrische Analysen verwendet werden. Die Toxin- und Kapselproduktion fand nach Wachstum in R-MM bzw. auf R-MM-Agar unter CO₂-Bedingung uneingeschränkt statt,

sodass die Möglichkeit bestand, mit Hilfe der Sekretomanalyse weitere potentielle Antigene spezifisch für *Bcbva* identifizieren zu können.

4.2.2 Spezifisch sekretierte Proteine der untersuchten *Bcbva*-Stämme

Zunächst erfolgte die Quantifizierung der Proteine in den Zell- und Überstandsproben pro biologisches Replikat (s. Tabelle 24, S. 98). Bei den Zellproben konnte bei allen Stämmen in allen Replikaten eine ähnliche Proteinanzahl ermittelt werden, die zwischen den Bakterienspezies kaum variierte. In den Überstandsproben wurden grundsätzlich weniger Proteine gezählt, wobei es eine relativ große Diskrepanz zwischen der Anzahl in den *Bcbva*-Proben zu der in den *B. anthracis*-Proben gab. Jeweils das zweite und dritte Replikat von *Bcbva* CI-H und *Bcbva* CA-H wiesen deutlich weniger Proteine auf als das dazugehörige erste Replikat. Dieser große Unterschied kann nicht eindeutig erklärt werden. Es ist fraglich, ob das Ergebnis der Proteinquantifizierung tatsächlich die Schlussfolgerung zulässt, dass im Sekretom der *Bcbva*-Stämme im Vergleich zu den *B. anthracis*-Stämmen grundsätzlich weniger Proteine vorkommen. Wahrscheinlicher ist der Umstand, dass aufgrund der Überproduktion an PDGA-Kapsel in den untersuchten *Bcbva*-Deletionsstämmen die Aufarbeitung der Überstandsproben erschwert war und somit ein Teil der Proteine nicht quantifiziert werden konnte.

Die weitere bioinformatische Analyse fokussierte sich auf die Identifizierung signifikant vermehrt oder ausschließlich im Sekretom der beiden *Bcbva*-Stämme vorkommender Proteine relativ zu den sekretierten Proteinen der beiden *B. anthracis*-Stämme. Es konnte eine Liste mit 33 diskriminierenden und potentiell sekretierten Proteinen generiert werden, wobei sich die Auswertung auf einen t-Test mit einer FDR von 1 % stützt (s. Tabelle 25, S. 102 und S. 103). Wie bereits in Kapitel 3.2.4 erwähnt, gehören bei Gram-positiven Bakterien zu den sekretierten Proteinen insbesondere Faktoren, die an der Pathogenität beteiligt sind. Solche Proteine können als mögliche Ziele für therapeutische Eingriffe dienen, wie es für das in Kapitel 4.1.2.2 beschriebene S-Layer Protein Sap von *B. anthracis* bereits berichtet wurde [221]. In weiteren Veröffentlichungen wurde eine starke Anreicherung von Sap im Sekretom von *B. anthracis* beobachtet [54-56, 222]. Die Daten der vorliegenden Sekretomanalyse ergaben, dass auch im Überstand der *Bcbva*-Stämme Sap (D8H375) rund 23000-fach häufiger vorkommt als im *B. anthracis*-Sekretom. Sequenzanalysen auf Proteinebene zeigten, dass sich die Proteine zwischen *B. anthracis* und *Bcbva* deutlich voneinander unterscheiden und nur im N-Terminus homologe Bereiche zu finden sind, die die Domäne für die Bindung an die Peptidoglycan-Schicht der Zellwand darstellen. Dieses Ergebnis passt zu der Untersuchung der Kulturüberstände im Silbergel, bei dem ebenfalls die Sap-spezifische Bande nur bei den beiden *Bcbva*-Deletionsmutanten sichtbar war (s. Abbildung 24, S. 94). Auf den ersten Blick könnte Sap daher ein geeignetes Kandidatenprotein für ein *Bcbva*-spezifisches Antigen

darstellen. Obwohl es sich vom *B. anthracis*-spezifischen Sap-Protein deutlich abgrenzt, zeigte sich allerdings durch weitere Sequenzanalysen innerhalb der *B. cereus*-Gruppe, dass das Protein weit verbreitet ist und andere Stämme fast identische Proteine besitzen. Somit kommt Sap als potentielles *Bcbva*-spezifisches Antigen nicht in Frage. Jedoch wurde das bekannte *Bcbva*-spezifische Protein pXO2-60 (D8HAL3) mit einem 357-fachen Unterschied im *Bcbva*-Überstand nachgewiesen, dessen Genexpression auch bereits in der Transkriptomanalyse bei allen untersuchten Stämmen stark unter CO₂-Bedingung hochreguliert wurde. Da die Expression des Gens bekanntermaßen CO₂-abhängig ist, verifiziert dieses Ergebnis nicht nur die generierten Sekretomdaten, sondern zum wiederholten Male auch die erhobenen Transkriptomdaten.

In der Liste befinden sich u.a. sekretierte Proteine mit dokumentierter Beteiligung im Pathogenitätsgeschehen anderer Bakterien. Dazu zählen die Genprodukte der Opp-Familie (BACI_c06660 und BACI_c02340), deren Expression ebenfalls in der vorliegenden Transkriptomanalyse ausschließlich bei den *Bcbva*-Stämmen erhöht waren. Weiterhin findet sich ein Chitin-bindendes Protein (D8H133), wobei bekannt ist, dass diese Polysaccharid-abbauenden Enzyme an der Virulenz in *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* beteiligt sind [55]. Ein unerwartetes Ergebnis stellte die Detektion mehrerer membrangebundener bzw. membranassoziierter Proteine dar. Anhand der elektronenmikroskopischen Analyse für die Untersuchung der Sporenbildung (s. 3.3.2.1) konnte festgestellt werden, dass die vegetativen Zellen der *Bcbva*-Stämme schneller und in einer höheren Anzahl lysierten als die der *B. anthracis*-Stämme. Dazu könnte es auch beim Wachstum der Bakterien in R-Minimalmedium gekommen sein, was einen Übertrag von totem Zellmaterial in den Kulturüberstand zur Folge gehabt haben könnte. Aufgrund dessen besteht die Möglichkeit, dass in hohem Maße auch Membranproteine, wie z.B. das Kapselprotein CapE (D8HAK2), als vermeintlich signifikant sekretierte Proteine im Überstand von *Bcbva* identifiziert wurden. Diese Theorie könnte überprüft werden, indem die verwendeten Überstandsproben für die Sekretomanalyse ebenfalls im Elektronenmikroskop untersucht und ein Vergleich bzgl. der Anzahl lysierter Zellen zwischen den *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen angestellt werden würde.

Für alle Proteine aus der generierten Liste mit den 33 sekretierten *Bcbva*-spezifischen Proteinen wurden durch Abgleich mit der NCBI-Datenbank Homologe bei *B. anthracis* gefunden, allerdings schwanken die Homologien zwischen 35 % (Sap) und 99 %. Darum wurde die Liste für die weitere Ergebnisauswertung mit den Daten aus der Sekretomanalyse von Chitlaru *et al.*, die für ihre Studie den *B. anthracis* Vollum verwendeten, abgeglichen [55]. Dabei gab es eine Übereinstimmung bei fünf Proteinen, die nach Wachstum der Bakterien unter CO₂-Bedingung in beiden Analysen des Sekretoms vorkommen. Die geringen Überschneidungen mit bekannten sekretierten *B. anthracis*-Proteinen werden dahingehend

positiv interpretiert, als dass dies einen Beweis darstellt, dass die Mehrheit der identifizierten Proteine tatsächlich *Bcbva*-spezifisch sind. Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine relativ große Anzahl an diskriminierenden Proteinen in den *Bcbva*-Stämmen nachgewiesen werden konnte, kann aufgrund der erweiterten Sequenzanalysen innerhalb der *B. cereus*-Gruppe nicht zweifelsfrei ein potentiell *Bcbva*-spezifisches Antigen bestimmt werden. Es finden sich zwar einige Proteine, die nur geringe Sequenzidentitäten zu *B. anthracis* aufweisen, aber alle Proteine besitzen eine fast identische Proteinsequenz zu Homologen aus anderen Spezies innerhalb der *B. cereus*-Gruppe und ihr Vorkommen ist weit verbreitet. Es bleibt zu klären, ob diese homologen Proteine auch tatsächlich in *B. cereus* sekretiert werden, da in der vorliegenden Analyse keine *B. cereus*-Stämme untersucht wurden. Aufgrunddessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich unter den 33 identifizierten Proteinen möglicherweise weitere *Bcbva*-spezifische Antigene befinden. Eine Aussage dazu könnte nur nach zusätzlichen Untersuchungen der Sekretome zahlreicher *B. cereus*-Stämme getroffen werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse könnte mit Hilfe eines serologischen Assays, in dem eines der detektierten Proteine als Antigen verwendet werden würde, nicht definitiv zwischen einer Infektion mit *Bcbva* oder einem anderen Pathogen der *B. cereus*-Gruppe unterschieden werden.

Interessanterweise sind in der Liste keine Proteine enthalten, für die *B. anthracis* keine Gene besitzt. Es wurde vermutet, dass u.a. auch Proteine, die in den „genomischen Inseln“ von *Bcbva* kodiert werden [93], zu den spezifisch von *Bcbva* sekretierten Proteinen gehören. Dies ist offensichtlich nicht der Fall, sodass festzustellen ist, dass die Proteinzusammensetzung weniger von dem genomischen Hintergrund einer Spezies als von der spezifischen Genregulation abhängt.

Um ein weiteres *Bcbva*-spezifisches Antigen zu identifizieren, könnte zukünftig noch die Methode der Immunopräzipitation mit Hilfe magnetischer Protein-G Beads angewandt werden. Dabei würden Antikörper aus verschiedenen Seren (z.B. gegen *B. anthracis* bzw. *Bcbva* immunisierte Mäuse, gegenüber *Bcbva* exponierte Personen, gegen *B. anthracis* geimpfte Personen) an die Beads gekoppelt und mit Kulturüberstand von *B. anthracis* bzw. *Bcbva* inkubiert werden, sodass die darin enthaltenen Antigene an die Bead-gekoppelten Antikörper binden könnten. Nach der Immunopräzipitation würden die gebundenen Antigene letztlich massenspektroskopisch identifiziert werden. Die Etablierung eines geeigneten Protokolls ist bereits in der Arbeitsgruppe von ZBS2 erfolgt und lieferte in den Voruntersuchungen vielversprechende Ergebnisse. Aus Zeitgründen konnte die Methode im Rahmen der Dissertation jedoch nicht mehr an den untersuchten S3-Stämmen getestet werden.

4.3 Analyse der Sporulation

4.3.1 Relative Quantifizierung der Genexpression anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Der dritte Schwerpunkt dieser Arbeit war die vergleichende Untersuchung der Expression ausgewählter Zielgene während der Sporenbildung bei *B. anthracis* und *Bcbva*. Für diese Analyse wurde die Methode der qRT-PCR angewandt. Die Analyse der Genexpression mittels relativer Quantifizierung erfolgte im Nachgang anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Da es sich bei der RNA-Sequenzierung um eine noch relativ kostspielige, zeit- und ressourcenaufwändige Methode handelt, war eine erneute umfassende Transkriptomanalyse zum Zeitpunkt der bakteriellen Versporung im Rahmen der Doktorarbeit nicht möglich.

Bei der qRT-PCR handelt es sich um ein automatisiertes, hochsensitives und -spezifisches Verfahren, welches erlaubt, die Akkumulation spezifischer DNA-Sequenzen in Echtzeit zu verfolgen [223]. Sie stellt eine zuverlässige und exakte Methode zur Quantifizierung spezifischer mRNA dar und kann routinemäßig innerhalb kürzester Zeit mit relativ geringem Arbeitsaufwand angewendet werden [224]. Es gibt verschiedene Strategien zur Quantifizierung der Genexpression mittels Real-Time PCR, die der Abbildung 36 entnommen werden können.

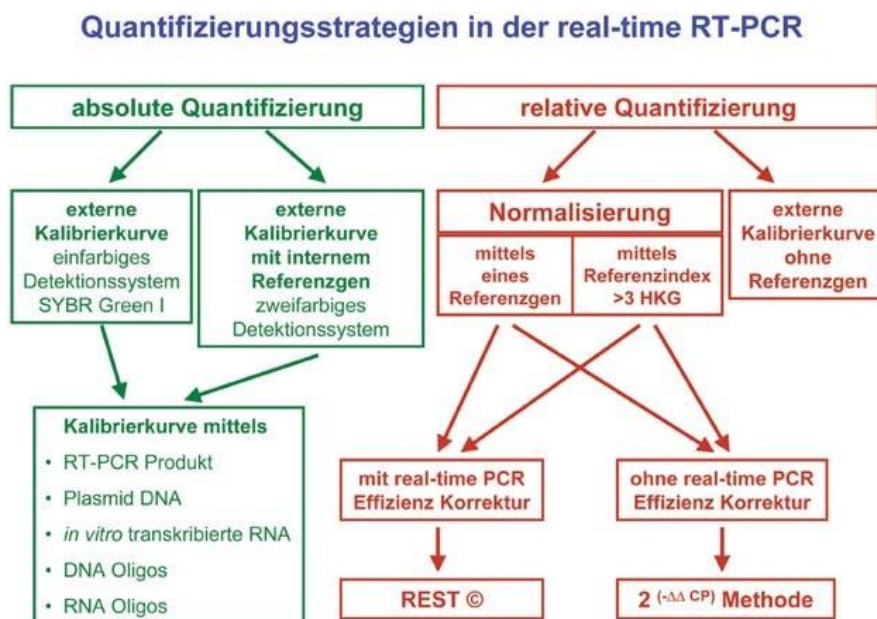


Abbildung 36: Quantifizierungsstrategien in der Real-Time RT-PCR
modifiziert nach Pfaffl © 2004 BIOSpectrum [138]

Die Analyse der Expression variabel regulierter Gene kann durch viele unterschiedliche Störfaktoren beeinflusst werden, die bei der Auswertung der Versuchsergebnisse berücksichtigt werden müssen. Wie auch bei der RNA-Sequenzierung spielt die Qualität und Quantität der Gesamt-RNA eine große Rolle. Mit RNA von hoher Qualität lassen sich deutlich

niedrigere Ct-Werte in der Real-Time PCR erzielen als mit degradiert oder kontaminierter RNA [225], was wiederum einen Einfluss auf die Ergebnisse, ihre Reproduzierbarkeit und die daraus resultierenden Schlussfolgerungen hat [226]. Weiterhin können unterschiedliche Zellzahlen der verschiedenen Bakterienkulturen zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung und damit verbundene differierende RNA-Mengen einen Einfluss auf die finalen Ergebnisse haben. Beispielsweise hängt die Effizienz der cDNA-Synthese von der Menge an verfügbaren mRNA-Templates ab und ist deutlich verringert, wenn nur wenige Kopien der umzuschreibenden mRNA im Reaktionsansatz vorliegen [227, 228].

Bei der relativen Quantifizierung mit der $\Delta\Delta Ct$ -Rechenformel wird die gemessene Expression eines variabel regulierten Gens auf einen externen Standard oder eine Referenzprobe bezogen [229], die auch als Kalibrator bezeichnet wird [230]. Durch die Normalisierung gegen ein Referenzgen (meist ein Haushaltsgen) wird nicht die eigentliche Kopienzahl des Zielgens im Reaktionsansatz bestimmt, sondern die nachgewiesenen Produkte werden relativ auf das Referenzgen bezogen. Somit wird letztlich eine Expressionsrate bzw. die Änderung der Expression im Verhältnis zum Haushaltsgen bestimmt. Diese Normalisierung bewirkt die Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da die bereits beschriebenen Einflussgrößen wie unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen oder Fehler bei der Umschreibung von mRNA in cDNA innerhalb einer Probe gleichermaßen das Zielgen und das Kontrollgen betreffen [138].

In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzgen das in der *B. cereus*-Gruppe ubiquitär und homogen exprimierte Haushaltsgen *rpoB* verwendet. Sowohl Vorversuche als auch die Ergebnisse aus der Transkriptomanalyse bestätigten eine vergleichbare konstitutive *rpoB*-Expression bei allen untersuchten Bakterienstämmen. Dabei ist anzumerken, dass im Idealfall stets mehr als ein Referenzgen für die Normalisierung der Expressionsdaten eines Zielgens verwendet werden sollte [231]. Anhand eines aus mindestens drei Genen ermittelten Referenzindex könnte eine noch exaktere Normalisierung erfolgen [138]. Aus zeitlichen Gründen, und da der experimentelle Umfang zu groß geworden wäre, musste jedoch in der vorliegenden Arbeit auf diese Auswertungsmethode verzichtet werden und es wurde nur das Referenzgen *rpoB* für die Normalisierung ausgewählt.

Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode stellen vergleichbare Amplifikationseffizienzen der Ziel- und Referenzgene dar [230]. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit durch das Mitführen von DNA-Standardreihen in den einzelnen Assays bestimmt. Optimale Amplifikationseffizienzen liegen zwischen 95 % und 105 %, die in der vorliegenden Arbeit nicht für alle Assays erreicht wurden. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass die maximale Varianz der Effizienzen zwischen den untersuchten Bakterienstämmen 10 % nicht überschreitet, um die Vergleichbarkeit der PCR-Läufe zu gewährleisten.

