

# **Untersuchung der Virulenz *Bacillus anthracis*- ähnlicher Isolate aus West- und Zentralafrika**

**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

**Dipl. Biol. Susann Dupke**

aus Merseburg

2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2007 bis Mai 2011 im Zentrum für biologische Sicherheit in der Abteilung für hochpathogene bakterielle Erreger (ZBS 2) am Robert Koch-Institut in Berlin angefertigt. Die Betreuung erfolgte durch Frau Dr. Silke Klee und Herrn PD Dr. Roland Grunow.

## **Gutachter:**

### **1. Herr PD Dr. Roland Grunow**

Robert Koch-Institut Berlin

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

Nordufer 20, 13353 Berlin

### **2. Herr Prof. Dr. Rupert Mutzel**

Freie Universität Berlin

Institut für Biologie – Mikrobiologie

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

Disputation am 31.08.2011

*Meinen Eltern gewidmet*

*Ihr habt mutige Entscheidungen getroffen und  
auf Vieles verzichtet, um Euren Kindern eine Welt  
voller großartiger Möglichkeiten bieten zu können.*

*Wir verdanken Euch alles!*

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Freien Universität Berlin in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

**Publikation:**

Klee, S. R., E. B. Brzuszkiewicz, H. Nattermann, H. Brüggemann, S. Dupke, A. Wollherr, T. Franz, G. Pauli, B. Appel, W. Liebl, E. Couacy-Hymann, C. Boesch, F. D. Meyer, F. H. Leendertz, H. Ellerbrok, G. Gottschalk, R. Grunow, and H. Liesegang. 2010. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. PLoS. ONE. 5

**Tagungsbeiträge:**

S.R. Klee, S. Dupke, H. Liesegang, E. Brzuszkiewicz, F.H. Leendertz and R. Grunow. Characterization and genome sequence of *Bacillus cereus* biovar *anthracis*. Posterpräsentation, Genomes 2008 – Functional Genomics of Microorganisms, Paris, Frankreich 2008

S.R. Klee, S. Dupke, T. Franz, H. Nattermann, F.H. Leendertz, E. Brzuszkiewicz, H. Liesegang, R. Grunow. Sporulation of *Bacillus anthracis* sensu lato strains isolated from African great apes involves a recombination event in the gene for the sigma factor  $\sigma^K$ . Vortrag, Bacillus ACT – The international *B. anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis* conference, Santa Fe, USA, August 2009

S. Dupke, S.R. Klee, T. Franz, H. Nattermann, F.H. Leendertz, E. Brzuszkiewicz, H. Liesegang and R. Grunow. Comparison of virulence gene expression in *B. anthracis* sensu stricto and *B. anthracis* sensu lato strains isolated from African great apes. Vortrag, Medical Biodefense Conference, München, Oktober 2009

## **Danksagung**

Herrn PD Dr. Roland Grunow danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten Dissertationsthemas und dass ich die Arbeit im ZBS 2 des Robert Koch-Instituts unter seiner Leitung anfertigen durfte. Ich möchte ihm außerdem für seine jederzeit offene Tür bei Fragen und Problemen, für seine stets hilfreiche Diskussionsbereitschaft und anregenden Ideen und Strategien zur Lösung der auftretenden Probleme danken. Ein großes, herzliches Dankeschön gilt auch seinem Einsatz für meine Teilnahme an Konferenzen und Auslandsaufenthalten, zu denen ich ohne sein Engagement keine Möglichkeit gehabt hätte.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel bin ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sehr dankbar.

Mein besonderer und größter Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Silke Klee, die mit Ihrer immensen Fachkompetenz und hervorragenden Anleitung den größten Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit hat. Trotz riesigen Arbeitsaufkommens jenseits meiner Dissertation hat sie sich in unzähligen Extrastunden immer Zeit für mich, meine Fragen und Probleme genommen. Eine bessere Betreuung, vor allem in wissenschaftlicher aber auch menschlicher Hinsicht, hat mit Sicherheit kein Doktorand je erfahren dürfen. Liebe Silke, ohne Dein Hirn, Deine Geduld, Deine unglaubliche Aufmerksamkeit für die kleinsten Details, Deinen herrlichen Humor und Deine nie endende Motivation und Aufmunterung wäre ich so manches Mal verzweifelt, egal ob innerhalb oder außerhalb des L3-Labors!

Frau Prof. Dr. Michèle Mock, Frau Dr. Agnès Fouet und Herrn Dr. Pierre Goossens vom Institut Pasteur Paris danke ich herzlich für die inspirierende Zusammenarbeit, die überaus großzügige Bereitsstellung von Bakterienstämmen, Protokollen und Arbeitsmaterial, die anregenden fachlichen Gespräche und Anleitungen und die wunderbare Zeit, die ich in Paris verbringen durfte. Merci beaucoup pour tout!

Dem ganzen Team von ZBS 2 möchte ich für die großartige Zeit danken, die ich während meiner Doktorarbeit hatte. Das Einarbeiten in die komplizierten L3-Tätigkeiten und die langen Stunden im Sicherheitslabor waren dank Eurer Unterstützung leicht zu nehmende Hürden meiner Doktorarbeit. Auch das Arbeitsklima hätte nicht besser sein können, neben vielen hilfsbereiten Ratschlägen und unterstützenden fachlichen Diskussionen kamen Lachen und Spaß in unserem „Hühnerhaufen“ nicht zu kurz. Viele Kolleginnen sind mir sehr ans Herz gewachsen. Nicht nur in langen Gesprächen, die das ausgedehnte, isolierte Arbeiten im L3-Labor mit sich bringt, hatten wir uns viele Dinge zu erzählen. Frau Dr. Tatjana Franz und Frau Angelika Lander gilt ein besonders großes Dankeschön! Nur ihrem unermüdlichen Einsatz und ihrer exzellenten technischen Unterstützung ist es zu verdanken, dass diese Arbeit zum jetzigen Zeitpunkt fertiggestellt werden konnte.

Meinen Eltern und meinem kleinen, großen Bruder kann ich nicht genug danken, dass sie Zeit meines Lebens für mich da waren und es auch heute noch jeden Tag für mich sind. Eure uneingeschränkte Unterstützung und grenzenlose Liebe ist ein wunderbares Geschenk.

Mein Liebster, mein Hallo, ich danke Dir von ganzem Herzen, dass Du jeden einzelnen Tag an meiner Seite bist und alle Höhen und Tiefen mit mir durchlebst. Du schaffst es immer, meinen Blick auf das Wesentliche im Leben zu lenken und gibst mir täglich das Gefühl, etwas Besonderes zu sein.

Ich weiß mein großes Glück zu schätzen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> -----	<b>IV</b>
<b>1. Zusammenfassung</b> -----	<b>1</b>
<b>2. Summary</b> -----	<b>3</b>
<b>3. Einleitung</b> -----	<b>5</b>
<b>3.1 Die <i>Bacillus cereus</i>-Gruppe</b> .....	<b>5</b>
<b>3.2 <i>B. cereus</i></b> .....	<b>5</b>
<b>3.3 <i>B. thuringiensis</i></b> .....	<b>6</b>
<b>3.4 <i>B. anthracis</i> und seine Geschichte</b> .....	<b>7</b>
3.4.1 Ökologie und Epidemiologie von <i>B. anthracis</i> -----	8
3.4.2 Pathogenese und Klinik von <i>B. anthracis</i> -----	9
3.4.3 Bakteriologie und Diagnostik von <i>B. anthracis</i> -----	10
3.4.3.1 Endosporen .....	11
3.4.4 Die Virulenzfaktoren von <i>B. anthracis</i> -----	12
3.4.4.1 Die Anthrax - Kapsel.....	12
3.4.4.2 Die Anthrax - Toxine.....	13
3.4.5 Die Regulation der Virulenzfaktoren-----	15
3.4.5.1 Der sogenannte Bikarbonat – CO <sub>2</sub> – Effekt und der Regulator AtxA .....	15
3.4.5.2 Der pleiotrope Regulator PlcR.....	17
3.4.6 Die Infektion des Wirts mit <i>B. anthracis</i> -----	18
<b>3.5 <i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i></b> .....	<b>19</b>
3.5.1 Herkunft der afrikanischen <i>Bacillus</i> - Isolate-----	19
3.5.2 Einordnung in die <i>B. cereus</i> -Gruppe und Taxonomie-----	20
3.5.3 Charakterisierung von <i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> -----	21
<b>3.6 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Material und Methoden</b> -----	<b>23</b>
<b>4.1 Bakterienstämme und Zelllinien</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2 Enzyme, kommerzielle Systemlösungen und Kits</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3 Größenstandards</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4 Chemikalien und Mediumzusätze</b> .....	<b>25</b>
<b>4.5 Allgemeine Mikrobiologische Techniken</b> .....	<b>25</b>
4.5.1 Nährmedien und Wachstumsbedingungen-----	25
4.5.2 Stammhaltung-----	26
4.5.3 Herstellung von Toxinüberständen und bakteriellem Zellmaterial-----	27
4.5.4 Sporenerstellung-----	27
4.5.5 Sporulationsexperimente-----	28
4.5.6 Elektronenmikroskopie-----	28
4.5.7 Mikrobiologische Färbungen-----	29
4.5.8 Mobilitätstest-----	29
4.5.9 Phagentest-----	30
4.5.10 Sterilkontrollen-----	30
<b>4.6 DNA- und RNA- Techniken</b> .....	<b>31</b>
4.6.1 Untersuchte Gene und verwendete Oligonukleotide-----	31
4.6.2 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien-----	33
4.6.3 Primerdesign-----	33
4.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-----	33
4.6.5 Agarose-Gelelektrophorese-----	34
4.6.6 Dokumentation von Agarosegelen-----	35

4.6.7	Real-Time PCR	35
4.6.8	Isolierung von gesamt-RNA aus Bakterien	37
4.6.9	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
4.6.10	Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA	38
<b>4.7</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>40</b>
4.7.1	Allgemeine Zellkulturarbeiten	40
4.7.1.1	Erhaltungskultur	40
4.7.1.2	Kultur auf Deckgläschen	40
4.7.1.3	Kryokonservierung von Zellen	40
4.7.1.4	Quantifizierung vitaler Zellen	41
4.7.2	Infektion von Makrophagen	41
4.7.3	Zytotoxizitäts-Test	42
<b>4.8</b>	<b>Protein-Techniken</b>	<b>43</b>
4.8.1	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	43
4.8.2	Proteinfärbung nach Coomassie	44
<b>4.9</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>45</b>
4.9.1	Antikörper und Antigene	45
4.9.2	Western Blot	46
4.9.3	Immunfärbung und Detektion mittels Chemilumineszenz	47
4.9.4	Immunfluoreszenz	48
4.9.5	ELISA	49
<b>4.10</b>	<b>Bioinformatik</b>	<b>50</b>
4.10.1	Software und Internet-Datenbanken	50
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
5.1	Mikrobiologische Charakterisierung der untersuchten Stämme	51
5.2	Untersuchung der Sporulation und Insertion im Sporulationsgen <i>sigK</i>	54
5.3	Untersuchung der Genexpression und Genregulation	55
5.3.1	Auswahl der Zielgene	55
5.3.2	Kulturbedingungen und Zellzahlbestimmung	56
5.3.3	RNA-Extraktion	57
5.3.4	Qualitativer Expressionsnachweis	58
5.3.5	Quantitativer Expressionsnachweis mittels Real-Time PCR	60
5.3.6	Relative Quantifizierung der Genexpression	62
5.4	Untersuchung der Toxinproduktion	65
5.4.1	Nachweis der Toxine im Western Blot	66
5.4.2	Konzentrationsbestimmung der Toxine mittels ELISA	68
5.4.3	Zytotoxizitätstest mit toxinhaltigen Kulturüberständen	71
5.4.4	Nachweis von Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C im Western Blot	71
5.5	Untersuchung der Kapselbildung	72
5.5.1	Kapselnachweis durch Tuschefärbung	73
5.5.2	Kapselnachweis mittels Immunfluoreszenztest	74
5.5.3	Kapselnachweis im Western Blot	74
5.5.4	Kapselnachweis im Elektronenmikroskop	75
5.6	Intrazelluläres Verhalten und Keimung im Makrophagen	78
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
6.1	Mikrobiologische Eigenschaften von <i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i>	83
6.2	Sporulation bei <i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i>	84
6.3	Qualitative und quantitative Genexpressionsanalysen	86
6.3.1	Qualitativer Expressionsnachweis	89
6.3.2	Absolute Quantifizierung der Genexpression in der Real-Time RT-PCR durch Mitführen einer Standardkurve	89
6.3.3	Relative Quantifizierung der Genexpression	92



<b>6.4</b>	<b>Toxine</b> .....	<b>95</b>
6.4.1	Qualitativer Nachweis im Western Blot -----	97
6.4.2	Quantifizierung der Toxine -----	98
<b>6.5</b>	<b>Funktionalität der Toxine im Makrophagen-Assay</b> .....	<b>99</b>
<b>6.6</b>	<b><i>plcR</i>-regulierte Virulenzfaktoren</b> .....	<b>100</b>
<b>6.7</b>	<b>Kapsel</b> .....	<b>103</b>
6.7.1	Zweiter Kapseltyp -----	104
<b>6.8</b>	<b>Infektion von Makrophagen mit Sporen</b> .....	<b>105</b>
<b>6.9</b>	<b>Einordnung von <i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> in die <i>B. cereus</i>-Gruppe und seine Verwandtschaft zu <i>B. anthracis</i>.....</b>	<b>109</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> -----	<b>111</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> -----	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> -----	<b>113</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang</b> -----	<b>131</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
α	alpha
A	Österreich
β	beta
γ	gamma
Ab	Antikörper ( <i>antibody</i> )
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
acpA	<i>anthrax capsule activator</i>
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser ( <i>Aqua bidestillata</i> )
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
atxA	<i>anthrax toxin activator</i>
B	Belgien
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BclA	<i>Bacillus-collagen-like-protein of B. anthracis</i>
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bv	biovar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNA
CH	Schweiz
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
D	Deutschland
d. h.	das heißt
DK	Dänemark
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DSHB	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ödemfaktor ( <i>edema factor</i> )
ELISA	<i>enzyme-linked-immuno-sorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
et al.	<i>et altera</i>
etc.	<i>et cetera</i>
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
F	Frankreich
FA	Formaldehyd
Fa.	Firma
FBS	fötales bovines Serum
FeSO <sub>4</sub>	Eisensulfat
FIN	Finnland
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
GenTSV	Gentechnik-Sicherheitsverordnung
HCl	Salzsäure
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
INRA	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>
IP	<i>Institut Pasteur</i>
KBE	Koloniebildende Einheiten
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LB	Luria Bertani
LF	Letalfaktor
Lsg.	Lösung
M	molar
m	milli
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper ( <i>monoclonal antibody</i> )
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
mM	Millimolar