4.3.2 Analyse der Expression und Regulation ausgewählter Sporulationsgene

Die einzigen Vertreter der *B. cereus*-Gruppe, bei denen wie bei *B. subtilis* im *sigK*-Gen für den während der Sporulation in der Mutterzelle aktiven Sigma-Faktor σ^K eine Insertion vorliegt, sind die Stämme des *Bcbva* und der *B. cereus* AH820. Diese Insertion beinhaltet u. a. die für den reziproken Rekombinationsvorgang zum Ausschneiden der Insertion notwendige Rekombinase (s. 1.6). Es ist erstaunlich, dass gerade in dem essentiellen *sigK*-Gen unterschiedliche Insertionen im Vergleich zu *B. anthracis* stattgefunden haben, und es stellt sich die Frage, ob diese Insertion notwendig für die betroffenen Bakterien ist. Möglicherweise spielt die Insertion im *Bcbva* bei der Genregulation eine Rolle, wobei sie sogar einen negativen Einfluss auf die Sporulationsfähigkeit ausüben könnte. Mit diesem Wissensstand bzw. offenen Fragen war es von besonderem Interesse, im Rahmen der Dissertation die Kinetik der Sporulation zwischen *Bcbva* und *B. anthracis* sowie spontaner *Bcbva*-Sporulationsmutanten genauer zu untersuchen. Um mögliche Unterschiede in der zeitlichen Abfolge der Genexpression während der Sporulation festzustellen, wurde mittels qRT-PCR die Expression von 13 ausgewählten Sporulationsgenen (s. 3.3.1.2) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten erfasst. Die Analyse der Sporenbildung auf transkriptioneller Ebene sollte auch dazu beitragen, Einblicke in die unterschiedliche Ökologie von *B. anthracis*, der eher in trockenen Savannenregionen vorkommt, und *Bcbva*, der vorwiegend in feuchtwarmen Regenwaldgebieten zu finden ist, zu liefern. Verglichen wurden die zwei *Bcbva*-Ursprungsisolate mit den zwei, in den anderen Analysen ebenfalls verwendeten, *B. anthracis*-Stämmen Vollum und Dobichau sowie mit zwei *Bcbva*-Sporulationsmutanten, *Bcbva* CI-12 und *Bcbva* CA-2.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Glukose-freiem Medium G, das die Sporulation von *B. anthracis* innerhalb weniger Tage fördert [134]. Charney *et al.* zeigten, dass eine erhöhte Konzentration von Mangan-Ionen die Sporulation von mehreren Arten der Gattung *Bacillus* stimuliert, welche auch im verwendeten Medium enthalten sind [232]. Zudem wurden alle Stämme bei 37 °C inkubiert, da nach Literaturangaben bei dieser Temperatur die Sporulation von *B. anthracis* innerhalb von 8 h induziert wird [233]. Voruntersuchungen ergaben, dass die Sporenbildung bei *Bcbva* und *B. anthracis* unter den gewählten Wachstumsbedingungen mit Eintritt in die stationäre Wachstumsphase beginnt. Darum wurden zunächst Wachstumskurven aufgezeichnet und drei geeignete Zeitpunkte im Wachstum der Bakterien ausgewählt, um RNA zu isolieren. Dabei zeigten die *B. anthracis*-Stämme ein verzögertes Wachstum, sodass sie im Vergleich zu den *Bcbva*-Stämmen eine Stunde später in die stationäre Phase eintraten (s. Abbildung 29, S. 105). Die RNA-Proben des jeweils ersten Zeitpunktes wurden als Referenzzeitpunkt t_0 definiert. Die Präparationen der zwei nachfolgenden Zeitpunkte stellten die Untersuchungszeitpunkte t_1 (1 h später) und t_2 (2 h später) dar. Die Betrachtung der

relativen Quantifizierung der Genexpression erfolgte für die einzelnen Zielgene stets von t_1 zu t_0 bzw. von t_2 zu t_0 (s. Tabelle 27, S. 109).

4.3.2.1 Vergleich der Genexpression zwischen den untersuchten Stämmen innerhalb einer Spezies

Die Auswertung der Ergebnisse bezieht sich zunächst auf den Vergleich der untersuchten *B. anthracis*-Stämme bzw. *Bcbva*-Stämme untereinander. Die Analyse der Daten aus der Quantifizierung der cDNA mittels ABI 7500 nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ergab, dass der *B. anthracis* Vollum im Vergleich zum *B. anthracis* Dobichau langsamer und der *Bcbva* Cl verglichen mit dem *Bcbva* CA schneller zu versporen scheint.

Beim Betrachten der relativen Genexpressionen der Zielgene bei den *B. anthracis*-Stämmen fällt auf, dass die Expressionen der frühen Sporulationsgene (*sigF*, *spoVG*, *spoIIE*, *sigE*) bei *B. anthracis* Dobichau zu beiden Untersuchungszeitpunkten nicht mehr signifikant waren, jedoch die im späteren Verlauf der Sporulation essentiellen Gene (*spoIIID*, *sigG*, *sigK*, *murF*, *cotD*, *cotZ1*, *sasP1*) entweder an t_1 bzw. t_2 oder zu beiden Zeitpunkten stark exprimiert wurden. Beim *B. anthracis* Vollum hingegen zeigten sich zum Zeitpunkt t_1 noch Expressionsanstiege der frühen Sporulationsgene, wohingegen die Mehrheit der Gene, die nach der Aktivierung des Regulatorgens *spoIIID* exprimiert werden, erst nach 7 h (t_2) eine Steigerung verzeichneten (s. Abbildung 31, S. 111). Leiser *et al.* [178] und Norris *et al.* [179] demonstrierten in ihren Studien an *B. anthracis*, dass Wildstämme schneller wachsen als Laborstämme (u.a. *B. anthracis* Vollum), was eine stärkere Reaktion auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen darstellt. Die Sporulation war bei diesen Wildstämmen im Vergleich zu Laborstämmen ebenfalls signifikant schneller. Daraus wurde geschlossen, dass Wildstämme als Reaktion auf Nährstofflimitierung in der Lage sind, schneller zu sporulieren, während bei Laborstämmen die Geschwindigkeit, mit der sie die Nährstoffe nutzen, abnimmt und die Zeit bis zur Sporulation zunimmt. Der wahrscheinliche Grund für diese Anpassung ist die Tatsache, dass Laborbedingungen weit von dem selektiven Druck in der Umwelt entfernt sind. Trotz dessen, was als solide mikrobiologische Techniken seitens der Forscher angenommen wird, reagieren Laborstämme unweigerlich auf den selektiven Druck in ihrer Umgebung. Im Gegensatz dazu sporulieren Zellen von Wildtypstämmen notwendigerweise als Teil des Infektionszyklus des Wirts. Somit ist zu erwarten, dass sie effizient sporulieren, da sie keine Zeit hatten, sich an günstige Laborbedingungen anzupassen. Diese Beobachtungen und Rückschlüsse lassen sich auf die vorliegenden Ergebnisse der *B. anthracis*-Stämme übertragen. Bei *B. anthracis* Dobichau handelt es sich um ein Wildtypisolat, das kaum unter Laborbedingungen passagiert wurde, wohingegen *B. anthracis* Vollum als häufig verwendeter Laborstamm augenscheinlich eine Adaptation hinsichtlich des Sporulationsverhaltens aufgrund nährstoffreicher Anzuchtbedingungen durchgemacht hat. Auch die beobachteten

niedrigeren Expressionsraten der Zielgene bei *B. anthracis* Vollum im Vergleich zu *B. anthracis* Dobichau könnten auf diese Erklärung zurückzuführen sein.

Interessanterweise konnten Leiser *et al.* das Protein MurF in ihrer durchgeführten Proteomanalyse nur in *B. anthracis*-Wildstämmen nachweisen [178]. Das Protein ist teilweise verantwortlich für die σ^K -abhängige Akkumulation von Peptidoglykan-Vorläufern während der Cortex-Bildung der Spore [234]. Die Expression von *murF* als spät aktiviertes Sporulationsgen war bei *B. anthracis* Dobichau zum Zeitpunkt t_2 signifikant, während bei *B. anthracis* Vollum nur ein Expressionsabfall unter die Signifikanzgrenze von t_1 zu t_2 festgestellt werden konnte (s. Abbildung 31, S. 111).

Überraschenderweise ergab sich auch beim Vergleich der beiden *Bcbva*-Stämme ein unterschiedliches transkriptionelles Profil im zeitlichen Verlauf der analysierten Sporulationsgene. Die Daten für den *Bcbva* CI zeigten, dass für den zweiten Untersuchungszeitpunkt nur Expressionsanstiege der späten Sporulationsgene (ab *spoIIID*) verzeichnet wurden. Im Gegensatz dazu exprimierte der *Bcbva* CA zum Zeitpunkt t_2 frühe Gene wie *sigF*, *spoIIE* oder *sigE* (s. Abbildung 32, S. 113). Daraus kann geschlossen werden, dass die Kultur von *Bcbva* CA heterogener in Bezug auf die Entwicklungsstadien der Zellen zu sein schien. Offensichtlich war die Initiation der Sporulation bei *Bcbva* CI zwischen 5 h und 6 h Wachstumdauer abgeschlossen, während es bei *Bcbva* CA zum Zeitpunkt t_2 (6 h) noch Zellen gab, die erst dann in die Versporung eintraten. Bei beiden untersuchten *Bcbva*-Stämmen handelt es sich um die Ursprungsisolat und somit Wildstämme, sodass nicht von einer unterschiedlichen Anpassung an Laborbedingungen ausgegangen werden kann. Hier sollten die Genexpressionsanalysen an mehreren *Bcbva* CI- und *Bcbva* CA-Isolaten durchgeführt werden, um auszuschließen, dass es sich um Isolat-spezifische Unterschiede handelt.

4.3.2.2 Vergleich der Genexpression zwischen den untersuchten *Bcbva*-Wildtypisolaten und den *Bcbva*-Sporulationsmutanten

Neben der Analyse der neuartigen *Bcbva*-Stämme und den klassischen *B. anthracis*-Stämmen, von denen die generierten Daten im nächsten Kapitel miteinander verglichen werden, wurden ebenso zwei spontane *Bcbva*-Sporulationsmutanten untersucht. Bei Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von ZBS2 traten nach Subkultivierung von *Bcbva* CI und CA auf verschiedenen Nährmedien vier spontane Mutanten auf (CI-12, CA-2, CA-4, CA-23), die die Fähigkeit zur Bildung hitzebeständiger (30 min 65 °C) Sporen verloren hatten (S. Klee, persönliche Mitteilung). Für die Analyse der Sporulation wurden die zwei Sporulationsmutanten *Bcbva* CI-12 und *Bcbva* CA-2 ausgewählt. Anhand von Illumina-Sequenzierungen konnten in Voruntersuchungen die Positionen der Gendefekte in den sporulationsdefizienten Stämmen identifiziert werden, die in der vorliegenden Dissertation

mittels Sanger-Sequenzierung nochmals überprüft und bestätigt wurden. Bei *Bcbva* CI-12 liegt eine Frameshift-Mutation im *spo0A*-Gen vor und ein daraus resultierendes vorzeitiges Stopcodon nach Aminosäure 194. Es ist bekannt, dass bei Sporulationsmutanten von *B. anthracis* am häufigsten eine Mutation im Gen *spo0A* vorkommt, dem Hauptregulator für den Übergang vom vegetativen Wachstum zur Sporulation [235]. Sastalla *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass mehrere spontane *spo0A*-Mutanten verschiedene Mutationen im DNA-Bindungsmotiv (lokalisiert zwischen den Aminosäuren 205 und 236) aufwiesen, was zu einem kompletten Verlust der regulatorischen Funktion von Spo0A führt und die Bakterien dadurch ihre Fähigkeit zur Sporulation vollständig verlieren [235]. Durch die Mutation im *spo0A*-Gen von *Bcbva* CI-12 fehlt das DNA-Bindemotiv komplett, sodass auch hier die gänzliche Inaktivierung der Sporulationsfähigkeit eintritt.

Die Mutation bei *Bcbva* CA-2 befindet sich in Form eines vorzeitigen Stopcodons im *spoVG*-Gen. Erst kürzlich wurde in den Arbeiten von Chen *et al.* festgestellt, dass SpoVG eine unverzichtbare Funktion bei der Sporenbildung von *B. anthracis* besitzt [236]. Es handelt sich um einen pleiotropen Regulator, der die Expression des Membranproteins SpoIIIE moduliert, das wiederum die asymmetrische Septumteilung initiiert. Demzufolge ist SpoVG in den ersten Schritten des Sporulationszyklus involviert. Obgleich die *spoVG*-Sequenz innerhalb der *Bacillus*-Spezies hochkonserviert ist, führt die Mutation im *spoVG*-Gen ausschließlich bei *B. anthracis* zur Verhinderung der Sporulation von Bakterien [236]. Anhand der Daten der vorliegenden Genexpressionsstudie zur Sporenbildung kann belegt werden, dass die beiden Mutationen auch in den untersuchten *Bcbva*-Sporulationsmutanten eine Versporung der Bakterienzellen verhindern. Im Vergleich zu den *Bcbva*-Wildtypisolaten waren bei *Bcbva* CI-12 und *Bcbva* CA-2 keine oder nur minimal signifikant erhöhte Expressionssteigerungen bei allen untersuchten Sporulationsgenen festzustellen (s. Abbildung 33, S. 114). Bei den leichten Expressionsanstiegen, die bei einigen Genen zu den Untersuchungszeitpunkten beobachtet werden konnten, könnte es sich um Hintergrundexpressionen handeln. Die Gene werden zwar transkribiert, durch die fehlende regulatorische Kaskade der frühen exprimierten Gene bzw. Regulatoren kommt es jedoch nicht zur Initiation der Sporenbildung. Beispielsweise wird der Sigmafaktor σ^F , für den beim *Bcbva* CI-12 eine 11-fache Erhöhung der Genexpression auftrat, durch den phosphorylierten Regulator Spo0A (Spo0A-P) kontrolliert. SigF wird vor der Bildung des asymmetrischen Septums in der Vorspore produziert, jedoch bis zur Fertigstellung des Septums durch den Antisigma-Faktor SpoIIAB in einem inaktiven Zustand gehalten. Zur Freisetzung von SigF kommt es erst, wenn die Phosphatase SpoIIIE den Antiantisigma-Faktor SpoIIAA dephosphoryliert [237, 238]. Ist dieses regulatorische Netzwerk gestört, kann die hierarchisch und zeitlich streng ablaufende Genexpression, die für die Sporulation bei *Bacillus* notwendig ist, nicht stattfinden. Der Verlust der Sporulationsfähigkeit von *Bcbva* CI-12 und

Bcbva CA-2 wurde zusätzlich durch die Gram- und Rakettenpräparate sowie in der Elektronenmikroskopie (s. Abbildung 35, S. 119) bestätigt.

4.3.2.3 Vergleich der Genexpression zwischen den untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen

Abschließend werden die Ergebnisse zwischen den untersuchten *Bcbva*-Wildtypstämmen und den *B. anthracis*-Stämmen miteinander verglichen. Dabei kann allgemein festgestellt werden, dass die beiden *Bcbva*-Isolate schneller zu versporen scheinen als die zwei *B. anthracis*-Stämme. Zusätzlich zeichnet sich das Bild ab, dass in den *Bcbva*-Kulturen in Bezug auf die Zellentwicklung heterogenere Zustände vorlagen, d.h. es gab Zellen, die sich zu beiden Zeitpunkten in verschiedenen Entwicklungsstadien der Sporulation befanden. Im Gegensatz zu den *B. anthracis*-Stämmen gab es bei *Bcbva* mehr „Nachzüglerzellen“, die später mit der Versporung begannen. Die *B. anthracis*-Stämme wirkten dahingehend homogener. Hier trat die Versporung der Bakterien zwar zu einem späteren Zeitpunkt ein, jedoch lag der Großteil der Zellen im gleichen Sporulationsstadium vor. Diese Erkenntnisse beruhen nicht nur auf der Auswertung der relativen Quantifizierung der Genexpressionen der einzelnen Zielgene, sondern resultieren aus der Kombination dieser Daten mit den Ergebnissen aus der Quantifizierung der Sporulationsstadien anhand der Elektronenmikroskopie (s. 3.3.2.1).

Bei der Bewertung der Genexpressionsanalysen zwischen den Spezies ist stets zu beachten, dass die RNA für die Untersuchungszeitpunkte der *Bcbva*-Stämme ($t_1 = 5$ h und $t_2 = 6$ h) jeweils eine Stunde früher im bakteriellen Wachstum extrahiert wurde als bei den *B. anthracis*-Stämmen ($t_1 = 6$ h und $t_2 = 7$ h). Somit ist beispielsweise beim Vergleich von *Bcbva* CI und *B. anthracis* Vollum deutlich zu erkennen, dass das *Bcbva*-Isolat nach 6 h (t_2) keine frühen, sondern späte Sporulationsgene stärker exprimierte, wohingegen beim *B. anthracis*-Stamm nach der gleichen Wachstumsdauer (hier aber t_1) noch die verantwortlichen Gene für die Sporulationsinitiation hochreguliert wurden. Werden in diese Betrachtung die Daten des *Bcbva* CA mit einbezogen, so wird deutlich, dass es bei diesem Isolat zu beiden Untersuchungszeitpunkten einen signifikanten Expressionsanstieg von *sigF*, *spolIE* und *sigE* gab. Hier scheint ein Teil der Zellpopulation später zu versporen, die als „Nachzügler“ bezeichnet werden. Bei *B. anthracis* Dobichau war anhand der Expressionsraten festzustellen, dass die ersten Stadien der Genexpressionskaskade für die Sporenbildung bereits abgeschlossen waren. Es könnte vermutet werden, dass die Sporulationskinetik der von *Bcbva* ähnelt, wenn die Untersuchungszeitpunkte die gleichen Zeitpunkte in der Wachstumskurve widerspiegeln würden (Vergleich s. Abbildung 31 und Abbildung 32, S. 111 und S. 113). Ein Blick auf die Quantifizierung der Sporulationsstadien zeigt jedoch, dass es eine zeitliche Verzögerung von einer Stunde, analog zum Eintritt in die stationäre Phase, beim Sporulationsbeginn der Zellen von *B. anthracis* Dobichau im Vergleich zu *Bcbva* CI gab

(Vergleich s. Tabelle 29 und Tabelle 30, S. 118). Während sich die Zellen vom *Bcbva* CI bereits nach 5 h am Beginn des Engulfments befanden, trat dieses Entwicklungsstadium bei *B. anthracis* Dobichau erst nach 6 h Wachstumsdauer ein. Zellen mit einem abgeschlossenen Engulfment und einer beginnenden Sporendifferenzierung waren bei dem *Bcbva*-Isolat ebenfalls eine Stunde früher existent. Allerdings glichen sich die prozentualen Anteile an Zellen, die sich im gleichen Sporulationsstadium befanden, zwischen dem untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Vertreter nach 7 h wieder an. Die Ergebnisse dieser Analyse lassen vermuten, dass *Bcbva*-Stämme schneller auf nährstofflimitierende Umgebungsbedingungen mit der Versporung der Bakterien reagieren als der klassische *B. anthracis*. Wenn die gewonnenen Daten aus der Expressionsanalyse direkt mit denen der Quantifizierung der Sporulationsstadien mittels Elektronenmikroskopie für die entsprechenden Stämme verglichen werden, zeichnen sich Übereinstimmungen der Ergebnisse aus den zwei Analysen ab. Zeitlich gesehen befindet sich die Sporulation bei *B. anthracis* Dobichau zum Zeitpunkt t_1 bereits im Stadium des beginnenden Engulfments (Expression von *spoIIID*), wobei auch ein paar Zellen mit einem abgeschlossenen Engulfment vorliegen (Expression von *sigG*). Zum Zeitpunkt t_2 dominieren die zwei Stadien des abgeschlossenen Engulfments und der Sporendifferenzierung inklusive der Bildung des Cortex und der Sporenhülle (Expression u.a. von *sigK*, *cotZ1* und *sasP1*). Bei *Bcbva* CI ergibt sich für die beiden Untersuchungszeitpunkte ein ähnliches Bild, sodass sich die zeitlichen Expressionen der untersuchten Sporulationsgene mit den sich im dazugehörigen Entwicklungsstadium befindlichen Zellen nach der Betrachtung im Elektronenmikroskop decken.