M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MOI	Vielfachheit der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
n	nano
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumkarbonat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCCB	<i>Netherlands Culture Collection of Bacteria</i>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
NL	Niederlande, Holland
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OPD	Orthophenyldiamin
ORF	offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
PA	protektives Antigen
pAb	polyklonaler Antikörper ( <i>polyclonal antibody</i> )
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pFA	Paraformaldehyd
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
<i>plcR</i>	<i>phospholipase C regulator</i>
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PVDF	Poly-Vinylidene-di-Fluorid
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
s. o.	siehe oben

sog.	sogenante
<i>sp.</i>	<i>species</i>
Std.	Stunde
<i>subsp.</i>	Subspezies ( <i>subspecies</i> )
sv	serovar
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur ( <i>melting temperature</i> )
TMP	Trockenmagermilchpulver
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>unit</i>
UE	Untereinheit
UK	Großbritannien ( <i>United Kingdom</i> )
USA	Vereinigte Staaten von Amerika ( <i>United States of America</i> )
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.Chr.	vor Christus
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
x	mal
z.B.	zum Beispiel
ZBS	Zentrum für biologische Sicherheit
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat

# 1. Zusammenfassung

2001 und 2004 kam es in Afrika in Kamerun und an der Elfenbeinküste zu mehreren Todesfällen unter Menschenaffen. Erste molekulargenetische und histologische Untersuchungen ließen nach Ausschluss von viralen letalen Erkrankungen zunächst eine Infektion mit einem neuen Stamm von *B. anthracis* vermuten. Weiterführende molekulargenetische Analysen sowie die Genomsequenzierung eines Stammes von der Elfenbeinküste führten allerdings dazu, die neuen Stämme als *B. cereus* biovar *anthracis* zu bezeichnen, da trotz Vorhandenseins der Virulenzplasmide pXO1 und pXO2 eine engere Verwandtschaft zu *B. cereus* vorliegt als zu Vertretern von *B. anthracis*. In der vorliegenden Arbeit wurden die Primärisolate CI (Elfenbeinküste) und CA (Kamerun) und verschiedene Subklone mittels mikrobiologischen, molekulargenetischen und immunologischen Methoden charakterisiert und mit bekannten Vertretern der *B. cereus*-Gruppe verglichen. Dabei stand vor allem die Untersuchung der Virulenzmechanismen im Vordergrund. Alle sechs einbezogenen afrikanischen *Bacillus*-Isolate sind in der Lage, die für *B. anthracis* charakteristischen und auf den Plasmiden pXO1 und pXO2 kodierten Virulenzfaktoren Protektives Antigen, Letal- und Ödemfaktor und die spezifische Polyglutaminsäurekapsel zu bilden. Außerdem produzieren alle Isolate im Gegensatz zu *B. anthracis* oder *B. cereus* zusätzlich einen zweiten Kapseltyp, der wahrscheinlich aus Hyaluronsäure besteht. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Virulenzfaktoren bei *B. cereus* bv *anthracis* und *B. anthracis* vergleichbar ist. Hierzu wurden Genexpressionsanalysen mittels Real-Time RT-PCR durchgeführt, bei denen die Gene für die Synthese von Toxinen und Kapsel, sowie der Plasmid-kodierte Regulator *acpA* untersucht wurden. Unter wirtsähnlichen Kulturbedingungen, die durch Bikarbonatzusatz im Medium und CO<sub>2</sub>-haltige Atmosphäre simuliert werden können, erfolgt eine verstärkte Expression der Zielgene *pagA*, *cya*, *capB* und *acpA*. Die bei *B. anthracis* und *B. cereus* bv *anthracis* vergleichbare Expressionssteigerung führt zu einer erhöhten Produktion der Kapsel und der Toxinkomponenten, die bei *B. anthracis* jedoch für die Toxine etwas stärker ausgeprägt zu sein scheint. Dies konnte in Immunoblot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gezeigt werden. Der Transkriptionsregulator PlcR, der bei Vertretern der *B. cereus*-Gruppe die Expression einer Vielzahl von virulenzassoziierten Genen reguliert, ist bei *B. anthracis* aufgrund einer charakteristischen nonsense-Mutation inaktiv. Diese Mutation liegt bei *B. cereus* bv *anthracis* zwar nicht vor, allerdings ist PlcR aufgrund einer Insertion im kodierenden Gen dennoch inaktiv. Bestätigt werden konnte dies unter anderem dadurch, dass eine *plcR*-regulierte Phospholipase, die von *B. cereus* und *B. thuringiensis* gebildet wird, nicht nachgewiesen werden konnte. Die Inaktivität von PlcR ist auch die Ursache für die fehlende Hämolyse von *B. cereus* bv *anthracis*, die für Stämme von *B. cereus* und *B.*

*thuringiensis* charakteristisch ist, und als Abgrenzungskriterium zu *B. anthracis* herangezogen wird. Interessanterweise wachsen zwei Subklone von CI mit ausgeprägter  $\beta$ -Hämolyse, obwohl auch hier keine PI-PLC-Aktivität nachweisbar ist. Die Gründe hierfür konnten in der vorliegenden Arbeit nicht hinreichend geklärt werden. Eine Infektion von Makrophagen mit Sporen von *B. cereus* bv *anthracis* zeigte im Gegensatz zu *B. anthracis* keinerlei Auswachsen der Sporen zu vegetativen Zellen oder intrazelluläre Vermehrung. Möglicherweise sind Mutationen bei *B. cereus* bv *anthracis* in zwei verschiedenen Keimungsoperons, die für die Keimung innerhalb von Makrophagen essentiell sind, die Ursache dafür.

Insgesamt bleibt der Ursprung der afrikanischen *Bacillus*-Stämme unklar, auch wenn eine enge Verwandtschaft zu *B. anthracis* nicht nur wegen der vergleichbaren Pathogenität eindeutig ist.

## 2. Summary

In 2001 and 2004 several great apes died of an Anthrax-like disease in Cameroon and the Côte d'Ivoire on the African continent. PCR analysis and histological studies of carcasses led to the assumption that the animals died due to infection with a new strain of *B. anthracis*. Further molecular genetic methods and sequencing of one of the isolates from Côte d'Ivoire revealed a close relationship of the new strains to *B. cereus* rather than *B. anthracis*, even though both characteristic virulence plasmids pXO1 and pXO2 are present. Therefore the African isolates were designated as *B. cereus* biovar *anthracis* CI (for Côte d'Ivoire) and CA (for Cameroon). In the thesis presented here, two primary isolates and four subclones were analyzed by microbiological, immunological and molecular genetic methods and results were compared to those of classic *B. anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*. All six African *Bacillus* isolates tested are able to produce the pXO1-encoded toxin components protective antigen, lethal and edema factor as well as the pXO2-encoded polyglutamic acid capsule. In addition, a second type of capsule, presumably composed of hyaluronic acid, is produced by all isolates, but cannot be found on *B. anthracis* or other strains of the *B. cereus*-group. On the other hand, a comparable regulation system of virulence factors could be displayed for *B. cereus* bv *anthracis* and *B. anthracis*. Using Real-Time RT-PCR, expression analysis of different genes encoding capsule and toxins as well as the plasmid-encoded regulator *acpA* was conducted. Under host-related culture conditions in medium containing bicarbonate and CO<sub>2</sub>, increased expression of *pagA*, *cya*, *capB* and *acpA* could be detected. Levels of enhanced expression of *B. cereus* bv *anthracis* and *B. anthracis* were comparable and led to increased production of capsule and toxins. Using Western Blot analysis with specific antibodies, a slightly pronounced effect related to increased secretion of toxins was observed for cultures of *B. anthracis*. The transcriptional regulator PlcR regulates the expression of many virulence-associated genes in members of the *B. cereus*-group but is inactive in *B. anthracis* due to a characteristic nonsense-mutation. Although this specific mutation is missing in *B. cereus* bv *anthracis*, the regulator is also inactive since an insertion is present in the *plcR* gene. The inactivity of the regulator was confirmed by the lack of a *plcR*-regulated phospholipase that could not be detected in cultures of *B. anthracis* and *B. cereus* bv *anthracis* but was detectable in *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains. The inactivity of PlcR also causes non-hemolytic growth of *B. cereus* bv *anthracis* on blood agar. As strains of *B. cereus* and *B. thuringiensis* display  $\beta$ -hemolysis in contrast to *B. anthracis*, growth on blood agar is used to discriminate *B. anthracis* from other members of the *B. cereus* group. Interestingly, two subclones of the CI-isolate show hemolysis even though no PI-PLC-activity is detectable. No adequate explanation for this could be found in the study presented here. In contrast to *B. anthracis*, infecting macrophages with spores of *B. cereus* bv *anthracis*



displayed no intracellular outgrowth into vegetative bacteria or replication. Therefore mutations within two different germination operons essential for germination in macrophages in *B. cereus* by *anthracis* might be causal.

Finally the source of the new African *Bacillus* isolates remains unclear, even though a close relationship to *B. anthracis* is incontrovertible.

## 3. Einleitung

### 3.1 Die *Bacillus cereus*-Gruppe

Die Gattung *Bacillus* gehört zur Familie der *Bacillaceae* und umfasst eine heterogene Gruppe sporenbildender, gram-positiver Stäbchenbakterien, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen. Die Spezies *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* und *B. anthracis* bilden gemeinsam die sog. *B. cereus*-Gruppe (98,99,183). Die Vertreter dieser Spezies sind eng miteinander verwandt und weisen hoch konservierte chromosomale Gensequenzen auf (4,134,188), obwohl sie sich phänotypisch zum Teil deutlich voneinander unterscheiden und verschiedene ökologische Nischen besiedeln. Auch unterscheiden sich die einzelnen Spezies bezüglich ihrer Pathogenität stark voneinander, die drei Erstgenannten werden als apathogen bis schwach pathogen eingestuft, während *B. thuringiensis* ein Insektenpathogen darstellt (195,209), das auch industriell als biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel in der Umwelt eingesetzt wird. *B. cereus* hingegen ist humanpathogen und mit Lebensmittelvergiftungen assoziiert, die auch einen schweren Verlauf nehmen können. Am bekanntesten und wohl auch am meisten gefürchtet ist *B. anthracis*, der Verursacher des Milzbrandes und einer der ältesten bekannten Zoonose-Erreger ist. In der vorliegenden Arbeit soll hauptsächlich auf *B. cereus* und *B. anthracis* und ihre Verwandtschaftsbeziehung zu kürzlich entdeckten *B. anthracis*-ähnlichen Isolaten aus West- und Zentralafrika eingegangen werden.

### 3.2 *B. cereus*

Bei *B. cereus* handelt es sich um ein fakultativ anaerobes, meist bewegliches Bakterium, das weltweit im Boden sowie in Süß- und Salzwasser vorkommt (18), aber auch als Symbiont den Darm von Invertebraten besiedelt (116). Die von *B. cereus* gebildeten Endosporen sind äußerst resistent gegenüber Umwelteinflüssen und spielen in der Lebensmittelverarbeitung seit langer Zeit eine große Rolle, da es immer wieder zu Lebensmittelkontaminationen mit nachfolgenden schweren Erkrankungen von Verbrauchern kommt. Bei immungeschädigten Patienten kann *B. cereus* zu verschiedenen Sekundärinfektionen führen, wobei auch gesunde Menschen an schweren Diarrhöen und Erbrechen nach Aufnahme von *B. cereus* mit der Nahrung erkranken können (54). Die Ursache hierfür liegt in der Produktion von zwei für Lebensmittelvergiftungen verantwortlichen Toxinen. Eines ist das sog. Erbrechen-Toxin Cereulid, ein kleines, hitzestabiles Peptid, dessen Gene auf einem 270 kbp großen Plasmid kodiert sind (59). Das Zweite ist ein hitzelabiles Enterotoxin, das die Ursache wässriger Durchfälle ist (223). Neben diesen beiden Toxinen produziert *B. cereus* zahlreiche weitere Virulenzfaktoren wie Hämolsine, Phospholipasen oder Proteasen, deren Gene

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 (93,191). Zusätzlich zu Magen-Darm-Erkrankungen kann *B. cereus* sowohl systemische als auch lokale Infektionen verursachen, wenn Sporen in Wunden gelangen. Die oben aufgeführten gewebezerstörenden Toxine können in diesen Fällen zu schweren Krankheitsverläufen mit Sepsis, Pneumonien oder Meningitis führen (18).

*B. cereus* wird gemäß Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) in die biologische Risikogruppe (RG) 2 eingestuft, was bedeutet, dass dieser Erreger eine Infektion beim Menschen hervorrufen kann, eine Verbreitung in der Bevölkerung allerdings unwahrscheinlich ist. Außerdem kann einer Infektion wirksam durch vorbeugende Maßnahmen entgegengewirkt werden, bzw. ist eine Behandlung der Erkrankung normalerweise möglich.

Allerdings wurden auch untypisch pathogene Vertreter von *B. cereus* beschrieben, die Milzbrand-ähnliche Infektionen beim Menschen verursachen können (102,104). Das Isolat *B. cereus* G9241 (104) trägt ein 191 kbp großes Plasmid, das zu 99,6 % identisch zum *B. anthracis*-spezifischen Virulenzplasmid pXO1 ist, auf dem die Gene für die Toxinsynthese kodiert sind (siehe 3.4.4). Es wurde aus dem Blut und Sputum eines Patienten isoliert, bei dem zunächst angenommen wurde, er sei an Lungenmilzbrand erkrankt.

### **3.3 *B. thuringiensis***

Das Insektenpathogen *B. thuringiensis* wird in die biologische RG 1 eingestuft, das heißt, es ist unwahrscheinlich, dass es beim Menschen eine Erkrankung hervorrufen kann. Die insektiziden Eigenschaften von *B. thuringiensis* gehen auf die Bildung von plasmid-kodierten Kristallproteinen zurück, die auf verschiedenste Insektenlarven toxisch wirken (100). Bei der Sporulation werden diese als Cry-, Cyt- oder Delta-Endotoxine bezeichneten Kristalle unter Nährstoffmangel gebildet und formen sich zu mikroskopisch sichtbaren Einschlüssen (190). Sie sind stammspezifisch und haben verschiedene Formen, wirken jedoch alle gleichermaßen porenbildend auf die Darmepithelzellen von Insektenlarven (21). Eine Unterscheidung von *B. thuringiensis* und *B. cereus* ist ohne Nachweis der Cry- und Cyt-Toxin kodierenden Plasmide nicht möglich, da bis heute kein weiteres Spezies-spezifisches Charakteristikum für *B. thuringiensis* beschrieben werden konnte (37,134).

Obwohl *B. thuringiensis* als apathogen für Menschen eingestuft wird, wurden verschiedene Isolate beschrieben, die als opportunistische Erreger für Lebensmittelvergiftungen, Gewebenekrosen oder Atemwegsinfektionen verantwortlich gemacht werden (71,154), was angesichts der schwierigen Abgrenzung zu *B. cereus* als nicht unproblematisch anzusehen ist. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm *B. thuringiensis* serovar (sv) konkukian

strain 97-27 wurde aus der infizierten Beinwunde eines Soldaten isoliert, der keinerlei Vorerkrankungen oder Immundefizienz aufwies (100). Tierversuche an immundefizienten Mäusen bestätigten die Potenz des Isolats, Gewebenekrosen zu verursachen, wenn auch nicht zweifelsfrei bestätigt werden konnte, dass dieser Erreger die eigentliche Ursache für die Wundinfektion darstellte (100). Aufgrund seiner engen Verwandtschaft zu den in dieser Arbeit untersuchten *Bacillus*-Isolaten aus West- und Zentralafrika (siehe Abb. 5, S. 21) wurde *B. thuringiensis* sv konkukian gemeinsam mit den beiden *B. cereus*-Vertretern ATCC 10987 (189) und dem Typstamm DSM 31 (113) als Kontrollstamm in die Untersuchungen mit einbezogen.