Interessanterweise wurde im Gegensatz zu *B. anthracis* Dobichau beim *Bcbva* CI ein sehr hoher Anteil an lytischen Zellen beobachtet. Bei *B. subtilis* kann während der frühen Ereignisse der Sporulation, bevor der Prozess irreversibel wird, ein Teil der Zellen extrazelluläre Faktoren produzieren, um den Tod anderer Zellen in der Population zu induzieren und Schwesterzellen zu "kannibalisieren". Diese setzen Nährstoffe frei, was zu einer Verzögerung (oder vollständigen Blockierung) der Sporulation führt. Der Prozess der Sporulation wird irreversibel, wenn die versporenden Zellen ein asymmetrisches polares Septum bilden. Dieser Kannibalismus bietet verschiedene Vorteile für die bakterielle Gemeinschaft. Der Sporenbildungsprozess benötigt viel Energie und Zeit, um abgeschlossen zu werden. Außerdem kehren Sporen bei Verfügbarkeit von Nährstoffen nicht so effizient zum aktiven Wachstum zurück wie vegetative Zellen. In Abwesenheit von Kannibalismus sporulieren alle Bakterien zur gleichen Zeit, und daher ist die Rückkehr zum vegetativen Leben langsamer und komplexer. Darüber hinaus gewinnen die Bakterien in einer gemischten Gemeinschaft, in der sie mit anderen Arten konkurrieren, nicht nur Ernährungsvorteile durch den Verzehr ihrer Geschwister, sondern können auch potenzielle Konkurrenten und Fressfeinde eliminieren [239]. Sastalla und Leppla beschreiben in ihrem Review, dass die Zellen des *B. anthracis*-

Stammes BH460, bei dem es sich um eine *spo0A*-Mutante handelt, den alternativen Zelltod aufgrund der fehlenden Initiation der Sporulation eingehen [240]. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die elektronenmikroskopische Untersuchung der Mutanten *Bcbva* CI-12 und *Bcbva* CA-2, bei denen nach 24 h keine Sporen auftraten, sondern viele lysierte Zellen vorlagen. Jedoch wird es als eher unwahrscheinlich angesehen, dass es sich bei dem hohen Anteil an lytischen Zellen bei den Wildtypen um spontane Sporulationsmutanten innerhalb der *Bcbva*-Population handelt.

Ein weiteres Augenmerk wurde auf den Einfluss der Insertion im *sigK*-Gen bei den *Bcbva*-Stämmen in Hinblick auf die Sporulationsfähigkeit und -geschwindigkeit gelegt. Wie bereits in Kapitel 1.6 erwähnt, besitzen die *Bcbva*-Isolate wie *B. subtilis* im für die Sporulation essentiellen *sigK*-Gen eine 22 kb lange Insertion, die über einen reziproken Rekombinationsvorgang während der Sporulation ausgeschnitten wird. Bei *B. anthracis* ist solch eine Insertion nicht vorhanden. Bei *Bcbva* wird das *sigK*-Gen in ein 195 bp großes 5'-Fragment und ein 519 bp großes 3'-Fragment geteilt. Die Insertion hat die gleiche Orientierung wie bei *B. subtilis*, und das Gen für die Rekombinase überlappt leicht mit dem 5'-Bereich des *sigK*-Gens [93]. Die kodierenden Bereiche des Gens werden nach dem Ausschneiden verknüpft und die Insertion in Form eines zirkulären Moleküls aus dem Chromosom entfernt. Da der Rekombinationsvorgang nur in der Mutterzelle stattfindet, erhält die Spore ein *sigK*-Gen, in dem die Insertion noch vorhanden ist. Auch bei einer Vielzahl von *Clostridium difficile* Stämmen und im Genom von *Clostridium tetani* wurde eine Prophagen-ähnliche Insertion im *sigK*-Gen gefunden [241]. Aufgrund der Unterschiede bei der Aktivierung des Sigma-Faktors σ^K durch das Vorliegen einer Insertion im *sigK*-Gen liegt die Vermutung nahe, dass es Differenzen in der zeitlichen Abfolge der Genexpression während der Sporulation bei *B. anthracis* und *Bcbva* gibt. Die vorliegenden Daten deuten jedoch darauf hin, dass das Ausschneiden der Insertion aus dem *sigK*-Gen kein zeitlich limitierender Faktor zu sein scheint. Die Versporung der Zellen trat in den durchgeführten Untersuchungen bei den *Bcbva*-Isolaten trotz des Rekombinasevorganges sogar schneller ein als bei den *B. anthracis*-Stämmen.

Zum Schluss wurden die generierten Daten der zeitlichen Expressionen der analysierten Sporulationsgene mit den Ergebnissen aus den Microarray-Studien von Liu *et al.* [116] und Bergman *et al.* [197] an *B. anthracis* Sterne verglichen. In den beiden Veröffentlichungen werden fünf „Wellen der Genexpression“ während des exponentiellen Wachstums bis zur Sporulation beschrieben. Es wurde überprüft, ob die Zeitpunkte der Expressionen der untersuchten Zielgene mit den in der Literatur angegebenen „Waves“ korrelieren. Es ist anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit nicht wie in den Veröffentlichungen die Genexpression über die komplette Wachstumskurve untersucht wurde. Stattdessen wurde die relative transkriptionelle Aktivität der Zielgene zu zwei Zeitpunkten analysiert, die den Wellen

4 und 5 aus den beiden Studien entsprechen. Von daher ist ein Vergleich der Ergebnisse nur begrenzt möglich. Eine Gegenüberstellung der zeitlichen Expressionen der untersuchten Sporulationsgene ist der Tabelle 32 zu entnehmen.

Für die frühen Sporulationsgene konnte in der vorliegenden Arbeit vermehrt keine signifikante Expressionssteigerung zu den beiden Untersuchungszeitpunkten festgestellt werden, weshalb sie weder Welle 4 noch Welle 5 zugeordnet werden können. Hier tritt eine Hochregulation der Genexpression in einer früheren Wachstumsphase ein, sodass davon auszugehen ist, dass diese Gene auch in Welle 2 oder Welle 3 exprimiert werden würden. Das *sigB*-Gen für den Sigmafaktor der generellen Stressantwort war nur bei *Bcbva* CI zum Zeitpunkt t_1 (5 h), wahrscheinlich aufgrund der nährstoffarmen Wachstumsbedingungen, stärker exprimiert, verhinderte aber nicht die Sporulationsinitiation. Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt lag die Expressionsrate von *sigB* wieder unter der Signifikanzgrenze. Die Gene *sigF* und *spoVG* wurden in den zwei veröffentlichten Studien in Welle 2 und 3 exprimiert, in der vorliegenden Analyse konnten die Expressionen auch noch nach einer späteren Inkubationsdauer bei *B. anthracis* Vollum und *Bcbva* CA bestimmt werden. Dies schließt jedoch nicht aus, dass bei diesen Stämmen bereits ein Expressionsanstieg zu früheren Zeitpunkten in der Wachstumskurve hätte beobachtet werden können. Auffällig ist, dass es bei der Expression der Gene *spolIE* und *sigE* zwischen der Analyse von Liu *et al.* und Bergman *et al.* zu Diskrepanzen bzgl. der Zugehörigkeit zu den definierten Wellen kommt. Die Ergebnisse der vorliegenden Analyse korrelieren hier eher mit den Daten von Bergman *et al.*, die eine Expression der beiden Gene erst in Welle 4 beschreiben. Ansonsten ist festzustellen, dass ab der Expression des für den wichtigen Sporulationsregulators kodierenden Gens *spolIID* die zeitliche Zugehörigkeit zu den beschriebenen Wellen übereinstimmt. Die späten Sporulationsgene wurden in ähnlichen Zeitfenstern während der Wachstumskurve (bzw. während des Sporulationsvorganges) exprimiert und gehören damit den Genexpressionswellen 4 und 5 an.

Da das Gen für die Rekombinase (BACI_c43240), die für das Ausschneiden der Insertion aus dem *sigK*-Gen bei *Bcbva* verantwortlich ist, bei *B. anthracis* nicht vorkommt, wurde es in den Literaturvergleich nicht mit einbezogen.

Tabelle 32: Vergleich der zeitlichen Genexpression der untersuchten Sporulationsgene mit den Ergebnissen von Liu *et al.* und Bergman *et al.*

Die fünf „Wellen der Genexpression“ mit der korrespondierenden bakteriellen Wachstumsdauer wurden in den Studien anhand des *B. anthracis* Sterne definiert.

Gen-name	Liu <i>et al.</i> , 2004		Bergman <i>et al.</i> , 2006		vorliegende Analyse Wachstumsdauer (h) / Zeitpunkt			
	„Welle“	Wachstumsdauer (h)	„Welle“	Wachstumsdauer (h)	<i>B. anthracis</i>		<i>Bcbva</i>	
					Vollum	Dobichau	CI	CA
<i>sigB</i>	2	3 - 4	2	1 - 4	k.E.	k.E.	5 / t ₁	k.E.
<i>sigF</i>	2		3	3 - 6	6 / t ₁	k.E.	k.E.	5 + 6 / t ₁ + t ₂
<i>spoVG</i>	2		3		6 / t ₁	k.E.	5 / t ₁	k.E.
<i>spolIE</i>	2		4	4,5 - 8	6 / t ₁	k.E.	5 / t ₁	5 + 6 / t ₁ + t ₂
<i>sigE</i>	3	4 - 5	4		6 / t ₁	k.E.	5 / t ₁	5 + 6 / t ₁ + t ₂
<i>spolIID</i>	4	4,5 - 7	4		6 + 7 / t ₁ + t ₂	6 + 7 / t ₁ + t ₂	5 + 6 / t ₁ + t ₂	6 / t ₂
<i>sigG</i>	4		4		6 + 7 / t ₁ + t ₂	6 + 7 / t ₁ + t ₂	5 + 6 / t ₁ + t ₂	5 + 6 / t ₁ + t ₂
<i>sigK</i>	5	5,5 - 7	4		7 / t ₂	6 + 7 / t ₁ + t ₂	5 + 6 / t ₁ + t ₂	6 / t ₂
<i>murF</i>	5		fehlt		6 / t ₁	7 / t ₂	5 / t ₁	k.E.
<i>cotD</i>	5		5	5 - 8	6 / t ₁	7 / t ₂	5 + 6 / t ₁ + t ₂	5 + 6 / t ₁ + t ₂
<i>cotZ1</i>	5		5		6 + 7 / t ₁ + t ₂	6 + 7 / t ₁ + t ₂	5 + 6 / t ₁ + t ₂	5 + 6 / t ₁ + t ₂
<i>sasP1</i>	5	5	6 + 7 / t ₁ + t ₂		6 + 7 / t ₁ + t ₂	5 + 6 / t ₁ + t ₂	5 + 6 / t ₁ + t ₂	

k.E. = keine Expression zu den Untersuchungszeitpunkten t₁ oder t₂

Zusammenfassend sollte festgehalten werden, dass die beobachteten Unterschiede bezüglich der Kinetik der Genexpression der untersuchten Zielgene und die daraus geschlussfolgerte schnellere Sporulationsfähigkeit der *Bcbva*-Isolate auch auf stammspezifische Ursachen zurückzuführen sein könnten. Es wurden zu wenige Stämme getestet, um eine eindeutige Aussage darüber zu treffen, ob sich die Sporulation hinsichtlich der zeitlichen Genexpression und -regulation zwischen *B. anthracis* und *Bcbva* ähnelt oder deutlich voneinander unterscheidet. Jedoch sind klare Tendenzen erkennbar, die in weiteren Analysen mit einer höheren Anzahl an Stämmen verifiziert werden sollten. Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten in Hinblick auf die Morphologie der Sporentwicklung keine Unterschiede zwischen den Vertretern von *B. anthracis* und *Bcbva* festgestellt werden (s. Abbildung 34, S. 116).

5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei vergleichende Analysen an dem neuartigen Erreger *Bcbva* und dem klassischen Milzbranderreger *B. anthracis* unter wirtsähnlichen sowie Sporulationsbedingungen durchgeführt. Die daraus gewonnenen Ergebnisse stellen eine solide Grundlage für weitere spezifische Untersuchungen dar.

Anhand der durchgeführten Transkriptomanalyse konnten sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in der Hoch- bzw. Herunterregulation von Genen, auch in Hinblick auf die Anzahl an differentiell regulierten Genen, festgestellt werden. Dazu zählten sowohl bekannte Virulenzfaktoren als auch Gene, die eine potentielle Rolle im Pathogenitätsgeschehen der Bakterien spielen könnten. Besonders auffällig war die Diskrepanz der transkriptionellen Aktivität zwischen den beiden untersuchten *Bcbva*-Isolaten. Weiterführende Auswertungen der generierten Daten sind hier erforderlich, um mehr Informationen zu den identifizierten Genen zu erhalten. Es sollten Untersuchungen zur funktionellen Bestimmung hypothetischer Genprodukte durchgeführt werden, um die Bedeutung differentiell exprimierter Gene für die Virulenz der Bakterien zu klären. Im Vordergrund sollte auch die einzelne Betrachtung der differentiell regulierten Plasmidgene und ihrer Genprodukte stehen, da neben den bekannten plasmid-kodierten Toxinen und Kapsel(n) die Expression weiterer plasmid-lokalisierter Gene während der Infektion im Wirt eine Rolle spielen könnten. Zur Aufklärung der unterschiedlichen Genregulation und -expression innerhalb der *Bcbva*-Spezies sollte zukünftig die Zahl der untersuchten Isolate von der Elfenbeinküste (CI) und aus Kamerun (CA) erhöht werden, um perspektivisch eine weitere Transkriptomanalyse spezifisch mit *Bcbva*-Stämmen durchzuführen. Interessant wäre in dem Zusammenhang ebenfalls ein „dual RNA-Seq“ Experiment, bei dem die RNA-Isolierung z.B. während der Infektion von Makrophagen stattfindet. Voruntersuchungen deuten auch hier auf Unterschiede im Verhalten von *Bcbva* und *B. anthracis* hin. Die parallele Untersuchung von Bakterien und Wirtszellen stellt im Rahmen der Milzbrandforschung noch eine attraktive und erforderliche Neuheit dar. Um der Fragestellung nachzugehen, ob es sich bei den ausschließlich in den *Bcbva*-Stämmen hochregulierten Genen um Virulenzfaktoren handelt, sollten anhand der erhobenen Daten gezielt Gene ausgesucht und spezifisch Deletionsmutanten hergestellt werden. Hierfür wurde bereits im Rahmen der Doktorarbeit mit der Etablierung eines CRISPR/Cas-Protokolls begonnen. Im Vordergrund der zukünftigen *Bcbva*-Forschung steht die Weiterführung der bisher geleisteten Arbeiten, mit dem Ziel, relativ einfach und in hohem Durchsatz Deletionsmutanten erzeugen zu können.

Die durchgeführte Sekretomanalyse führte zur Detektion mehrerer spezifisch sekretierter Proteine der *Bcbva*-Isolate. Aufgrund von Sequenzanalysen kann in der vorliegenden Arbeit keine Aussage dazu getroffen werden, ob sich unter ihnen ein weiteres spezifisches Erreger-

Antigen befindet. Wie bereits in Kapitel 4.2.2 beschrieben, stünde als Alternativmethode die Immunopräzipitation mit Hilfe magnetischer Protein-G Beads zur Verfügung, mit der spezifisch Antigene eluiert und massenspektrometrisch identifiziert werden können.

Die Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR und $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode zur Kinetik der Sporenbildung bei *Bcbva* und *B. anthracis* zeigten, dass die Initiation der Sporulation bei den *Bcbva*-Stämmen schneller einzutreten scheint als bei *B. anthracis*. Dabei hatte der Rekombinationsvorgang zum Ausschneiden der Insertion aus dem *sigK*-Gen bei *Bcbva* scheinbar keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Sporulation. Jedoch sollte hierbei nur von erkennbaren Tendenzen gesprochen werden. Um eine genaue Einschätzung abgeben zu können, sollte auch hier, wie bei der Transkriptomanalyse unter wirtsähnlichen Bedingungen, die Anzahl der untersuchten Isolate von *Bcbva* und *B. anthracis* erhöht werden, um einen repräsentativen Überblick zur Kinetik der Sporulation zu bekommen. Ein limitierender Faktor stellt dabei sicherlich die Arbeit in einem S3-Labor dar, da die experimentelle Durchführung mit vielen Stämmen und Isolaten sowohl einen hohen Zeit- als auch Sicherheitsaufwand bedeutet. Die durchgeführten Expressionsanalysen konnten die transkriptionelle Aktivität einer überschaubaren Auswahl an Sporulationsgenen beleuchten. Interessant wäre die Realisierung einer RNA-Sequenzierung von sporulierenden Bakterien, was einen globalen Einblick in die Genexpression und -regulation während der Sporenbildung bei *Bcbva* und *B. anthracis* gewähren würde. Dafür müsste das in dieser Arbeit angewandte Protokoll zunächst angepasst werden, da Voruntersuchungen bereits gezeigt haben, dass sich die RNA-Extraktion aus versporenden Zellen hinsichtlich der Ausbeute an RNA als problematisch erweist.