### **3.4 *B. anthracis* und seine Geschichte**

*B. anthracis*, der Verursacher des Milzbrandes, wurde 1876 erstmals von Robert Koch als Krankheitserreger beschrieben (131). Die Überlieferungen von Milzbrand als Krankheit bzw. Seuche gehen jedoch bis in die Frühgeschichte zurück, begonnen bei Beschreibungen der Entstehung im frühen Ägypten und Mesopotamien um 5000 v.Chr. (129). Der Name Milzbrand geht dabei auf die Beobachtung an erkrankten Tieren zurück, dass sich die Milz dunkel verfärbt und somit wie verbrannt aussieht. Bis heute sterben weltweit Tiere in regelmäßig auftretenden Ausbrüchen vor allem in einigen Ländern Afrikas, Asiens, Zentral- und Südamerikas sowie in Süd- und Osteuropa, hier tritt Milzbrand endemisch auf (107). Im zwanzigsten Jahrhundert sorgten vor allem bekannt gewordene Ausbrüche wie 1979 in Sverdlovsk (frühere Sowjetunion) für Aufsehen, als mindestens 64 Menschen an Lungenmilzbrand verstarben. Ursache dieses Ausbruchs war das havariebedingte Freisetzen von *B. anthracis*-Sporen aus einer militärischen Anlage für Biowaffenforschung und -produktion (51). Kontakt mit infizierten Tieren oder Tierprodukten ist heute häufige Ursache für einzeln auftretende Milzbranderkrankungen beim Menschen. So sind Infektionen mit *B. anthracis* unter Arbeitern in Wollfabriken keine Seltenheit, auch traten 2006 und 2008 in Großbritannien Fälle von Lungenmilzbrand beim Menschen durch die Verarbeitung von Tierfellen zur Bespannung von Trommeln auf (2).

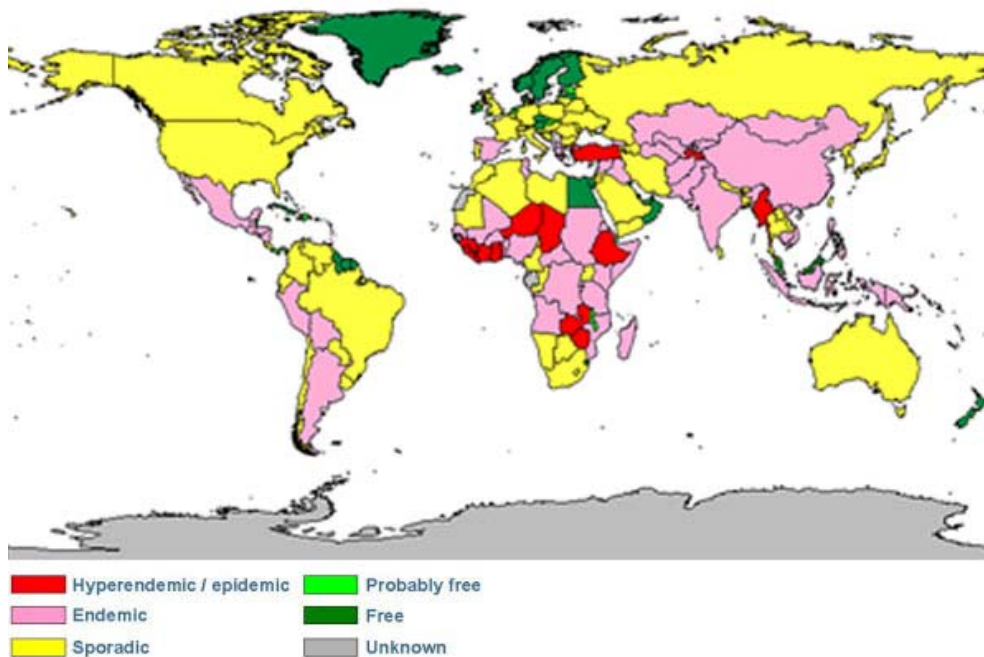
Nach den Anschlägen vom 11. September 2001 in New York kam es an der Ostküste der USA zu 22 Milzbranderkrankungen und fünf Todesfällen durch Lungenmilzbrand, hervorgerufen durch sog. Anthrax-Briefe, in denen Sporen per Brief verbreitet wurden (111). Betroffen waren hier hauptsächlich Postangestellte in den Verteilzentren sowie Personal, das in verschiedenen U.S.-Einrichtungen diese Briefe öffnete. Bereits im Mittelalter wurde *B. anthracis* als primitive biologische Waffe verwendet, indem man verseuchte Tierkadaver über die Burgmauern warf und so die Bewohner infizierte. Während des Ersten und Zweiten Weltkrieges kam es zur Testung von *B. anthracis* als biologischer Kampfstoff durch mehrere Länder, darunter auch Deutschland (16), glücklicherweise kam es aber nie zu einer

Freisetzung der entwickelten Bomben in der Bevölkerung. Aufgrund der Eignung von *B. anthracis* als bioterroristisches Agens wurde dieser Vertreter der *B. cereus*-Gruppe von der CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) in Kategorie A der bioterroristisch relevanten Erreger und Toxine eingestuft. Hierzu zählen Bakterien, Viren und Toxine mit höchstem Gefährdungspotential, da sie leicht verbreitet werden können, eine hohe Morbidität und Mortalität besitzen und Panik in der Bevölkerung auslösen können (34). *B. anthracis* wird somit auch der biologischen RG 3 zugeordnet, zu der Organismen gehören, die beim Menschen eine schwere Krankheit hervorrufen können. Die Gefahr einer Verbreitung in der Bevölkerung kann hier in erster Linie durch Sporenfreisetzung bestehen, eine wirksame Behandlung der Erkrankung ist bei Früherkennung jedoch normalerweise möglich, bei Lungenmilzbrand allerdings schwierig.

Im Gegensatz zu anderen Vertretern innerhalb der *B. cereus*-Gruppe handelt es sich bei *B. anthracis* um einen monophyletischen Klon, der durch drei spezifische Merkmale charakterisiert ist: das Vorhandensein von vier ins Chromosom integrierte Prophagen, eine nonsense-Mutation im *plcR*-Gen an Nukleotid-Position 640 und ein gemeinsames monomorphes Gencluster, das alle Vertreter von *B. anthracis* von anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe auf chromosomaler Ebene unterscheidet (134). Zusätzlich zu diesen Kriterien ist das Vorhandensein von zwei Virulenzplasmiden, auf denen die Gene für die Anthrax-spezifischen Toxine und die Kapsel kodiert sind, das Schlüsselement zur Beschreibung von *B. anthracis*. Im Folgenden soll nun noch genauer auf *B. anthracis* und seine Eigenschaften eingegangen werden.

### **3.4.1 Ökologie und Epidemiologie von *B. anthracis***

Beim durch *B. anthracis* hervorgerufenen Milzbrand handelt es sich um eine weltweit vorkommende Zoonose, die vor allem unter Herbivoren verbreitet ist, an der aber alle Säugetiere inklusive des Menschen erkranken können (161). Fälle von Milzbrand bei Mensch und Tier treten heute auf allen Kontinenten in stark variierender Häufigkeit auf, in Europa sporadisch in Frankreich, Griechenland, Italien, Spanien und auf dem Balkan (63,70,109), in der Türkei hingegen endemisch (siehe Abb. 1). Auch in Deutschland traten 2010 vermutlich aufgrund von kontaminiertem Heroin drei Fälle von Milzbrand bei Drogenabhängigen auf, nachdem der letzte Fall von Milzbrand beim Menschen 1994 gemeldet wurde (13,185) und 2009 einige Fälle bei Rindern auftraten. Der Ursprung der Mehrheit der humanen Infektionen liegt im Kontakt des Menschen mit infizierten Tieren oder Tierprodukten wie Fleisch, Knochen, Wolle, Haut oder Fell. Somit haben Berufsgruppen, die diese Tierprodukte verarbeiten, ein erhöhtes Risiko, sich zu infizieren. Eine Übertragung der Krankheit von Mensch zu Mensch ist jedoch noch nie beobachtet worden.



**Abbildung 1: Vorkommen von Milzbrand**  
© [http://www.vetmed.lsu.edu/whocc/mp\\_world.htm](http://www.vetmed.lsu.edu/whocc/mp_world.htm)

Nach Aufnahme von im Boden persistierenden Sporen durch Gras oder Äsen erfolgt die Infektion des Wirtstiers durch Auskeimen der Sporen in vegetative Zellen, die sich vermehren und Virulenzfaktoren wie Kapsel und Toxine bilden. Das infizierte Tier stirbt und mit Austreten der kontaminierten Körperflüssigkeiten sporulieren die vegetativen Zellen bei Kontakt mit Sauerstoff (161). Die Versporung wird dabei durch die eintretenden Fäulnisprozesse im Tierkadaver begünstigt, die bei den vegetativen Bakterien Stress durch Nährstoffmangel und ein lebensfeindliches Umgebungsmilieu induzieren (124). Die entstehenden Sporen können so den Boden ganzer Areale für lange Zeit kontaminieren, wie es beispielsweise auf der britischen Insel Guinard Island der Fall war. Dort wurden während des Zweiten Weltkriegs Milzbrandbomben getestet und Schafe künstlich mit *B. anthracis* infiziert, 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 (152,249).

### 3.4.2 Pathogenese und Klinik von *B. anthracis*

Eine Infektion mit *B. anthracis* kann durch Aufnahme über Hautverletzungen, durch Einatmen der Sporen oder durch Verschlucken hervorgerufen werden. Die am häufigsten auftretende Form ist hierbei der sog. Hautmilzbrand, der ca. 90 % aller Infektionen mit *B. anthracis* weltweit ausmacht (222). Vor allem an Extremitäten, am Hals oder im Gesicht treten bei dieser Form schorfbedeckte, nekrotische Geschwüre auf, die durch die bakteriellen Toxine nach Eindringen des Erregers über kleinste Hautverletzungen hervorgerufen werden.

Wird Hautmilzbrand nicht mit Antibiotika behandelt, treten in 10 bis 20 % der Fälle durch sich stark vermehrende Bakterien großflächige Ödeme mit nachfolgender Sepsis auf, die zum Tod führt (51).

Der sog. Darmmilzbrand entwickelt sich, wenn Fleisch von an Anthrax erkrankten Tieren verzehrt wird. Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich zwei bis fünf Tagen treten Übelkeit, blutiges Erbrechen und Fieber auf, meist einhergehend mit blutigem Stuhl und starken Abdomenschmerzen aufgrund einer hämorrhagischen Darmentzündung (168). Unbehandelt verläuft die Infektion in der Regel letal.

Nach Inhalation sporenhaltiger Aerosole oder Stäube kann es zu 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 (40). Unbehandelt liegt die Mortalität dieser Milzbrandform bei 100 %. Anzeichen einer Erkrankung nach einer Inkubationszeit von wenigen Tagen sind im Allgemeinen Grippe-ähnliche Symptome wie hohes Fieber mit Schüttelfrost und Muskelschmerzen. Meist kommt es anschließend nach zwei bis drei Tagen zu einer atypischen, schweren Lungenentzündung mit häufig einhergehender Meningitis. Der Patient stirbt nach nur wenigen Tagen an durch Sepsis hervorgerufenem Lungen-, Herz- und Kreislaufversagen. Generell lässt sich eine Infektion mit *B. anthracis* durch verschiedene Antibiotika erfolgreich behandeln, allerdings nur, wenn sie in einem sehr frühen Stadium als solche erkannt wird. Bei Lungenmilzbrand liegt die Letalität trotz Antibiotikabehandlung dennoch bei 50 %.

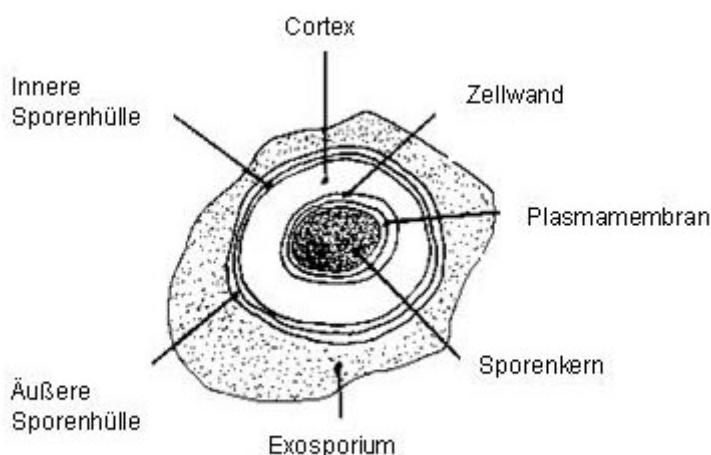
### **3.4.3 Bakteriologie und Diagnostik von *B. anthracis***

Vegetative Zellen von *B. anthracis* sind stäbchenförmig, aerob, fakultativ anaerob und besitzen meist leicht eckige Enden. Die unbeweglichen, Gram-positiven Bakterien bilden in vitro lange Ketten, in vivo liegen sie eher einzeln vor. Der Nachweis von *B. anthracis* kann mikroskopisch, molekularbiologisch und kulturell erfolgen. Um eventuelle Befunde abzusichern, sollte eine Kombination aus allen drei Verfahren angewendet werden. Charakteristische Koloniemorphologie, das Wachstum auf verschiedenen Selektivmedien und eine Untersuchung mit dem diagnostischen  $\gamma$ -Phagen lassen eine Abgrenzung gegenüber anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe zu, jedoch ist die Durchführung einer PCR (Polymerase Chain Reaction) zum Nachweis der Toxin- und Kapselgene unerlässlich, um im schnelldiagnostischen Verfahren einen anderen Vertreter der *B. cereus*-Gruppe ausschließen zu können und *B. anthracis* zu bestätigen. Im Serum von Patienten können ein bis zwei Wochen nach Infektion Antikörper gegen Toxinkomponenten von *B. anthracis* nachgewiesen werden. Der Nachweis des Toxinkomplexes ist bisher keine diagnostische Standardmethode, kann jedoch als Schnelltest hilfreich sein.