Allgemein konnte anhand der durchgeführten Experimente eine solide Datengrundlage geschaffen werden, mit deren Hilfe zukünftig die Aufklärung von Pathogenitätsmechanismen besonders bei *Bcbva* ermöglicht wird. In Kombination mit weiterführenden und ergänzenden Analysen werden weitere Ähnlichkeiten und Unterschiede zum klassischen Milzbranderreger *B. anthracis* identifiziert werden können.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vorkommen von Milzbrand	7
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>B. anthracis</i>	8
Abbildung 3: Wirkungsweise der <i>B. anthracis</i> -Toxine	13
Abbildung 4: Zusammenspiel der Regulationswege für die Virulenzgenexpression bei <i>B. anthracis</i>	15
Abbildung 5: Modell für die Regulation der <i>atxA</i> -Genexpression unter Toxin- induzierenden und Sporulationsbedingungen	17
Abbildung 6: Herkunft und Verbreitung von <i>Bcbva</i>	20
Abbildung 7: mögliche Übertragungswege von <i>Bcbva</i> bei den befallenen Tierarten	21
Abbildung 8: Phylogenetische Analyse von <i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i>	22
Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer bakteriellen Spore	26
Abbildung 10: Lebenszyklus von <i>Bacillus</i> mit Keimung, vegetativem Wachstum und den morphologischen Veränderungen im Sporulationsprozess	28
Abbildung 11: Funktionsprinzip der Real-Time PCR	46
Abbildung 12: Workflow des NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kits (© New England Biolabs)	54
Abbildung 13: SCORE-Workflow	55
Abbildung 14: Workflow der SPEED-Methode	62
Abbildung 15: Wachstumskurven von <i>B. anthracis</i> und <i>Bcbva</i> in BHI-Medium unter O ₂ - und CO ₂ -Bedingung	69
Abbildung 16: Fragment Analyzer-Ergebnisse für die RNA-Proben von <i>B. anthracis</i> Dobichau, <i>Bcbva</i> CI und <i>Bcbva</i> CA	72
Abbildung 17: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR	73
Abbildung 18: PCA-Plots der normalisierten Expressionswerte von <i>B. anthracis</i> und <i>Bcbva</i>	75
Abbildung 19: Darstellung der chromosomal- und plasmid-lokalisierten DEG's	78
Abbildung 20: Venn-Diagramme der differentiell regulierten Gene in <i>B. anthracis</i> und <i>Bcbva</i>	79
Abbildung 21: Vergleich der Expressionsdaten aus der qRT-PCR und RNA- Sequenzierung	90
Abbildung 22: Wachstumskurven von <i>B. anthracis</i> und <i>Bcbva</i> in R-Minimalmedium	92
Abbildung 23: Wachstum von <i>B. anthracis</i> und <i>Bcbva</i> auf R-Minimalmedium Agar	93
Abbildung 24: Proteinnachweis aus Kulturüberständen mittels Silberfärbung	94
Abbildung 25: Nachweis von pXO2-60, Protektivem Antigen und Letalfaktor im Western Blot	95

Abbildung 26: Kapselnachweis aus Kulturüberständen von <i>B. anthracis</i> und <i>Bcbva</i>	97
Abbildung 27: Kapselnachweis aus Überständen von resuspendiertem Koloniematerial von <i>B. anthracis</i> und <i>Bcbva</i>	97
Abbildung 28: Volcano Plot der sekretierten Proteine der <i>B. anthracis</i> - und <i>Bcbva</i> - Stämme	99
Abbildung 29: Wachstumskurven von <i>B. anthracis</i> und <i>Bcbva</i> in Medium G	105
Abbildung 30: Gram- und Rakettenfärbung von <i>Bcbva</i> CI	106
Abbildung 31: relative Quantifizierung der Sporulationsgene für <i>B. anthracis</i>	111
Abbildung 32: relative Quantifizierung der Sporulationsgene für <i>Bcbva</i>	113
Abbildung 33: relative Quantifizierung der Sporulationsgene für die <i>Bcbva</i> - Sporulationsmutanten.....	114
Abbildung 34: Sporulationsstadien von <i>B. anthracis</i> und <i>Bcbva</i> im Elektronenmikroskop...	116
Abbildung 35: Untersuchung der Sporulationsmutanten im Elektronenmikroskop	119
Abbildung 36: Quantifizierungsstrategien in der Real-Time RT-PCR.....	142
Abbildung 37: Bioanalyzer-Ergebnisse für die RNA-Proben von <i>B. anthracis</i> Vollum..	CLXXIX
Abbildung 38: Fragment Analyzer-Ergebnisse für die RNA-Proben von <i>B. anthracis</i> Dobichau, <i>Bcbva</i> CI und <i>Bcbva</i> CA nach der rRNA-Abreicherung mit dem Ribo-Zero® rRNA Removal Kit	CLXXX
Abbildung 39: Fragment Analyzer-Ergebnisse für die RNA-Proben von <i>B. anthracis</i> Dobichau, <i>Bcbva</i> CI und <i>Bcbva</i> CA nach der Herstellung der cDNA- Bibliotheken mit dem NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit.....	CLXXX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	verwendete Bakterienstämme	32
Tabelle 2:	verwendete Chemikalien	33
Tabelle 3:	verwendete Nährmedien.....	34
Tabelle 4:	verwendete Enzyme und Kits	36
Tabelle 5:	untersuchte Gene und verwendete Oligonukleotide.....	42
Tabelle 6:	Reaktionsansatz und Thermocycler-Bedingungen für die konventionelle PCR.....	44
Tabelle 7:	PCR-Ansätze und Thermocycler-Bedingungen der Real-Time PCR mit einer fluoreszierenden DNA-Sonde	46
Tabelle 8:	PCR-Ansätze und Thermocycler-Bedingungen der Real-Time PCR mit SYBR Green I.....	46
Tabelle 9:	Allgemeiner Ansatz für den DNase I-Verdau von RNA-Präparationen	49
Tabelle 10:	Allgemeiner Ansatz für die cDNA-Synthese von RNA-Präparationen mit spezifischen Primern	50
Tabelle 11:	Allgemeiner Ansatz für die cDNA-Synthese von RNA-Präparationen mit <i>random</i> Hexamer-Oligonukleotiden	51
Tabelle 12:	verwendete Primärantikörper.....	57
Tabelle 13:	verwendete Sekundärantikörper	57
Tabelle 14:	verwendete Antigene.....	57
Tabelle 15:	verwendete Software und Datenbanken	66
Tabelle 16:	RNA-Integritäten.....	71
Tabelle 17:	Übersicht über die Anzahl differentiell exprimierter Gene in <i>B. anthracis</i> und <i>Bcbva</i>	76
Tabelle 18:	Übersicht über die Anzahl chromosomal- und plasmid-lokalisierter DEG's.....	78
Tabelle 19:	Differentiell exprimierte Gene mit einem $\log_2FC \geq + 2$ (≥ 4 -fache Steigerung) in CO ₂ relativ zu O ₂ in allen vier <i>Bacillus</i> -Stämmen	83
Tabelle 20:	Differentiell exprimierte Gene mit einem $\log_2FC \geq 2$ (≥ 4 -fache Steigerung) in CO ₂ relativ zu O ₂ in den zwei <i>B. anthracis</i> -Stämmen	85
Tabelle 21:	Differentiell exprimierte Gene mit einem $\log_2FC \geq 2$ (≥ 4 -fache Steigerung) in CO ₂ relativ zu O ₂ in den zwei <i>Bcbva</i> -Stämmen.....	85
Tabelle 22:	Genauswahl für die qRT-PCR zur Verifizierung der RNA-Seq Daten.....	88
Tabelle 23:	Korrelation der Genexpression aus der qRT-PCR und RNA-Sequenzierung	91

Tabelle 24:	Übersicht über die Anzahl quantifizierter Proteine in den Zell- und Überstandsproben der <i>B. anthracis</i> - und <i>Bcbva</i> -Stämme. R = Replikat.	98
Tabelle 25:	Potentiell diskriminierende und sekretierte Proteine der zwei <i>Bcbva</i> -Stämme im Vergleich zu den <i>B. anthracis</i> -Stämmen	102
Tabelle 26:	Genauswahl für die qRT-PCR zur Untersuchung der Sporulation.....	107
Tabelle 27:	Referenz- und Untersuchungszeitpunkte für die relative Quantifizierung der Genexpression anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode	109
Tabelle 28:	definierte Sporulationsstadien in der Elektronenmikroskopie	115
Tabelle 29:	quantitative Auswertung der Stadienhäufigkeit für <i>B. anthracis</i> Dobichau....	118
Tabelle 30:	quantitative Auswertung der Stadienhäufigkeit für <i>Bcbva</i> Cl.....	118
Tabelle 31:	Vergleich der experimentellen Designs von drei publizierten Genexpressionsstudien an <i>B. anthracis</i> (und <i>B. cereus</i>) mit der vorliegenden Transkriptomanalyse	127
Tabelle 32:	Vergleich der zeitlichen Genexpression der untersuchten Sporulationsgene mit den Ergebnissen von Liu <i>et al.</i> und Bergman <i>et al.</i>	152
Tabelle 33:	Oligonukleotidsequenzen der verwendeten Primer und Sonden	CLXXVII
Tabelle 34:	Optische Dichte der Bakterienkulturen für die Wachstumskurven in BHI-Medium.....	CLXXVIII
Tabelle 35:	Optische Dichte der Bakterienkulturen für die RNA-Sequenzierung.....	CLXXIX
Tabelle 36:	RNA-Konzentrationen vor dem DNase I-Verdau.....	CLXXIX
Tabelle 37:	RNA-Konzentrationen nach dem DNase I-Verdau	CLXXIX
Tabelle 38:	Differentiell exprimierte Gene mit einem $\log_2\text{FC} \leq - 2$ (≥ 4 -fache Minderung) in CO_2 relativ zu O_2 in allen vier <i>Bacillus</i> -Stämmen.....	CLXXXI
Tabelle 39:	Differentiell exprimierte Gene mit einem $\log_2\text{FC} \leq - 2$ (≥ 4 -fache Minderung) in CO_2 relativ zu O_2 in den zwei <i>B. anthracis</i> -Stämmen	CLXXXI
Tabelle 40:	Differentiell exprimierte Gene mit einem $\log_2\text{FC} \leq - 2$ (≥ 4 -fache Minderung) in CO_2 relativ zu O_2 in den zwei <i>Bcbva</i> -Stämmen	CLXXXII
Tabelle 41:	Primerkombinationen mit den Fragmentgrößen und Amplifikationseffizienzen für die Validierung der Daten aus der RNA-Sequenzierung	CLXXXIV
Tabelle 42:	Optische Dichte der Bakterienkulturen für die Wachstumskurven in R-MM	CLXXXIV
Tabelle 43:	Optische Dichte der Bakterienkulturen für die Wachstumskurven in Medium G.....	CLXXXV
Tabelle 44:	Primerkombinationen mit den Fragmentgrößen und Amplifikationseffizienzen für die relative Quantifizierung der Genexpression bei der Analyse der Sporulation	CLXXXV

Tabelle 45:	relative Quantifizierung der Sporulationsgene bei den <i>B. anthracis</i> - Stämmen	CLXXXVI
Tabelle 46:	relative Quantifizierung der Sporulationsgene bei den <i>Bcbva</i> - Wildtypstämmen	CLXXXVI
Tabelle 47:	relative Quantifizierung der Sporulationsgene bei den <i>Bcbva</i> - Sporulationsmutanten.....	CLXXXVII
Tabelle 48:	Repräsentative Zählung an Zellen von <i>B. anthracis</i> Dobichau im gleichen Entwicklungsstadium während der Sporenbildung	CLXXXVII
Tabelle 49:	Repräsentative Zählung an Zellen von <i>Bcbva</i> CI im gleichen Entwicklungsstadium während der Sporenbildung	CLXXXVIII

Literaturverzeichnis

1. Ehling-Schulz, M., D. Lereclus, and T.M. Koehler, *The Bacillus cereus Group: Bacillus Species with Pathogenic Potential*. Microbiology Spectrum, 2019. **7**(3).
2. Guinebretiere, M.H., et al., *Bacillus cytotoxicus sp. nov. is a novel thermotolerant species of the Bacillus cereus Group occasionally associated with food poisoning*. Int J Syst Evol Microbiol, 2013. **63**(Pt 1): p. 31-40.
3. Jimenez, G., et al., *Description of Bacillus toyonensis sp. nov., a novel species of the Bacillus cereus group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations*. Syst Appl Microbiol, 2013. **36**(6): p. 383-91.
4. Miller, R.A., et al., *Bacillus wiedmannii sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic Bacillus cereus group species isolated from dairy foods and dairy environments*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016. **66**(11): p. 4744-4753.
5. Liu, Y., et al., *Proposal of nine novel species of the Bacillus cereus group*. Int J Syst Evol Microbiol, 2017. **67**(8): p. 2499-2508.
6. Ash, C., et al., *Comparative analysis of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA*. Int.J.Syst.Bacteriol., 1991. **41**(3): p. 343-346.
7. Rasko, D.A., et al., *Genomics of the Bacillus cereus group of organisms*. FEMS Microbiol.Rev., 2005. **29**(2): p. 303-329.
8. Roh, J.Y., et al., *Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control*. J.Microbiol.Biotechnol., 2007. **17**(4): p. 547-559.
9. Bravo, A., S.S. Gill, and M. Soberon, *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. Toxicon., 2007. **49**(4): p. 423-435.
10. Kolsto, A.B., N.J. Tourasse, and O.A. Okstad, *What sets Bacillus anthracis apart from other Bacillus species?* Annu. Rev. Microbiol., 2009. **63**: p. 451-476.
11. Helgason, E., et al., *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis - one species on the basis of genetic evidence*. Appl.Environ.Microbiol., 2000. **66**(6): p. 2627-2630.
12. Bottone, E.J., *Bacillus cereus, a volatile human pathogen*. Clin.Microbiol.Rev., 2010. **23**(2): p. 382-398.
13. Ehling-Schulz, M., et al., *Cereulide synthetase gene cluster from emetic Bacillus cereus: structure and location on a mega virulence plasmid related to Bacillus anthracis toxin plasmid pXO1*. BMC microbiology, 2006. **6**: p. 20.

14. Stenfors Arnesen, L.P., A. Fagerlund, and P.E. Granum, *From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins*. FEMS Microbiol.Rev., 2008. **32**(4): p. 579-606.
15. Han, C.S., et al., *Pathogenomic sequence analysis of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis isolates closely related to Bacillus anthracis*. J.Bacteriol., 2006. **188**(9): p. 3382-3390.
16. Read, T.D., et al., *The genome sequence of Bacillus anthracis Ames and comparison to closely related bacteria*. Nature, 2003. **423**(6935): p. 81-86.
17. Messelhäuser, U. and M. Ehling-Schulz, *Bacillus cereus—a Multifaceted Opportunistic Pathogen*. Current Clinical Microbiology Reports, 2018. **5**(2): p. 120-125.
18. Koch, R., *Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus anthracis*. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1876. **2**: p. 277-311.
19. Zydowicz, D., *Anthrax: a disease from antiquity visits the modern world*. Minn Med, 1998. **81**(7): p. 19-20.
20. Mock, M. and A. Fouet, *Anthrax*. Annu. Rev. Microbiol., 2001. **55**: p. 647-671.
21. Carlson, C.J., et al., *The global distribution of Bacillus anthracis and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife*. Nat Microbiol, 2019. **4**(8): p. 1337-1343.
22. *RKI Ratgeber Milzbrand (Anthrax)*. 2013 Stand 14.10.2013; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Anthrax.html.
23. Anaraki, S., et al., *Investigations and control measures following a case of inhalation anthrax in East London in a drum maker and drummer, October 2008*. Euro.Surveill., 2008. **13**(51): p. 19076.
24. Keim, P., et al., *Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales*. Infect.Genet.Evol., 2004. **4**(3): p. 205-213.
25. Keim, P. and K.L. Smith, *Bacillus anthracis evolution and epidemiology*. Curr.Top.Microbiol.Immunol., 2002. **271**: p. 21-32.
26. Doganay, M., G. Metan, and E. Alp, *A review of cutaneous anthrax and its outcome*. Journal of Infection and Public Health, 2010. **3**(3): p. 98-105.
27. Dixon, T.C., et al., *Anthrax*. N.Engl.J.Med., 1999. **341**(11): p. 815-826.
28. Cieslak, T.J. and E.M. Eitzen, Jr, *Clinical and epidemiologic principles of anthrax*. Emerg.Infect.Dis., 1999. **5**(4): p. 552-555.
29. Ringertz, S.H., et al., *Injectional anthrax in a heroin skin-popper*. The Lancet, 2000. **356**(9241): p. 1574-1575.