### 3.4.3.1 Endosporen

Ebenso wie andere Vertreter der Gattung *Bacillus* ist *B. anthracis* in der Lage, Endosporen zu bilden. Bei bakteriellen Endosporen 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 ausgesetzt ist, wie Nährstoffmangel oder einer hohen Zelldichte. Die mehr als vierzigjährige Lebensdauer von *B. anthracis*-Sporen in kontaminierten Böden ist intensiv erforscht, eine Untersuchung zeigte die Isolation und Rekultivierung aus Knochen von Tieren, die 200 Jahre zuvor an Anthrax verendet waren (49). Die von *B. anthracis* gebildeten Endosporen können mittels mikrobiologischer Färbetechniken leicht sichtbar gemacht werden. Die Versporung einer Kultur setzt bei Nährstoffmangel oder in Sporulationsmedien bei 37 °C bereits nach wenigen Stunden ein und ist nach drei bis sechs Tagen abgeschlossen. Liegt die Temperatur darunter, so findet eine Sporulation nur stark verzögert und in deutlich geringerem Ausmaß statt. Die Sporen von *B. anthracis* sitzen meist mittelständig und treiben die Mutterzelle nicht auf, nach Freisetzung der Sporen stirbt die Mutterzelle ab.

Umgeben wird die Spore durch das Exosporium, die äußere und innere Sporenhülle und den Cortex (siehe Abb. 2). Diese mehrschichtige Hüllstruktur und eine starke Dehydratation des Sporenkerns zum Cortex hin gewährleistet dabei einen wirkungsvollen Schutz vor Degeneration. Die Funktion des bei *B. anthracis* lose, ballonartig um die Sporenhülle liegenden Exosporiums ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Wahrscheinlich ist jedoch, dass es eine selektive Barriere, die vor enzymatischem Angriff schützen soll, darstellt (171,241).



**Abbildung 2: schematischer Sporenaufbau**

Die Sporenceimung, 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. Dies können komplexe Nährstoffe sein, aber auch einzelne Aminosäuren wie L-Alanin, Zucker oder Purin-Nukleoside, wie Adenosin oder Guanosin (212). Die Bindung dieser Moleküle an spezifische Keimungsrezeptoren an der inneren Sporenmembran führen zu einer Signalkaskade, die den Keimungsprozess in Gang setzt (29,64,165). Bei *B. anthracis* handelt es sich dabei um die fünf Keimungsrezeptoren GerH, GerK, GerL, GerS und GerX (32). Die äußere Sporenhülle wird 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.

### **3.4.4 Die Virulenzfaktoren von *B. anthracis***

Voll virulente Stämme von *B. anthracis* besitzen zwei große Plasmide, pXO1 (182 kbp) und pXO2 (96 kbp), deren GC-Gehalt bei ca. 33 % liegt und somit dem des Chromosoms entspricht (161). Auf pXO1 sind die Gene für die Toxinkomponenten Protektives Antigen, Letal- und Ödemfaktor innerhalb einer Pathogenitätsinsel kodiert. Außerdem lässt sich hier auch das Regulationsgen *atxA* und das Operon *gerX* finden, das für die Keimung zuständig ist (85). pXO2 trägt die Gene für die Kapselsynthese und den Regulator *acpA*, der in Gegenwart von Bikarbonat aktiviert wird und bei der Regulation der Kapselbildung eine große Rolle spielt (55,200). 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 (148). Allerdings fehlt in den beschriebenen Fällen ausschließlich pXO2 oder beide Plasmide. Ein Fehlen von pXO1 bei gleichzeitigem Vorhandensein von pXO2 ist extrem selten, bis jetzt sind lediglich zwei Umweltisolate bekannt (134). Im Folgenden soll auf die Kapsel und die Toxine näher eingegangen werden.

#### **3.4.4.1 Die Anthrax - Kapsel**

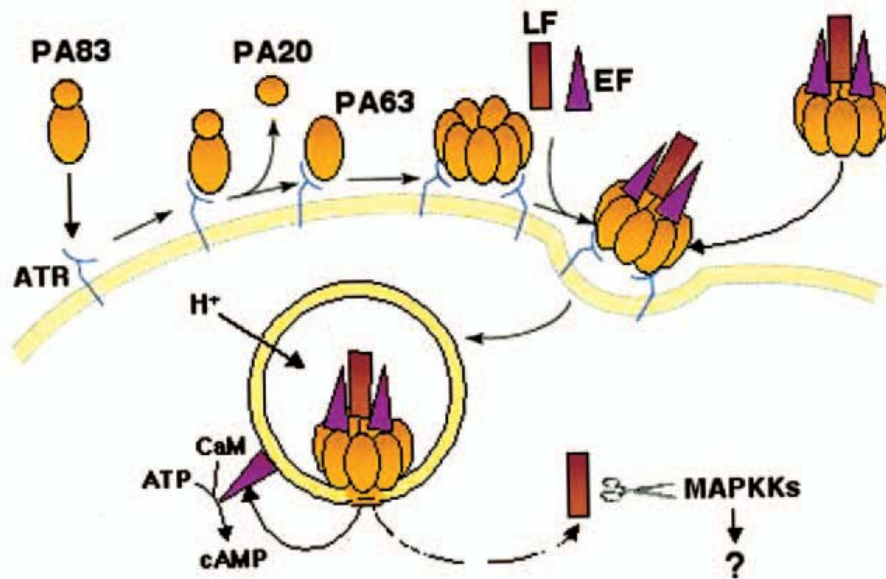
Im Gegensatz zu den meisten anderen bakteriellen Kapseln besteht die für *B. anthracis* spezifische, auf dem Virulenzplasmid pXO2 kodierte Kapsel nicht aus Polysacchariden. Es handelt sich hierbei um ein Polymer aus D-Glutaminsäure, das sowohl in vivo als auch in vitro gebildet wird (67,254), dessen Ausprägung jedoch abhängig von den Wachstumsbedingungen ist. Für die Synthese und Verankerung der Kapsel ist ein Operon aus fünf Genen verantwortlich, *capA*, *capB*, *capC*, *capD* und *capE*. Deren Genprodukte interagieren miteinander und bestimmen die Länge der Glutaminsäure-Ketten und somit die Ausprägung der Kapsel (31,65). Die Poly-D-Glutaminsäurekapsel von *B. anthracis* ist essentiell für vollständige Pathogenität, sie inhibiert die Phagozytose durch Zellen des Immunsystems (150,211) und führt dadurch zur Umgehung der Wirts-Immunabwehr. Dabei ist sie selbst durch ihren Aufbau nur schwach immunogen und begünstigt somit keine

Immunreaktion des Wirts (80,161). Vertreter von *B. anthracis*, denen das Kapselplasmid pXO2 fehlt, oder bei denen das *cap*-Operon inaktiviert wurde, sind mehr oder weniger attenuiert, abhängig vom untersuchten Tiermodell (247). Nach Wachstum auf Agar mit Natriumbikarbonat und Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) ist die Ausbildung einer Kapsel an der glatten bis mukösen Koloniebildung zu erkennen. Stämme von *B. anthracis* ohne Kapselplasmid wachsen dagegen bei gleichen Anzuchtbedingungen mit deutlich rauer Kolonieoberfläche.

#### 3.4.4.2 Die Anthrax - Toxine

*B. anthracis* bildet neben der Kapsel zwei Toxine, die aus drei verschiedenen, ins umgebende Medium sekretierten Proteinen gebildet werden: Protektives Antigen (PA), Letalfaktor (LF) und Ödemfaktor (EF). Voneinander getrennt besitzen diese drei Toxinkomponenten keinerlei toxische Wirkung, in Kombination bilden sie jedoch eine höchst effektive Variation der sog. AB-Toxine (160). PA stellt hierbei die Zell-bindende B-Domäne des jeweiligen Toxins dar. Es kann an LF binden, und so das Letaltoxin bilden, es kann auch an EF binden, was die Bildung des Ödemtoxins zur Folge hat. LF und EF stellen somit die enzymatisch aktiven A-Domänen der jeweiligen Toxine dar, die ins Zytosol der Wirtszelle verlagert werden. Die zu den Proteinen zugehörigen Strukturgene *pagA* (PA), *lef* (LF) und *cya* (EF) sind alle auf pXO1 lokalisiert und ihre Expression soll in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden.