30. Grunow, R., et al., *Anthrax among heroin users in Europe possibly caused by same Bacillus anthracis strain since 2000*. Euro Surveill, 2013. **18**(13).
31. Ruckert, C., et al., *Draft genome sequence of Bacillus anthracis UR-1, isolated from a German heroin user*. Journal of bacteriology, 2012. **194**: p. 5997-5998.
32. Holzmann, T., et al., *Fatal anthrax infection in a heroin user from southern Germany, June 2012*. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, 2012. **17**.
33. Keim, P., et al., *Whole Genome Analysis of Injectional Anthrax Identifies Two Disease Clusters Spanning More Than 13 Years*. EBioMedicine, 2015. **2**(11): p. 1613-8.
34. Little, S.F. and B.E. Ivins, *Molecular pathogenesis of Bacillus anthracis infection*. Microbes.Infect., 1999. **1**(2): p. 131-139.
35. Zwartouw, H.T. and H. Smith, *Polyglutamic acid from Bacillus anthracis grown in vivo; structure and aggressin activity*. Biochem.J., 1956. **63**(3): p. 437-442.
36. Candela, T., M. Mock, and A. Fouet, *CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for Bacillus anthracis polyglutamate capsule synthesis*. J. Bacteriol., 2005. **187**(22): p. 7765-7772.
37. Fouet, A., *The surface of Bacillus anthracis*. Mol.Aspects Med., 2009. **30**(6): p. 374-385.
38. Jang, J., et al., *The poly-gamma-D-glutamic acid capsule of Bacillus anthracis enhances lethal toxin activity*. Infect.Immun., 2011. **79**(9): p. 3846-3854.
39. Goodman, J.W. and D.E. Nitecki, *Studies on the relation of a prior immune response to immunogenicity*. Immunology., 1967. **13**(6): p. 577-583.
40. Turnbull, P.C., *Anthrax vaccines: past, present and future*. Vaccine, 1991. **9**(8): p. 533-539.
41. Moayeri, M. and S.H. Leppla, *The roles of anthrax toxin in pathogenesis*. Curr Opin Microbiol, 2004. **7**(1): p. 19-24.
42. Bradley, K.A., et al., *Identification of the cellular receptor for anthrax toxin*. Nature, 2001. **414**(6860): p. 225-229.
43. Scobie, H.M., et al., *Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 2003. **100**(9): p. 5170-5174.
44. Mock, M. and T. Mignot, *Anthrax toxins and the host: a story of intimacy*. Cell Microbiol., 2003. **5**(1): p. 15-23.
45. Young, J.A. and R.J. Collier, *Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 243-65.

46. Vitale, G., et al., *Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKS and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKS in cultured macrophages*. J.Appl.Microbiol., 1999. **87**(2): p. 288.
47. Duesbery, N.S., et al., *Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor*. Science., 1998. **280**(5364): p. 734-737.
48. Banks, D.J., S.C. Ward, and K.A. Bradley, *New insights into the functions of anthrax toxin*. Expert.Rev.Mol.Med., 2006. **8**(7): p. 1-18.
49. Leppla, S.H., *Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1982. **79**(10): p. 3162-3166.
50. Kumar, P., N. Ahuja, and R. Bhatnagar, *Purification of anthrax edema factor from Escherichia coli and identification of residues required for binding to anthrax protective antigen*. Infect.Immun., 2001. **69**(10): p. 6532-6536.
51. Suerbaum, S., et al., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 9 ed. 2020, Springer, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 2020.
52. Koehler, T.M., Z. Dai, and M. Kaufman-Yarbray, *Regulation of the Bacillus anthracis protective antigen gene: CO₂ and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters*. J.Bacteriol., 1994. **176**(3): p. 586-595.
53. Fouet, A., *AtxA, a Bacillus anthracis global virulence regulator*. Res. Microbiol., 2010. **161**(9): p. 735-742.
54. Antelmann, H., et al., *The extracellular and cytoplasmic proteomes of the non-virulent Bacillus anthracis strain UM23C1-2*. Proteomics, 2005. **5**(14): p. 3684-95.
55. Chitlaru, T., et al., *Differential proteomic analysis of the Bacillus anthracis secretome: distinct plasmid and chromosome CO₂-dependent cross talk mechanisms modulate extracellular proteolytic activities*. J.Bacteriol., 2006. **188**(10): p. 3551-3571.
56. Lamonica, J.M., et al., *Comparative secretome analyses of three Bacillus anthracis strains with variant plasmid contents*. Infect.Immun., 2005. **73**(6): p. 3646-3658.
57. Walz, A., et al., *Bacillus anthracis secretome time course under host-simulated conditions and identification of immunogenic proteins*. Proteome.Sci., 2007. **5**: p. 11.
58. Fouet, A. and M. Mock, *Regulatory networks for virulence and persistence of Bacillus anthracis*. Curr. Opin. Microbiol., 2006. **9**(2): p. 160-166.
59. Saile, E. and T.M. Koehler, *Control of anthrax toxin gene expression by the transition state regulator abrB*. J.Bacteriol., 2002. **184**(2): p. 370-380.
60. Uchida, I., et al., *Cloning and characterization of a gene whose product is a trans-activator of anthrax toxin synthesis*. J.Bacteriol., 1993. **175**(17): p. 5329-5338.

61. Hoffmaster, A.R., et al., *Identification of anthrax toxin genes in a Bacillus cereus associated with an illness resembling inhalation anthrax*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2004. **101**(22): p. 8449-8454.
62. Klee, S.R., et al., *Characterization of Bacillus anthracis-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon*. J. Bacteriol., 2006. **188**(15): p. 5333-5344.
63. McCall, R.M., et al., *Bacillus anthracis virulence regulator AtxA binds specifically to the pagA promoter region*. J Bacteriol, 2019. **201**(23): p. e00569-19.
64. Dai, Z., et al., *The atxA gene product activates transcription of the anthrax toxin genes and is essential for virulence*. Mol.Microbiol., 1995. **16**(6): p. 1171-1181.
65. Drysdale, M., et al., *atxA controls Bacillus anthracis capsule synthesis via acpA and a newly discovered regulator, acpB*. J. Bacteriol., 2004. **186**(2): p. 307-315.
66. Dai, Z. and T.M. Koehler, *Regulation of anthrax toxin activator gene (atxA) expression in Bacillus anthracis: temperature, not CO₂/bicarbonate, affects AtxA synthesis*. Infect.Immun., 1997. **65**(7): p. 2576-2582.
67. Vietri, N.J., et al., *Identification and characterization of a trans-activator involved in the regulation of encapsulation by Bacillus anthracis*. Gene, 1995. **152**(1): p. 1-9.
68. Drysdale, M., A. Bourgoigne, and T.M. Koehler, *Transcriptional analysis of the Bacillus anthracis capsule regulators*. J.Bacteriol., 2005. **187**(15): p. 5108-5114.
69. Passalacqua, K.D., et al., *Comparative transcriptional profiling of Bacillus cereus sensu lato strains during growth in CO₂-bicarbonate and aerobic atmospheres*. PLoS.ONE., 2009. **4**(3): p. e4904.
70. Bongiorno, C., et al., *Dual promoters control expression of the Bacillus anthracis virulence factor AtxA*. J.Bacteriol., 2008. **190**(19): p. 6483-6492.
71. Hoffmaster, A.R. and T.M. Koehler, *The anthrax toxin activator gene atxA is associated with CO₂-enhanced non-toxin gene expression in Bacillus anthracis*. Infect.Immun., 1997. **65**(8): p. 3091-3099.
72. Mignot, T., M. Mock, and A. Fouet, *A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in Bacillus anthracis*. Mol.Microbiol., 2003. **47**(4): p. 917-927.
73. Hoffmaster, A.R. and T.M. Koehler, *Autogenous regulation of the Bacillus anthracis pag operon*. J.Bacteriol., 1999. **181**(15): p. 4485-4492.
74. Perego, M. and J.A. Hoch, *Commingling regulatory systems following acquisition of virulence plasmids by Bacillus anthracis*. Trends Microbiol., 2008. **16**(5): p. 215-221.

75. Dale, J.L., et al., *A Dual Role for the Bacillus anthracis Master Virulence Regulator AtxA: Control of Sporulation and Anthrax Toxin Production*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 482.
76. White, A.K., et al., *Sensor Domains Encoded in Bacillus anthracis Virulence Plasmids Prevent Sporulation by Hijacking a Sporulation Sensor Histidine Kinase*. J.Bacteriol., 2006. **188**(17): p. 6354-6360.
77. Agaisse, H., et al., *PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in Bacillus thuringiensis*. Mol.Microbiol., 1999. **32**(5): p. 1043-1053.
78. Gohar, M., et al., *The PlcR virulence regulon of Bacillus cereus*. PLoS ONE, 2008. **3**(7): p. e2793.
79. Lereclus, D., et al., *Identification of a Bacillus thuringiensis gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase*. J.Bacteriol., 1996. **178**(10): p. 2749-2756.
80. Slamti, L., et al., *Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the Bacillus cereus group are nonhemolytic*. J.Bacteriol., 2004. **186**(11): p. 3531-3538.
81. Mignot, T., et al., *The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in Bacillus anthracis*. Mol. Microbiol., 2001. **42**(5): p. 1189-1198.
82. Gohar, M., et al., *A comparative study of Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis and Bacillus anthracis extracellular proteomes*. Proteomics., 2005. **5**(14): p. 3696-3711.
83. Sastalla, I., et al., *Activation of the latent PlcR regulon in Bacillus anthracis*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 10): p. 2982-2993.
84. Goel, A.K., *Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance*. World J Clin Cases, 2015. **3**(1): p. 20-33.
85. Inglesby, T.V., et al., *Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management*. Jama, 2002. **287**(17): p. 2236-52.
86. Hugh-Jones, M.E., B.H. Rosenberg, and S. Jacobsen, *Evidence for the Source of the 2001 Attack Anthrax*. J Bioterr Biodef, 2012. **S3:008**.
87. Bhalla, D.K. and D.B. Warheit, *Biological agents with potential for misuse: a historical perspective and defensive measures*. Toxicol.Appl.Pharmacol., 2004. **199**(1): p. 71-84.
88. Manchee, R.J., et al., *Bacillus anthracis on Gruinard Island*. Nature, 1981. **294**(5838): p. 254-255.
89. Willis, E.A., *Landscape with dead sheep: what they did to Gruinard Island*. 2002. Med.Confl.Surviv., 2009. **25**(4): p. 320-331.

90. CDC. *Centers for Disease Control and Prevention. Bioterrorism Agents/Diseases*. 2018 Stand 04.04.2018; Available from: <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
91. Leendertz, F.H., et al., *Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest*. *Nature*, 2004. **430**(6998): p. 451-452.
92. Leendertz, F.H., et al., *Anthrax in Western and Central African great apes*. *Am. J. Primatol.*, 2006. **68**: p. 928-933.
93. Klee, S.R., et al., *The genome of a Bacillus isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of B. cereus with B. anthracis virulence plasmids*. *PLoS ONE*, 2010. **5**(7): p. e10986.
94. Leendertz, F.H., et al., *A new Bacillus anthracis found in wild chimpanzees and a gorilla from west and central Africa*. *PLoS Pathog.*, 2006. **2**: p. e8.
95. Antonation, K.S., et al., *Bacillus cereus biovar anthracis causing anthrax in sub-Saharan Africa - chromosomal monophyly and broad geographic distribution*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016. **10**(9): p. e0004923.
96. Hoffmann, C., et al., *Persistent anthrax as a major driver of wildlife mortality in a tropical rainforest*. *Nature*, 2017. **548**(7665): p. 82-86.
97. Brezillon, C., et al., *Capsules, toxins and AtxA as virulence factors of emerging Bacillus cereus biovar anthracis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. **9**(4): p. e0003455.
98. Okinaka, R., T. Pearson, and P. Keim, *Anthrax, but not Bacillus anthracis?* *PLoS Pathog.*, 2006. **2**(11): p. e122.
99. Ellerbrok, H., et al., *Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic Bacillus anthracis by real-time PCR*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002. **214**(1): p. 51-59.
100. Klee, S.R., et al., *Evaluation of different methods to discriminate Bacillus anthracis from other bacteria of the Bacillus cereus group*. *J. Appl. Microbiol.*, 2006. **100**: p. 673-681.
101. Baldwin, V.M., *You Can't B. cereus - A Review of Bacillus cereus Strains That Cause Anthrax-Like Disease*. *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 1731.
102. Oh, S.Y., et al., *Two capsular polysaccharides enable Bacillus cereus G9241 to cause anthrax-like disease*. *Mol. Microbiol.*, 2011. **80**(2): p. 455-470.
103. Dupke, S., et al., *Analysis of a newly discovered antigen of Bacillus cereus biovar anthracis for its suitability in specific serological antibody testing*. *J Appl Microbiol*, 2018. **126**(1): p. 311-323.
104. Bourgogne, A., et al., *Global effects of virulence gene regulators in a Bacillus anthracis strain with both virulence plasmids*. *Infect. Immun.*, 2003. **71**(5): p. 2736-2743.

105. Szczesny, P., et al., *Extending the aerolysin family: from bacteria to vertebrates*. PLoS.ONE., 2011. **6**(6): p. e20349.
106. Dupke, S., et al., *Serological evidence for human exposure to Bacillus cereus biovar anthracis in the villages around Tai National Park, Cote d'Ivoire*. PLoS Negl Trop Dis, 2020. **14**(5): p. e0008292.
107. Miller, J.M., et al., *Fulminating bacteremia and pneumonia due to Bacillus cereus*. J.Clin.Microbiol., 1997. **35**(2): p. 504-507.
108. Hoffmaster, A.R., et al., *Characterization of Bacillus cereus isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to Bacillus anthracis and harbor B. anthracis virulence genes*. J.Clin.Microbiol., 2006. **44**(9): p. 3352-3360.
109. Marston, C.K., et al., *Anthrax Toxin-Expressing Bacillus cereus Isolated from an Anthrax-Like Eschar*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0156987.
110. Pilo, P., et al., *Bovine Bacillus anthracis in Cameroon*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(16): p. 5818-21.
111. Setlow, P., *Observations on research with spores of Bacillales and Clostridiales species*. J Appl Microbiol, 2018. **126**(2): p. 348-358.
112. Setlow, P., *Germination of spores of Bacillus species: what we know and do not know*. J Bacteriol, 2014. **196**(7): p. 1297-305.
113. Lee, K.S., et al., *Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of Bacillus species*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 2008. **105**(8): p. 2806-2811.
114. Driks, A., *The Bacillus anthracis spore*. Mol.Aspects Med., 2009. **30**(6): p. 368-373.
115. Tan, I.S. and K.S. Ramamurthi, *Spore formation in Bacillus subtilis*. Environ Microbiol Rep, 2014. **6**(3): p. 212-25.
116. Liu, H., et al., *Formation and Composition of the Bacillus anthracis Endospore*. J.Bacteriol., 2004. **186**(1): p. 164-178.
117. Errington, J., *Regulation of endospore formation in Bacillus subtilis*. Nat Rev Microbiol, 2003. **1**(2): p. 117-26.
118. de Hoon, M.J., P. Eichenberger, and D. Vitkup, *Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network*. Curr Biol, 2010. **20**(17): p. R735-45.
119. Eichenberger, P., et al., *The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in Bacillus subtilis*. PLoS.Biol., 2004. **2**(10): p. e328.
120. McKenney, P.T., A. Driks, and P. Eichenberger, *The Bacillus subtilis endospore: assembly and functions of the multilayered coat*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(1): p. 33-44.

121. Stragier, P., et al., *Chromosomal rearrangement generating a composite gene for a developmental transcription factor*. Science, 1989. **243**(4890): p. 507-512.
122. Popham, D.L. and P. Stragier, *Binding of the Bacillus subtilis spoIVCA product to the recombination sites of the element interrupting the sigma K-encoding gene*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1992. **89**(13): p. 5991-5995.
123. Kunkel, B., R. Losick, and P. Stragier, *The Bacillus subtilis gene for the development transcription factor sigma K is generated by excision of a dispensable DNA element containing a sporulation recombinase gene*. Genes Dev., 1990. **4**(4): p. 525-535.
124. Halberg, R. and L. Kroos, *Sporulation regulatory protein SpoIIID from Bacillus subtilis activates and represses transcription by both mother-cell-specific forms of RNA polymerase*. J.Mol.Biol., 1994. **243**(3): p. 425-436.
125. Hugh-Jones, M. and J. Blackburn, *The ecology of Bacillus anthracis*. Mol.Aspects Med., 2009. **30**(6): p. 356-367.
126. Abbas, A.A., et al., *Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of Bacillus cereus*. Food Microbiol, 2014. **42**: p. 122-31.
127. Rose, R., et al., *Comparison of the properties of Bacillus subtilis spores made in liquid or on agar plates*. J.Appl.Microbiol., 2007. **103**(3): p. 691-699.
128. Zhao, S., et al., *Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e78644.
129. Lowe, R., et al., *Transcriptomics technologies*. PLoS Comput Biol, 2017. **13**(5): p. e1005457.
130. Keim, P., et al., *Molecular evolution and diversity in Bacillus anthracis as detected by amplified fragment length polymorphism markers*. J. Bacteriol., 1997. **179**(3): p. 818-824.
131. Elschner, M.C., et al., *High-quality genome sequence of Bacillus anthracis strain 14RA5914 isolated during an outbreak in Germany in 2014*. Genome Announc, 2017. **5**(40).
132. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third ed. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
133. Ellner, P.D., et al., *A new culture medium for medical bacteriology*. Am.J.Clin.Pathol., 1966. **45**(4): p. 502-504.
134. Kim, H.U. and J.M. Goepfert, *A sporulation medium for Bacillus anthracis*. J.Appl.Bacteriol., 1974. **37**(2): p. 265-267.
135. Ristroph, J.D. and B.E. Ivins, *Elaboration of Bacillus anthracis antigens in a new, defined culture medium*. Infect. Immun., 1983. **39**(1): p. 483-486.

136. Nattermann, H., et al., *Efficient killing of anthrax spores using aqueous and alcoholic peracetic acid solutions*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz., 2005. **48**(8): p. 939-950.
137. Cao, Y., et al., *Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation*. Molecules, 2020. **25**(3): p. 706.
138. Pfaffl, M.W., *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpectrum, 2004.
139. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res., 2001. **29**(9): p. e45.
140. Bergman, N.H., et al., *Transcriptional profiling of Bacillus anthracis during infection of host macrophages*. Infect.Immun., 2007. **75**(7): p. 3434-3444.
141. Jahn, C.E., A.O. Charkowski, and D.K. Willis, *Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation*. J.Microbiol.Methods., 2008. **75**(2): p. 318-324.
142. Wolf, S.A., et al., *SCORE: Smart Consensus Of RNA Expression-a consensus tool for detecting differentially expressed genes in bacteria*. Bioinformatics, 2021. **37**(3): p. 426-428.
143. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature., 1970. **227**(5259): p. 680-685.
144. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
145. Doellinger, J., et al., *Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion (SPEED) - A Universal, Rapid, and Detergent-free Protocol for Proteomics Based on Acid Extraction*. Molecular & Cellular Proteomics, 2020. **19**(1): p. 209-222.
146. Ishihama, Y., J. Rappsilber, and M. Mann, *Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional Peptide fractionation in proteomics*. J Proteome Res, 2006. **5**(4): p. 988-994.
147. Muller, J.B., et al., *The proteome landscape of the kingdoms of life*. Nature, 2020. **582**(7813): p. 592-596.
148. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(12): p. 1367-72.
149. Tyanova, S. and J. Cox, *Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research*, in *Cancer Systems Biology: Methods and Protocols*, L. von Stechow, Editor. 2018, Springer New York: New York, NY. p. 133-148.

150. Fouet, A. and M. Mock, *Differential influence of the two Bacillus anthracis plasmids on regulation of virulence gene expression*. Infect.Immun., 1996. **64**(12): p. 4928-4932.
151. Sirard, J.C., M. Mock, and A. Fouet, *The three Bacillus anthracis toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature*. J. Bacteriol., 1994. **176**(16): p. 5188-5192.
152. Bertin, M., A. Chateau, and A. Fouet, *Full expression of Bacillus anthracis toxin gene in the presence of bicarbonate requires a 2.7-kb-long atxA mRNA that contains a terminator structure*. Res.Microbiol., 2010. **161**(4): p. 249-259.
153. Hirsch-Kauffmann, M., M. Schweiger, and Michael-Ruth, *Biologie und molekulare Medizin - für Mediziner und Naturwissenschaftler - 7. Auflage - Stuttgart, New York: Georg Thieme Verl., 2009, 416 S.; 570 Abb., 74 Tab.* 2009.
154. Liang, X., et al., *Involvement of the pagR gene of pXO2 in anthrax pathogenesis*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28827.
155. Kern, J.W. and O. Schneewind, *BsIA, a pXO1-encoded adhesin of Bacillus anthracis*. Mol.Microbiol., 2008. **68**(2): p. 504-515.
156. Kern, J. and O. Schneewind, *BsIA, the S-layer adhesin of B. anthracis, is a virulence factor for anthrax pathogenesis*. Mol.Microbiol., 2010. **75**(2): p. 324-332.
157. Ebrahimi, C.M., et al., *Penetration of the blood-brain barrier by Bacillus anthracis requires the pXO1-encoded BsIA protein*. J.Bacteriol., 2009. **191**(23): p. 7165-7173.
158. Blum, M., et al., *The InterPro protein families and domains database: 20 years on*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(D1): p. D344-D354.
159. Thackray, P.D., et al., *GerN, an antiporter homologue important in germination of Bacillus cereus endospores*. J Bacteriol, 2001. **183**(2): p. 476-82.
160. Marciniak, B.C., et al., *Regulation of ykrL (htpX) by Rok and YkrK, a novel type of regulator in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2012. **194**(11): p. 2837-45.
161. Lin, T.H., S.C. Huang, and G.C. Shaw, *Reexamining transcriptional regulation of the Bacillus subtilis htpX gene and the ykrK gene, encoding a novel type of transcriptional regulator, and redefining the YkrK operator*. J Bacteriol, 2012. **194**(24): p. 6758-65.
162. Tran, S.L., et al., *Haemolysin II is a Bacillus cereus virulence factor that induces apoptosis of macrophages*. Cell Microbiol., 2011. **13**(1): p. 92-108.
163. Amorim Franco, T.M. and J.S. Blanchard, *Bacterial Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis: Structures, Mechanisms, and Drugability*. Biochemistry, 2017. **56**(44): p. 5849-5865.
164. Cui, Z., et al., *Rv3091, An Extracellular Patatin-Like Phospholipase in Mycobacterium tuberculosis, Prolongs Intracellular Survival of Recombinant Mycolicibacterium smegmatis by Mediating Phagosomal Escape*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 2204.

165. Gibson, U.E., C.A. Heid, and P.M. Williams, *A novel method for real time quantitative RT-PCR*. Genome Res., 1996. **6**(10): p. 995-1001.
166. Rodriguez Ayala, F., M. Bartolini, and R. Grau, *The Stress-Responsive Alternative Sigma Factor SigB of Bacillus subtilis and Its Relatives: An Old Friend With New Functions*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 1761.
167. Lister, R., et al., *Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis*. Cell, 2008. **133**(3): p. 523-36.
168. Holt, R.A. and S.J. Jones, *The new paradigm of flow cell sequencing*. Genome Res, 2008. **18**(6): p. 839-46.
169. Mortazavi, A., et al., *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nat Methods, 2008. **5**(7): p. 621-8.
170. Nagalakshmi, U., et al., *The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing*. Science, 2008. **320**(5881): p. 1344-9.
171. Passalacqua, K.D., et al., *Structure and complexity of a bacterial transcriptome*. J.Bacteriol., 2009. **191**(10): p. 3203-3211.
172. McKenzie, A.T., et al., *Transcriptome analysis identifies Bacillus anthracis genes that respond to CO₂ through an AtxA-dependent mechanism*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 229.
173. Kim, S.K., K.H. Jung, and Y.G. Chai, *Changes in Bacillus anthracis CodY regulation under host-specific environmental factor deprived conditions*. BMC Genomics, 2016. **17**: p. 645.
174. Passalacqua, K.D., et al., *Strand-specific RNA-seq reveals ordered patterns of sense and antisense transcription in Bacillus anthracis*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43350.
175. Martin, J., et al., *Bacillus anthracis genome organization in light of whole transcriptome sequencing*. BMC Bioinformatics, 2010. **11** (3): p. S10.
176. Raynor, M.J., et al., *Regulons and protein-protein interactions of PRD-containing Bacillus anthracis virulence regulators reveal overlapping but distinct functions*. Mol Microbiol, 2018.
177. Corsi, I.D., et al., *AtxA-Controlled Small RNAs of Bacillus anthracis Virulence Plasmid pXO1 Regulate Gene Expression in trans*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 610036.
178. Leiser, O.P., et al., *Laboratory strains of Bacillus anthracis exhibit pervasive alteration in expression of proteins related to sporulation under laboratory conditions relative to genetically related wild strains*. PLoS One, 2018. **13**(12): p. e0209120.
179. Norris, M.H., et al., *Laboratory strains of Bacillus anthracis lose their ability to rapidly grow and sporulate compared to wildlife outbreak strains*. PLoS One, 2020. **15**(1): p. e0228270.

180. Bach, H.J., et al., *Magnetic capture-hybridization method for purification and probing of mRNA for neutral protease of Bacillus cereus*. J.Microbiol.Methods, 1999. **37**(2): p. 187-192.
181. Rosenow, C., et al., *Prokaryotic RNA preparation methods useful for high density array analysis: comparison of two approaches*. Nucleic Acids Res., 2001. **29**(22): p. E112.
182. Liu, Y., J. Zhou, and K.P. White, *RNA-seq differential expression studies: more sequence or more replication?* Bioinformatics, 2014. **30**(3): p. 301-4.
183. Zhang, Z.H., et al., *A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-Seq data*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e103207.
184. Conesa, A., et al., *A survey of best practices for RNA-seq data analysis*. Genome Biol, 2016. **17**: p. 13.
185. Lin, Y., et al., *Comparison of normalization and differential expression analyses using RNA-Seq data from 726 individual Drosophila melanogaster*. BMC Genomics, 2016. **17**: p. 28.
186. Anders, S. and W. Huber, *Differential expression analysis for sequence count data*. Genome Biol, 2010. **11**(10): p. R106.
187. Pohl, S., et al., *Combined proteomic and transcriptomic analysis of the response of Bacillus anthracis to oxidative stress*. Proteomics, 2011. **11**(15): p. 3036-55.
188. Carlson, P.E., Jr., et al., *Global gene expression by Bacillus anthracis during growth in mammalian blood*. Pathog Dis, 2015. **73**(8): p. ftv061.
189. Sharma, A.K., et al., *Effect of over expressing protective antigen on global gene transcription in Bacillus anthracis BH500*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 16108.
190. Panda, G., et al., *Delineating the effect of host environmental signals on a fully virulent strain of Bacillus anthracis using an integrated transcriptomics and proteomics approach*. J Proteomics, 2014. **105**: p. 242-65.
191. Bartkus, J.M. and S.H. Leppla, *Transcriptional regulation of the protective antigen gene of Bacillus anthracis*. Infect.Immun., 1989. **57**(8): p. 2295-2300.
192. Stretton, S. and A.E. Goodman, *Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms*. Antonie van Leeuwenhoek, 1998. **73**(1): p. 79-85.
193. Yarwood, J.M. and P.M. Schlievert, *Oxygen and carbon dioxide regulation of toxic shock syndrome toxin 1 production by Staphylococcus aureus MN8*. Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(5): p. 1797-1803.
194. Iwanaga, M. and K. Yamamoto, *New medium for the production of cholera toxin by Vibrio cholerae O1 biotype El Tor*. Journal of clinical microbiology, 1985. **22**(3): p. 405-408.

195. Okada, N., R.T. Geist, and M.G. Caparon, *Positive transcriptional control of mry regulates virulence in the group A streptococcus*. Mol Microbiol, 1993. **7**(6): p. 893-903.
196. Caparon, M.G., et al., *Environmental regulation of virulence in group A streptococci: transcription of the gene encoding M protein is stimulated by carbon dioxide*. J Bacteriol, 1992. **174**(17): p. 5693-701.
197. Bergman, N.H., et al., *Transcriptional Profiling of the Bacillus anthracis Life Cycle In Vitro and an Implied Model for Regulation of Spore Formation*. J.Bacteriol., 2006. **188**(17): p. 6092-6100.
198. Hoffmaster, A.R. and T.M. Koehler, *Control of virulence gene expression in Bacillus anthracis*. J.Appl.Microbiol., 1999. **87**(2): p. 279-281.
199. Ruzicka, F.J., K.W. Lieder, and P.A. Frey, *Lysine 2,3-aminomutase from Clostridium subterminale SB4: mass spectral characterization of cyanogen bromide-treated peptides and cloning, sequencing, and expression of the gene kamA in Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 2000. **182**(2): p. 469-476.
200. Southworth, T.W., et al., *GerN, an endospore germination protein of Bacillus cereus, is an Na(+)/H(+)-K(+) antiporter*. Journal of bacteriology, 2001. **183**(20): p. 5896-5903.
201. Dupke, S., *Untersuchung der Virulenz Bacillus anthracis-ähnlicher Isolate aus West- und Zentralafrika*. Dissertation 2011, Freie Universität Berlin: <https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/1414>.
202. Rall, J.M. and T.M. Koehler, *Bacillus anthracis Virulence Gene Regulation / Wiley-Blackwell Verlag / 2011 by John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA*. 2011.
203. Sára, M. and U.B. Sleytr, *S-Layer proteins*. J Bacteriol, 2000. **182**(4): p. 859-68.
204. Gerbino, E., et al., *Role of S-layer proteins in bacteria*. World J Microbiol Biotechnol, 2015. **31**(12): p. 1877-87.
205. Mignot, T., et al., *Developmental switch of S-layer protein synthesis in Bacillus anthracis*. Mol Microbiol, 2002. **43**(6): p. 1615-27.
206. Miyoshi, S.-I. and S. Shinoda, *Bacterial Metalloprotease as the Toxic Factor in Infection*. Journal of Toxicology: Toxin Reviews, 1997. **16**(4): p. 177-194.
207. Guillemet, E., et al., *The InhA metalloproteases of Bacillus cereus contribute concomitantly to virulence*. J.Bacteriol., 2010. **192**(1): p. 286-294.
208. Ramarao, N. and D. Lereclus, *The InhA1 metalloprotease allows spores of the B. cereus group to escape macrophages*. Cell Microbiol., 2005. **7**(9): p. 1357-1364.
209. Shoop, W.L., et al., *Anthrax lethal factor inhibition*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2005. **102**(22): p. 7958-7963.

210. Solomon, J., et al., *Isolation and characterization of mutants of the Bacillus subtilis oligopeptide permease with altered specificity of oligopeptide transport*. Journal of bacteriology, 2003. **185**(21): p. 6425-6433.
211. Gominet, M., et al., *Oligopeptide permease is required for expression of the Bacillus thuringiensis plcR regulon and for virulence*. Mol Microbiol, 2001. **40**(4): p. 963-75.
212. Lazazzera, B.A., J.M. Solomon, and A.D. Grossman, *An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in B. subtilis*. Cell, 1997. **89**(6): p. 917-25.
213. Lazazzera, B.A., *The intracellular function of extracellular signaling peptides*. Peptides, 2001. **22**(10): p. 1519-27.
214. Ramarao, N. and V. Sanchis, *The pore-forming haemolysins of bacillus cereus: a review*. Toxins, 2013. **5**(6): p. 1119-1139.
215. Ivanova, N., et al., *Genome sequence of Bacillus cereus and comparative analysis with Bacillus anthracis*. Nature, 2003. **423**(6935): p. 87-91.
216. Park, J.M., et al., *Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2048-2051.
217. Popov, S.G., et al., *Lethal toxin of Bacillus anthracis causes apoptosis of macrophages*. Biochem.Biophys.Res.Comm., 2002. **293**(1): p. 349-355.
218. Salter, S.J., *You cannot B. cereus*. Nat.Rev.Microbiol., 2011. **9**(2): p. 83.
219. Smith, V., et al., *MogR Is a Ubiquitous Transcriptional Repressor Affecting Motility, Biofilm Formation and Virulence in Bacillus thuringiensis*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 610650.
220. Levy, M.J., M.P. Washburn, and L. Florens, *Probing the Sensitivity of the Orbitrap Lumos Mass Spectrometer Using a Standard Reference Protein in a Complex Background*. Journal of proteome research, 2018. **17**(10): p. 3586-3592.
221. Fioravanti, A., et al., *Structure of S-layer protein Sap reveals a mechanism for therapeutic intervention in anthrax*. Nat Microbiol, 2019. **4**(11): p. 1805-1814.
222. Francis, A.W., et al., *Proteomic analysis of Bacillus anthracis Sterne vegetative cells*. Biochim.Biophys.Acta, 2005. **1748**(2): p. 191-200.
223. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res., 1996. **6**(10): p. 986-994.
224. Bustin, S.A., et al., *Quantitative real-time RT-PCR--a perspective*. J.Mol.Endocrinol., 2005. **34**(3): p. 597-601.
225. Pfaffl, S.F.u.M.W., *Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR*. Laborwelt, 2007. **Nr.5**: p. 4-8.

226. Bustin, S.A. and T. Nolan, *Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*. J.Biomol.Tech., 2004. **15**(3): p. 155-166.
227. Curry, J., C. McHale, and M.T. Smith, *Low efficiency of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase during reverse transcription of rare t(8;21) fusion gene transcripts*. Biotechniques., 2002. **32**(4): p. 768, 770, 772, 754-768, 770, 772, 755.
228. Karrer, E.E., et al., *In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1995. **92**(9): p. 3814-3818.
229. Wong, M.L. and J.F. Medrano, *Real-time PCR for mRNA quantitation*. Biotechniques., 2005. **39**(1): p. 75-85.
230. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
231. Goossens, K., et al., *Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos*. BMC.Dev.Biol., 2005. **5**: p. 27.
232. Charney, J., W.P. Fisher, and C.P. Hegarty, *Manganese as an essential element for sporulation in the genus Bacillus*. J.Bacteriol., 1951. **62**(2): p. 145-148.
233. Davies, D.G., *The influence of temperature and humidity on spore formation and germination in Bacillus anthracis*. J Hyg (Lond), 1960. **58**(2): p. 177-86.
234. Vasudevan, P., et al., *Spore cortex formation in Bacillus subtilis is regulated by accumulation of peptidoglycan precursors under the control of sigma K*. Mol Microbiol, 2007. **65**(6): p. 1582-94.
235. Sastalla, I., M.J. Rosovitz, and S.H. Leppla, *Accidental selection and intentional restoration of sporulation-deficient Bacillus anthracis mutants*. Appl.Environ.Microbiol., 2010. **76**(18): p. 6318-6321.
236. Chen, M., et al., *SpoVG is Necessary for Sporulation in Bacillus anthracis*. Microorganisms, 2020. **8**(4).
237. Overkamp, W. and O.P. Kuipers, *Transcriptional Profile of Bacillus subtilis sigF-Mutant during Vegetative Growth*. PloS one, 2015. **10**(10): p. e0141553-e0141553.
238. Saujet, L., et al., *The regulatory network controlling spore formation in Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett, 2014. **358**(1): p. 1-10.
239. Allocati, N., et al., *Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria*. Cell death & disease, 2015. **6**(1): p. e1609-e1609.
240. Sastalla, I. and S.H. Leppla, *Occurrence, recognition, and reversion of spontaneous, sporulation-deficient Bacillus anthracis mutants that arise during laboratory culture*. Microbes Infect, 2012. **14**(5): p. 387-91.

241. Haraldsen, J.D. and A.L. Sonenshein, *Efficient sporulation in Clostridium difficile requires disruption of the sigmaK gene*. Mol.Microbiol., 2003. **48**(3): p. 811-821.

Anhang

Tabelle 33: Oligonukleotidsequenzen der verwendeten Primer und Sonden

Oligonukleotid	Sequenz
pag-seq6	5'-ATGTTAGTTGCGTTTAATTCCGC-3'
PA-S	5'-CGGATCAAGTATATGGGAATATAGCAA-3'
PA-R	5'-CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT-3'
PA-TM	5'-Fam-CTCGAACTGGAGTGAAGTGTTACCGCAAA-Tamra-3'
rpoB-1856-for	5'-CGGCAGCGACAGCTTGTATT-3'
rpoB-1941-rev	5'-AACCGCCTGACGTTGCA-3'
rpoB-TM	5'-Fam-CTAACCGCGCACTTATGGGAGCGAAC-Tamra-3'
capB-cDNA	5'-GATAATCGGGTTGAAGTCC-3'
capB-S	5'-GGGAAAACAACCTGGTACATCTGC-3'
capB-R	5'-AAGTGCTTCTGCTTCTAAATCAGC-3'
capB-TM	5'-Fam-CCTCTTTAACTACCCTGCGTTGCTCACCG-Tamra-3'
hasA-cDNA	5'-AGGTTGTGCTTTTGTGCGG-3'
hasA-S	5'-GGTTATATTTGCTTAGCTGCATA-3'
hasA-R	5'-AAGCGTATAGGTAATAGTGCTAAT-3'
hasA-TM	5'-Fam-ACATCCCCTTACTTTCTTACTGGCGCCAT-Tamra-3'
pXO2-60-cDNA	5'-CTAATAGCATTGAGGTTTC-3'
pXO2-60-S	5'-AGGATTCACCTAACGGTGATGA-3'
pXO2-60-R	5'-TTTCGGCAGTTCTTTTTCAGTATTAT-3'
pXO2-60-TM	5'-Fam-TGCAGCAGAATTTAATGGGCAATCTGG-Tamra-3'
BACI_pCIXO200870_for	5'-TATGGGTCGCTGCTGGAGGA-3'
BACI_pCIXO200870_rev	5'-GGACAGCTGATACCCAAAGGG-3'
BACI_c23220_for	5'-TGCTACTGCATTACAATCTGGCG-3'
BACI_c23220_rev	5'-GCAGGAACCTTACCAGCAGCG-3'
BACI_c14620_for	5'-TCCGCTCATTGACGTGG-3'
BACI_c14620_rev	5'-TCGAATCGCCACCCTCTCCT-3'
BACI_c18140_for	5'-GGGGCTATTTTTGCAGGGGC-3'
BACI_c18140_rev	5'-TGCATTTCTAAAACTTCCCTGCT-3'
BACI_c28060_for	5'-TCGTAGATCATGCGGCAGCG-3'
BACI_c28060_rev	5'-TGGTGCTGTGTTTGTGCTTTTCG-3'
sigK-for	5'-TTGAGTCTATTCGCCGCAATTGG-3'
sigK-1	5'-TCATCGTCTGATGATAATGGC-3'
sigB-for	5'-GCATATCGCTATTCAAAGGC-3'
sigB-rev2	5'-AAAAGGCTCAAAGCATTCC-3'
sigG-for	5'-GCAAAGTGGAGAGATAAGCG-3'
sigG-rev2	5'-CATAAGTCCGATACAACCAAC-3'
spolIID-for	5'-GTGCACGATTACATCAAAGAG-3'

spolIID-rev4	5'-GTTCTGTTAAATCTTTATGGACTG-3'
spoVG-for2	5'-GCCTCTATTACTCTAGACCATGAA-3'
spoVG-rev2	5'-GTGCAATGTCACGGAATTCTCC-3'
4160-for3	5'-GGTATCGACCACTTCACAAG-3'
4160-rev5	5'-TTCAGGACGAATATCAATATCTTC-3'
cotD-for	5'-AGGACCTATTTGTACAACCTGC-3'
cotD-rev2	5'-GTACATGTGTTGTATGTGTCG-3'
cotZ-for	5'-CACCATGGCTCTTCTCATTG-3'
cotZ-rev2	5'-CTGATGCAGTATTGTGTGCG-3'
spolIE-for	5'-TCTTCTTTAGTCGGTTTACACG-3'
spolIE-rev	5'-TACTAACAAGTAAATCGTACATGG-3'
sigE-for	5'-GGAGATCAGGCGGCAAGGTC-3'
sigE-rev	5'-AGCCCGATTGTTCCAATGCT-3'
sigF-for	5'-AGAAACCTCAGTTAAAGGACC-3'
sigF-rev	5'-TGTACAACCGACCATACGAG-3'
sasP-for	5'-ACCAGGAGCAACAGCTGCAA-3'
sasP-rev	5'-ACCAGGAGCAACAGCTGCAA-3'
murF-for	5'-GGAATGTCAAGCCGCGGAGA-3'
murF-rev	5'-GCCTCACGAGAGCCTAAGTCC-3'

Tabelle 34: Optische Dichte der Bakterienkulturen für die Wachstumskurven in BHI-Medium

Ergebnisse der Messungen der OD₆₀₀ der für die Wachstumskurven in BHI-Medium angezogenen Kulturen von den beiden untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen über eine Inkubationsdauer von sechs Stunden.

Wachstums- dauer t _x (h)	OD ₆₀₀							
	<i>Ba</i> Vollum		<i>Ba</i> Dobichau		<i>Bcbva</i> CI		<i>Bcbva</i> CA	
	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
t ₀	0,068	0,066	0,259	0,250	0,282	0,300	0,192	0,208
t ₁	0,099	0,074	0,380	0,329	0,430	0,353	0,446	0,310
t ₂	0,381	0,27	0,871	0,722	1,609	0,530	1,790	0,661
t ₃	1,553	1,238	2,066	1,889	2,593	1,874	2,761	2,246
t ₄	2,423	2,304	2,607	2,465	2,878	2,591	2,893	2,688
t ₅	2,656	2,527	3,017	2,726	2,978	2,847	2,893	2,979
t ₆	2,816	2,665	2,922	2,756	2,858	2,805	3,009	2,818

Tabelle 35: Optische Dichte der Bakterienkulturen für die RNA-Sequenzierung

Ergebnisse der Messungen der OD₆₀₀ der für die RNA-Sequenzierung angezogenen Kulturen von den beiden untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen nach 4,5 Stunden Wachstum.

Stamm	Wachstumsdauer t _x (h)	OD ₆₀₀ – O ₂ (R1)	OD ₆₀₀ – CO ₂ (R1)
<i>Ba</i> Dobichau	t _{4,5}	2,771	2,509
<i>Ba</i> Vollum	t _{4,5}	2,528	2,490
<i>Bcbva</i> CI	t _{4,5}	2,901	2,774
<i>Bcbva</i> CA	t _{4,5}	2,774	2,449

Tabelle 36: RNA-Konzentrationen vor dem DNase I-Verdau

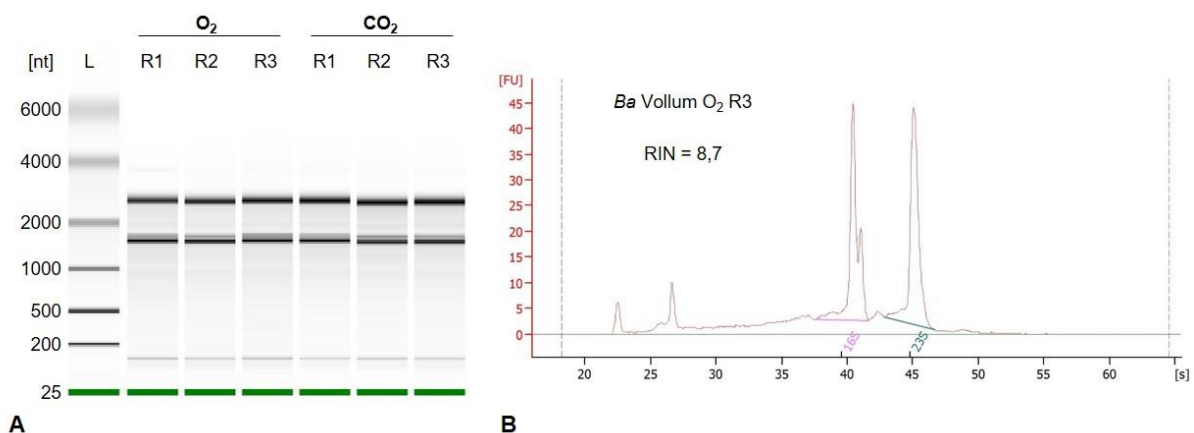
Ergebnisse der RNA-Konzentrationsbestimmungen auf Grundlage der Messungen am Qubit-Fluorometer vor dem DNase I-Verdau aus Kulturen der beiden untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämme nach 4,5 Stunden Wachstum. R = Replikat.

Stamm	Konzentration – O ₂ (ng/μl)			Konzentration – CO ₂ (ng/μl)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<i>Ba</i> Dobichau	604	526	484	178	102	127
<i>Ba</i> Vollum	1680	1820	1280	1260	1120	1180
<i>Bcbva</i> CI	992	1040	802	338	362	262
<i>Bcbva</i> CA	1260	1560	1340	334	155	302

Tabelle 37: RNA-Konzentrationen nach dem DNase I-Verdau

Ergebnisse der RNA-Konzentrationsbestimmungen auf Grundlage der Messungen am Qubit-Fluorometer nach dem DNase I-Verdau aus Kulturen der beiden untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämme nach 4,5 Stunden Wachstum. R = Replikat.

Stamm	Konzentration – O ₂ (ng/μl)			Konzentration – CO ₂ (ng/μl)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<i>Ba</i> Dobichau	29,7	28,4	31,6	19,7	33,5	29,3
<i>Ba</i> Vollum	35,0	31,9	31,8	34,3	39,8	35,7
<i>Bcbva</i> CI	44,8	39,7	38,7	26,7	22,4	28,1
<i>Bcbva</i> CA	37,5	44,6	40,7	31,5	30,1	27,0

**Abbildung 37: Bioanalyzer-Ergebnisse für die RNA-Proben von *B. anthracis* Vollum**

(A) „Virtuelles Gelbild“ für alle drei biologischen Replikate pro Bedingung. Die grüne Bande bei 25 nt stellt die interne Markerbande dar. (B) Proben-Electropherogramm, exemplarisch gezeigt für Replikat 3 der O₂-Bedingung mit einer RIN von 8,7.

nt = nucleotide, L = Ladder, R = Replikat, FU = fluorescence units, s = seconds

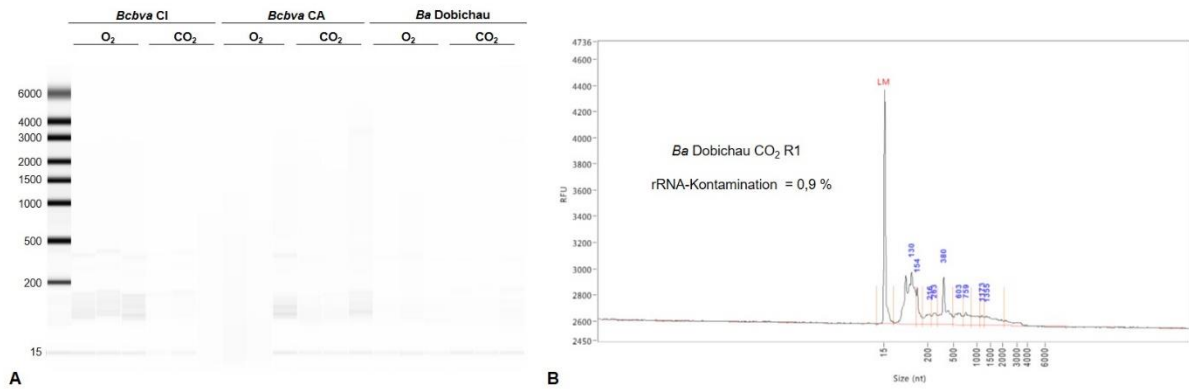


Abbildung 38: Fragment Analyzer-Ergebnisse für die RNA-Proben von *B. anthracis* Dobichau, *Bcbva CI* und *Bcbva CA* nach der rRNA-Abreicherung mit dem Ribo-Zero® rRNA Removal Kit (A) „virtuelles Gelbild“ für alle drei biologischen Replikate pro Bedingung und pro Stamm. Die Bande bei 15 nt stellt die interne Markerbande dar. (B) Proben-Elektropherogramm, exemplarisch gezeigt für Replikant 1 der CO₂-Bedingung von *B. anthracis* Dobichau mit einer verbleibenden rRNA-Kontamination von 0,9 %.

nt = nucleotide, L = Ladder, R = Replikat, RFU = relative fluorescence units, LM = lower marker

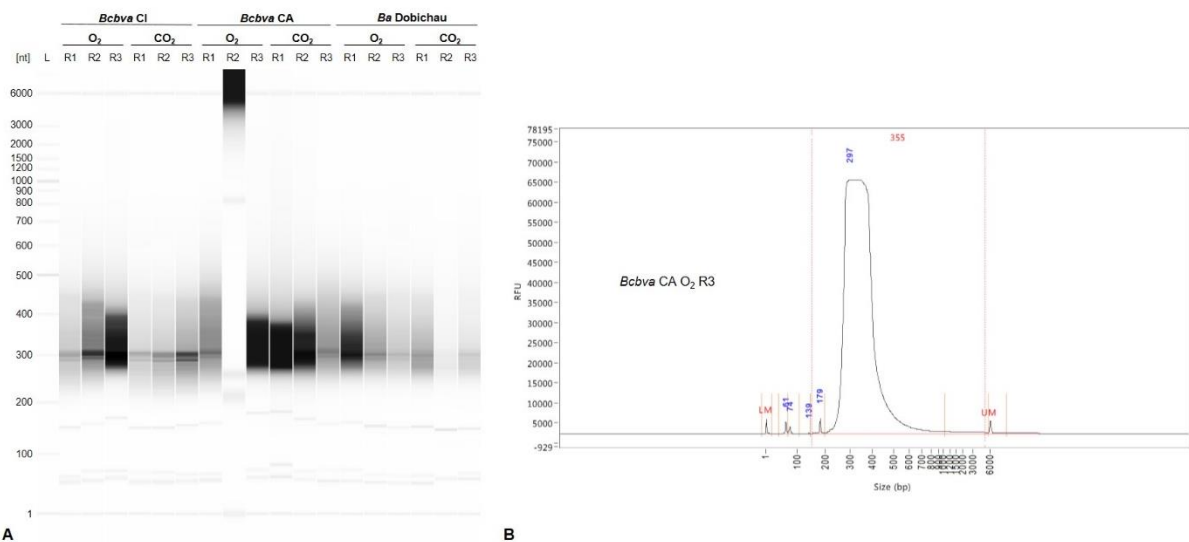


Abbildung 39: Fragment Analyzer-Ergebnisse für die RNA-Proben von *B. anthracis* Dobichau, *Bcbva CI* und *Bcbva CA* nach der Herstellung der cDNA-Bibliotheken mit dem NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit

(A) „virtuelles Gelbild“ für alle drei biologischen Replikate pro Bedingung und pro Stamm. Die Bande bei 1 nt und 6000 nt stellen die internen Markerbanden dar. (B) Proben-Elektropherogramm, exemplarisch gezeigt für Replikant 3 der O₂-Bedingung von *Bcbva CA*.

nt = nucleotide, L = Ladder, R = Replikat, RFU = relative fluorescence units, LM = lower marker, UM = upper marker

Tabelle 38: Differentiell exprimierte Gene mit einem $\log_2FC \leq -2$ (≥ 4 -fache Minderung) in CO_2 relativ zu O_2 in allen vier *Bacillus*-Stämmen

Locus Tag (<i>Ba Vollum</i>)	Locus Tag (<i>Bcbva CI</i>)	Genname	Proteinname (<i>Ba Vollum</i>)	$\log_2FC (O_2 \rightarrow CO_2)$			
				<i>Ba Vollum</i>	<i>Ba Dobichau</i>	<i>Bcbva CA</i>	<i>Bcbva CI</i>
DJ46_RS04160	BACI_c17520	<i>asnO2</i>	asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	-2,83	-3,59	-4,84	-3,58
DJ46_RS09375	BACI_c28110		DedA family protein	-2,95	-2,13	-2,49	-3,11
DJ46_RS10175	BACI_c29730		MFS transporter	-4,57	-4,68	-3,43	-3,90
DJ46_RS12945	BACI_c35090	<i>moaE2</i>	molybdopterin synthase catalytic subunit MoaE	-2,16	-3,66	-5,15	-3,94
DJ46_RS12950	BACI_c35100	<i>moeA2</i>	molybdopterin molybdotransferase MoeA	-2,07	-3,21	-5,49	-3,31
DJ46_RS12955	BACI_c35110	<i>moeB2</i>	molybdopterin-synthase adenyltransferase MoeB	-2,59	-2,87	-4,34	-3,71
DJ46_RS12960	BACI_c35120		formate/nitrite transporter family protein	-4,04	-5,05	-5,88	-4,21
DJ46_RS12970	BACI_c35140	<i>fdhD2</i>	formate dehydrogenase accessory sulfurtransferase FdhD	-2,47	-2,95	-3,90	-3,30
DJ46_RS12975	BACI_c35150		DUF2294 domain-containing protein	-2,44	-2,87	-2,35	-3,01
DJ46_RS26960	BACI_c06830	<i>bdhA</i>	(R,R)-butanediol dehydrogenase	-4,69	-4,82	-3,33	-4,27
DJ46_RS27440	BACI_c07750		patatin family protein	-3,99	-3,63	-3,40	-2,83
DJ46_RS28005	BACI_c09110	<i>alsS1</i>	acetolactate synthase AlsS	-6,37	-4,24	-2,54	-6,62
DJ46_RS28010	BACI_c09120	<i>alsD</i>	alpha-acetolactate decarboxylase	-6,44	-5,30	-2,23	-6,40

\log_2FC = Logarithmus des Fold Change zur Basis 2

Tabelle 39: Differentiell exprimierte Gene mit einem $\log_2FC \leq -2$ (≥ 4 -fache Minderung) in CO_2 relativ zu O_2 in den zwei *B. anthracis*-Stämmen

Locus Tag (<i>Ba Vollum</i>)	Locus Tag (<i>Bcbva CI</i>)	Genname	Proteinname (<i>Ba Vollum</i>)	$\log_2FC (O_2 \rightarrow CO_2)$			
				<i>Ba Vollum</i>	<i>Ba Dobichau</i>	<i>Bcbva CA</i>	<i>Bcbva CI</i>
DJ46_RS02485	BACI_c14260		MarR family transcriptional regulator	-3,12	-3,27	-0,08	-0,92
DJ46_RS04370	BACI_c17930	<i>glT2</i>	cation:dicarboxylase symporter family transporter	-6,40	-6,88	-1,88	-0,54
DJ46_RS04375	BACI_c17940	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	-3,49	-5,42	0,00	-0,46
DJ46_RS04380	BACI_c17950	<i>malS</i>	oxaloacetate-decarboxylating malate dehydrogenase	-2,44	-3,86	1,04	-0,16
DJ46_RS05740	BACI_c20440		glycosyl transferase	-2,61	-2,03	0,88	-1,00

DJ46_RS10700	BACI_c30780	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	-3,30	-4,97	0,00	0,06
DJ46_RS10720	BACI_c30810	<i>uvrC2</i>	nucleotide excision repair endonuclease	-2,79	-2,10	-0,93	-0,05
DJ46_RS10725	BACI_c30820		amino acid permease	-2,52	-2,62	-1,88	0,57
DJ46_RS10735	BACI_c30840	<i>proC3</i>	pyrroline-5-carboxylate reductase	-3,62	-3,62	-0,84	-0,50
DJ46_RS10740	BACI_c30850		DoxX family protein	-4,19	-3,73	0,19	0,55
DJ46_RS10785	BACI_c30940	<i>glsA</i>	glutaminase GlS A	-3,71	-3,00	0,51	0,10
DJ46_RS12260	BACI_c33780		acyl--CoA ligase	-3,21	-5,39	-1,29	-0,57
DJ46_RS13465	BACI_c36180		CidA/LrgA family holin-like protein	-2,86	-3,02	-1,61	-0,85
DJ46_RS17695	BACI_c43570	<i>adhE</i>	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	-3,44	-3,12	9,40	-0,25
DJ46_RS18020	BACI_c44220		ABC transporter permease	-2,78	-2,99	-0,09	-0,04
DJ46_RS18025	BACI_c44230		ABC transporter permease	-3,71	-2,49	-1,74	-0,42
DJ46_RS18030	BACI_c44240		ABC transporter ATP-binding protein	-3,00	-2,58	-1,62	-1,43
DJ46_RS18220	BACI_c44630		hypothetical protein	-3,81	-2,08	1,74	-1,83
DJ46_RS18560	BACI_c45320		sodium:proton antiporter	-2,24	-2,62	-0,35	-0,20
DJ46_RS21520	BACI_c51220	<i>cggR</i>	gapA transcriptional regulator CggR	-2,21	-3,43	-0,66	-0,11
DJ46_RS23085	BACI_c54400		NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	-2,39	-2,66	-0,63	-1,10
DJ46_RS26535	BACI_c05960		GNAT family N-acetyltransferase	-3,71	-2,29	0,43	-0,77
DJ46_RS27680	BACI_c08340		ABC transporter permease	-2,64	-2,09	1,86	0,56
DJ46_RS28030	n.d.		choice-of-anchor A family protein	-3,59	-2,57	n.d.	n.d.

n.d. = nicht detektiert; log₂FC = Logarithmus des Fold Change zur Basis 2

Tabelle 40: Differenziell exprimierte Gene mit einem log₂FC ≤ - 2 (≥ 4-fache Minderung) in CO₂ relativ zu O₂ in den zwei *Bcbva*-Stämmen

Locus Tag (<i>Ba</i> Vollum)	Locus Tag (<i>Bcbva</i> CI)	Genname	Proteinname (<i>Bcbva</i> CI)	log ₂ FC (O ₂ → CO ₂)			
				<i>Ba</i> Vollum	<i>Ba</i> Dobichau	<i>Bcbva</i> CA	<i>Bcbva</i> CI
DJ46_RS01440	BACI_c12070		hydrolase	-0,82	-0,03	-5,21	-2,28
DJ46_RS03460	BACI_c16260		magnesium transporter	-0,01	-0,97	-3,42	-2,19

DJ46_RS03980	BACI_c17180	<i>fliR</i>	flagellar type III secretion system protein FliR	-0,98	-1,00	-3,53	-2,27
DJ46_RS03985	BACI_c17190	<i>fliB</i>	flagellar type III secretion system protein FliB	-1,24	-0,71	-4,15	-2,65
DJ46_RS04110	BACI_c17430		hypothetical protein	-1,57	-1,83	-3,66	-2,71
DJ46_RS04115	BACI_c17440		cupin domain-containing protein	-1,49	-1,97	-2,44	-2,43
DJ46_RS06135	BACI_c21210	<i>ssb</i>	single-stranded DNA-binding protein	1,10	-0,13	-4,53	-2,01
DJ46_RS06725	BACI_c22510	<i>gabD</i>	aldehyde dehydrogenase family protein	-1,04	-1,86	-2,21	-2,17
DJ46_RS12500	BACI_c34230		ArsB/NhaD family transporter	-1,79	-1,42	-2,46	-2,38
DJ46_RS12630	BACI_c34480		MFS transporter	0,56	-1,01	-4,09	-2,02
DJ46_RS13355	BACI_c35960		alkene reductase	-0,33	-1,12	-4,25	-2,69
DJ46_RS14280	BACI_c37170		lantibiotic protection ABC transporter ATP-binding protein	-0,03	-0,48	-2,68	-2,16
DJ46_RS15420	BACI_c38830		patatin-like phospholipase family protein	0,40	-1,09	-2,99	-2,12
DJ46_RS16040	BACI_c40140		hypothetical protein	0,64	-1,18	-2,05	-3,31
DJ46_RS19350	BACI_c46920		DUF84 family protein	-2,00	-0,88	-2,39	-2,07
DJ46_RS19925	BACI_c48070	<i>feoB</i>	ferrous iron transport protein B	-0,46	0,26	-3,45	-2,97
DJ46_RS19930	BACI_c48080		ferrous iron transport protein A	-0,34	-1,55	-2,14	-2,40
DJ46_RS20015	BACI_c48280		methyltransferase domain-containing protein	-1,65	0,17	-3,07	-2,05
DJ46_RS20130	BACI_c48570	<i>menC</i>	o-succinylbenzoate synthase	0,75	-1,50	-2,97	-2,31
DJ46_RS21365	BACI_c51140		LrgB family protein	-1,52	-1,35	-5,01	-2,76
DJ46_RS24830	BACI_c03210		response regulator transcription factor	0,24	1,23	-2,08	-2,06
DJ46_RS26300	BACI_c05500		NUDIX hydrolase	-1,66	-0,80	-2,33	-2,27
DJ46_RS27810	BACI_c08610	<i>scrA2</i>	PTS transporter subunit EIIC	1,33	-0,58	-6,25	-3,46
DJ46_RS27815	BACI_c08620		DUF871 domain-containing protein	1,71	-1,46	-4,65	-2,85
DJ46_RS27820	BACI_c08630	<i>yfiD</i>	DoxX family protein	1,22	-1,84	-2,87	-2,27
DJ46_RS27835	BACI_c08660		DMT family transporter	-1,61	1,44	-2,84	-2,18
DJ46_RS28250	BACI_c09570		MFS transporter	1,87	0,55	-4,25	-2,26
DJ46_RS28685	BACI_c10560		ring-cleaving dioxygenase	-0,63	-1,60	-2,52	-2,08

log₂FC = Logarithmus des Fold Change zur Basis 2

Tabelle 41: Primerkombinationen mit den Fragmentgrößen und Amplifikationseffizienzen für die Validierung der Daten aus der RNA-Sequenzierung

In die Berechnung der Effizienz wurden die Werte aus drei Verdünnungsstufen einbezogen (10^2 , 10^4 und 10^6 DNA-Moleküle/ μ l). Kalkuliert mit der ABI 7500 Real Time PCR-Software.

Primerkombination	Fragmentgröße [bp]	Amplifikationseffizienz [%]			
		<i>Ba</i> Vollum	<i>Ba</i> Dobichau	<i>Bcbva</i> CI	<i>Bcbva</i> CA
BACI_pCIXO200870_for + BACI_pCIXO200870_rev	129	88,03	91,68	93,43	91,98
BACI_c23220_for + BACI_c23220_rev	138	92,48	95,40	96,01	92,51
BACI_c14620_for + BACI_c14620_rev	143	91,38	98,40	96,14	95,25
BACI_c18140_for + BACI_c18140_rev	108	97,48	96,19	103,31	97,12
BACI_c28060_for + BACI_c28060_rev	161	92,24	93,31	96,74	94,42
rpoB-1856-for + rpoB-1941-rev	86	91,51	93,67	94,65	92,56

Tabelle 42: Optische Dichte der Bakterienkulturen für die Wachstumskurven in R-MM

Ergebnisse der Messungen der OD_{600} der für die Wachstumskurven in R-MM angezogenen Kulturen von den untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen über eine Inkubationsdauer von acht bzw. nach 24 Stunden.

Wachstums- dauer t_x (h)	OD_{600}					
	<i>Ba</i> Vollum	<i>Ba</i> Dobichau	<i>Bcbva</i> CI	<i>Bcbva</i> CA	<i>Bcbva</i> CI-H	<i>Bcbva</i> CA-H
t_0	0,108	0,103	0,108	0,103	0,119	0,112
t_1	0,110	0,108	0,126	0,138	0,141	0,139
t_2	0,123	0,122	0,134	0,168	0,143	0,142
t_3	0,134	0,142	0,159	0,217	0,156	0,154
t_4	0,153	0,159	0,192	0,306	0,178	0,176
t_5	0,218	0,201	0,251	0,456	0,203	0,190
t_6	0,325	0,215	0,372	0,633	0,253	0,231
t_7	0,472	0,287	0,514	0,876	0,312	0,285
t_8	0,681	0,370	0,728	1,115	0,446	0,392
t_{24}	1,359	0,708	1,778	1,642	1,402	1,457

Tabelle 43: Optische Dichte der Bakterienkulturen für die Wachstumskurven in Medium G

Ergebnisse der Messungen der OD₆₀₀ der für die Wachstumskurven in Medium G angezogenen Kulturen von den untersuchten *B. anthracis*- und *Bcbva*-Stämmen über eine Inkubationsdauer von sieben Stunden.

Wachstums- dauer t _x (h)	OD ₆₀₀					
	<i>Ba</i> Vollum	<i>Ba</i> Dobichau	<i>Bcbva</i> CI	<i>Bcbva</i> CA	<i>Bcbva</i> CI-12	<i>Bcbva</i> CA-2
t ₀	0,047	0,037	0,042	0,043	0,116	0,036
t ₂	0,110	0,112	0,288	0,119	0,203	0,111
t ₃	0,267	0,362	0,972	0,694	0,509	0,65
t ₄	0,990	1,073	1,745	1,987	0,970	1,285
t ₅	1,617	1,596	1,931	1,904	1,435	1,414
t ₆	1,809	2,056	1,921	1,953	1,745	1,543
t ₇	1,622	1,789	1,840	1,887	1,867	1,523

Tabelle 44: Primerkombinationen mit den Fragmentgrößen und Amplifikationseffizienzen für die relative Quantifizierung der Genexpression bei der Analyse der Sporulation

In die Berechnung der Effizienz wurden die Werte aus drei Verdünnungsstufen einbezogen (10², 10⁴ und 10⁶ DNA-Moleküle/μl). Kalkuliert mit der ABI 7500 Real Time PCR-Software.

Primerkombination	Fragmentgröße [bp]	Amplifikationseffizienz [%]			
		<i>Ba</i> Vollum	<i>Ba</i> Dobichau	<i>Bcbva</i> CI	<i>Bcbva</i> CA
sigK-for + sigK-1	104	94,20	93,96	95,03	91,95
sigB-for + sigB-rev2	120	93,50	94,73	94,38	94,15
sigG-for + sigG-rev2	136	92,00	96,85	95,30	96,05
spolIID-for + spolIID-rev4	130	91,30	104,40	94,95	94,90
spoVG-for2 + spoVG-rev2	124	96,98	94,30	97,96	94,60
4160-for3 + 4160-rev5	157	n.g.	n.g.	92,84	92,93
cotD-for + cotD-rev2	113	93,36	96,26	98,64	96,16
cotZ-for + cotZ-rev2	127	92,86	96,51	96,40	94,51
spolIE-for + spolIE-rev	134	89,91	88,33	93,54	98,50
sigE-for + sigE-rev	125	95,45	96,66	94,84	90,48
sigF-for + sigF-rev	121	94,75	98,33	95,75	95,99
sasP-for + sasP-rev	112	92,52	94,16	95,84	94,19
murF-for + murF-rev	113	92,15	94,89	95,17	94,91
rpoB-1856-for + rpoB-1941-rev	86	93,80	94,48	93,83	93,70

n.g. = nicht getestet

Tabelle 45: relative Quantifizierung der Sporulationsgene bei den *B. anthracis*-Stämmen

Expressionssteigerungen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der untersuchten Sporulationsgene zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 relativ zu t_0 . Ergebnisse stellen die Mittelwerte der berechneten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten dar.

Gen	<i>Ba Dobichau</i> [$2^{-\Delta\Delta Ct}$]		<i>Ba Vollum</i> [$2^{-\Delta\Delta Ct}$]	
	t_1	t_2	t_1	t_2
<i>sigB</i>	0,14	0,04	1,29	0,06
<i>sigF</i>	0,07	0,11	3,07	0,15
<i>spoVG</i>	0,04	0,06	2,15	0,06
<i>spoIIIE</i>	0,03	0,01	11,47	0,27
<i>sigE</i>	0,07	0,26	13,65	0,74
<i>spoIIID</i>	315	6745,63	4,53	89,29
<i>sigG</i>	42,80	237,01	23,34	37,08
<i>sigK</i>	25,27	3078,81	0,69	7,11
<i>murF</i>	0,47	3,39	1,35	0,51
<i>cotD</i>	0,85	12,81	1,41	0,42
<i>cotZ1</i>	51,56	1003,39	1,57	8,07
<i>sasP1</i>	45,04	10063,14	4,91	21,63

Tabelle 46: relative Quantifizierung der Sporulationsgene bei den *Bcbva*-Wildtypstämmen

Expressionssteigerungen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der untersuchten Sporulationsgene zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 relativ zu t_0 . Ergebnisse stellen die Mittelwerte der berechneten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten dar.

Gen	<i>Bcbva CI</i> [$2^{-\Delta\Delta Ct}$]		<i>Bcbva CA</i> [$2^{-\Delta\Delta Ct}$]	
	t_1	t_2	t_1	t_2
<i>sigB</i>	10,05	0,60	0,30	0,10
<i>sigF</i>	0,96	0,18	10,89	2,66
<i>spoVG</i>	2,95	0,43	0,65	0,17
<i>spoIIIE</i>	3,95	0,19	89,25	14,10
<i>sigE</i>	5,62	1,18	88,60	19,17
<i>spoIIID</i>	621,36	1467,10	0,80	146,33
<i>sigG</i>	3,82	58,86	67,19	111,23
BACI_c43240	50,68	426,37	0,54	46,21
<i>sigK</i>	83,44	317,41	1,66	30,33
<i>murF</i>	2,65	1,07	0,69	0,68
<i>cotD</i>	6,69	17,74	3,14	6,10
<i>cotZ1</i>	158,27	119,43	2,36	116,18
<i>sasP1</i>	158,53	498,31	2,67	70,36

Tabelle 47: relative Quantifizierung der Sporulationsgene bei den *Bcbva*-Sporulationsmutanten
 Expressionssteigerungen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der untersuchten Sporulationsgene zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 relativ zu t_0 . Ergebnisse stellen die Mittelwerte der berechneten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte aus einem biologischen und einem technischen Replikat dar.

Gen	<i>Bcbva</i> CI-12 [$2^{-\Delta\Delta Ct}$]		<i>Bcbva</i> CA-2 [$2^{-\Delta\Delta Ct}$]	
	t_1	t_2	t_1	t_2
<i>sigB</i>	2,46	1,39	0,38	0,47
<i>sigF</i>	1,45	11,24	2,43	2,60
<i>spoVG</i>	2,50	1,22	1,78	1,66
<i>spoIIE</i>	4,66	2,31	0,72	0,48
<i>sigE</i>	2,53	4,11	1,53	1,28
<i>spoIID</i>	0,70	0,84	0,76	2,73
<i>sigG</i>	1,19	1,92	0,29	2,25
BACI_c43240	1,49	1,53	1,60	0,99
<i>sigK</i>	1,62	0,52	0,95	0,74
<i>murF</i>	0,50	0,68	1,31	1,91
<i>cotD</i>	1,52	3,25	4,63	5,54
<i>cotZ1</i>	0,99	0,42	0,26	0,24
<i>sasP1</i>	1,30	1,21	0,36	0,73

Tabelle 48: Repräsentative Zählung an Zellen von *B. anthracis* Dobichau im gleichen Entwicklungsstadium während der Sporenbildung

Dauer [h]	Präparat	Anzahl an Zellen in einem Entwicklungsstadium								
		1	2	3	4	5	6	7	8	Gesamt
2	Q62-01a	193	1	6	0	0	0	1	0	201
4	Q62-02c	141	1	10	0	0	0	0	0	152
4	Q62-02c	64	0	5	0	0	0	0	0	69
5	Q62-03d	201	2	11	0	0	0	0	0	214
6	Q62-04c	156	1	12	88	1	0	0	0	258
7	Q62-05c	116	9	6	11	47	28	0	0	217
8	Q62-06c	99	13	5	4	54	54	1	0	230
9	Q62-07d	98	20	4	0	20	97	7	0	246
24	Q62-08b	224	0	2	0	0	0	0	51	277

Tabelle 49: Repräsentative Zählung an Zellen von *Bcbva* CI im gleichen Entwicklungsstadium während der Sporenbildung

Dauer [h]	Präparat	Anzahl an Zellen in einem Entwicklungsstadium								Gesamt
		1	2	3	4	5	6	7	8	
2	Q57-01d	234	1	8	0	0	0	0	0	243
4	Q57-02c	246	1	6	0	0	0	0	0	253
5	Q57-03a	231	20	8	13	0	0	0	0	272
6	Q57-04c	120	48	1	14	50	7	0	0	240
7	Q57-05b	85	61	4	0	58	30	0	0	238
8	Q57-06c	96	57	1	0	31	54	2	0	241
9	Q57-07a	102	61	1	0	4	64	23	0	255
24	Q72-07	128	0	0	1	6	0	1	178	314

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtliche und sinngemäße Zitate wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass die vorliegende Dissertation weder in dieser noch in einer abgewandelten Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und bisher nicht veröffentlicht wurde.

Berlin, den 26.07.2021

Constanze Gummelt