PA besitzt ein Molekulargewicht (molecular weight, MW) von 83 kDa. Der Name „Protektives Antigen“ entstammt der Beobachtung, dass PA die Fähigkeit einer protektiven Immunantwort gegen Milzbrand hervorrufen kann (74). Das Protein bindet an zwei auf nahezu allen Zelltypen exprimierten Oberflächenrezeptoren (62,228). Nach der Bindung von PA an die Wirtszelle wird das bis dahin inaktive Monomer durch zelluläre Proteasen in zwei Untereinheiten gespalten, von denen ein Fragment 20 kDa (PA20), das andere 63 kDa groß ist (PA63) (161). PA20 dissoziiert ins umgebende Medium und gibt so die Bindungsstelle für EF und LF frei. Die größere Untereinheit PA63 oligomerisiert zu einem Heptamer, an das EF oder LF kompetitiv binden und so das jeweilige Toxin bilden (169). Möglich ist hierbei auch eine gleichzeitige Bindung von maximal drei EF- oder LF- Komponenten an ein Heptamer (46). PA kann auch schon vor Bindung an die Wirtszelloberfläche durch freigesetzte Proteasen in seine beiden Untereinheiten gespalten werden. In diesem Fall bindet lediglich PA63 an die spezifischen Rezeptoren, gefolgt von der Anlagerung von EF oder LF (23). Der zusammengefügte Toxinkomplex wird anschließend über Endozytose von der Wirtszelle aufgenommen und fusioniert mit einem Endosom. Der saure pH-Wert verursacht dabei eine Konformationsänderung des PA63-Heptamers, was zur Bildung eines Kationen-selektiven Membrankanals führt, über den EF und LF ins Zytosol gelangen (163,253). Abbildung 3 zeigt den schematischen Ablauf von Bindung und Einschleusung der Toxinkomponenten 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). ATR = Anthrax Toxin Rezeptor, ATP = Adenosintriphosphat, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, CaM = Calmodulin, MAPKKs = Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen

Mock and Mignot, © 2003 Blackwell Publishing Ltd, *Cellular Microbiology*, 5, 15-23

Beim 89 kDa großen EF handelt es sich um eine Adenylatzyklase, die intrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt (144). Dieser Prozess ist abhängig von Calmodulin, einem Kalzium-bindenden Protein, das in Eukaryoten hochkonserviert vorkommt (52). Die physiopathologischen Details der Wirkungsweise von Ödemtoxin auf die Wirtszelle sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch ist bekannt, dass EF im Gegensatz zu LF nach Freisetzung ins Wirtszell-Zytosol mit der Vesikelmembran assoziiert bleibt (87). Nachgewiesen ist auch ein durch Ödemtoxin verursachter dramatischer Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels (136,161). Hierdurch kommt es zur Öffnung von zellulären Membrankanälen, deren Aktivität durch den sekundären Botenstoff cAMP beeinflusst wird. Als Folge verliert die Wirtszelle Flüssigkeit, was zur Ödembildung in Geweben führt und dem Toxin seinen Namen verleiht.

LF besitzt ein MW von 90 kDa, es handelt sich hierbei um eine Zink-abhängige Metalloprotease. Das Enzym spaltet den N-Terminus von Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Kinasen (MAPKK), die in verschiedenste regulatorische Prozesse innerhalb der Zelle wie Mitose, Genexpression oder Apoptose involviert sind. Durch Störung dieser hochkomplexen Signalkaskaden kommt es zum Tod von Makrophagen und dendritischen Zellen (7,57,239), wenn auch hier der molekulare Ablauf dieser Reaktion noch immer nicht vollständig verstanden ist.

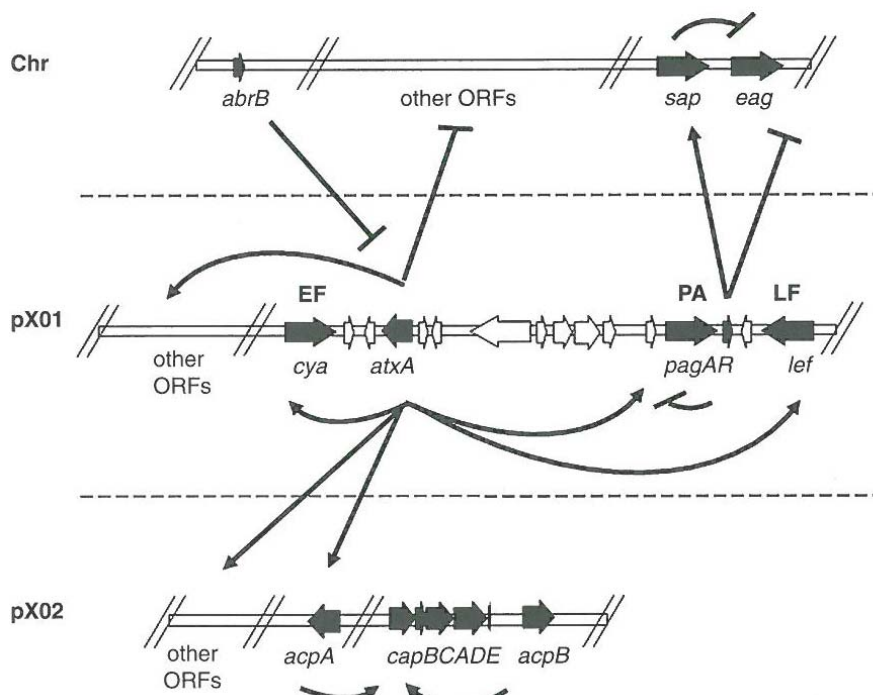
### 3.4.5 Die Regulation der Virulenzfaktoren

Bei der Regulation der Virulenzfaktoren von *B. anthracis* spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Temperatur, Wachstumsphase und das Vorhandensein von Bikarbonat beeinflussen die Expression der beteiligten Struktur- und Regulatorgene. Die Synthese von Kapsel und Toxinen ist Bestandteil eines komplizierten, bis heute noch nicht vollständig verstandenen Regulationsmechanismus, der auch durch das Milieu des Wirtsorganismus bestimmt wird (186). So liegt die optimale Wachstumstemperatur für *B. anthracis* bei 37 °C, bei dieser Temperatur ist auch die Expression der Toxingene *pagA*, *lef* und *cya* höher als bei 28 °C (217). Im Gegensatz dazu beeinflusst die Temperatur die Kapselbildung nicht, für die Expression der Kapselgene ist lediglich das Vorhandensein von Bikarbonat im umgebenden Medium essentiell (68). Sehr stark beeinflusst Bikarbonat auch die Expression der Toxingene. Werden Kulturen von *B. anthracis* in Medium mit Natriumbikarbonat und  $\geq 5\%$  CO<sub>2</sub> angezogen, so ist die Expression der Toxin- und Kapselgene bis zu 60-fach höher als bei Anzucht ohne Bikarbonat und CO<sub>2</sub> (8,55,82,133). Der höchste Gehalt an Toxinen im Kulturüberstand wird unter diesen Anzuchtbedingungen am Ende der exponentiellen Wachstumsphase gemessen, kurz vor dem Eintreten in die stationäre Phase (133,145,217). Die Ursache hierfür unterliegt dem Einfluss des sog. „Übergangszustand-Regulators“ (*transition state regulator*) *abrB*, ein chromosomal kodiertes Gen, das die Expression der drei Toxingene reguliert und Teil des komplexen Regulationsnetzwerkes bei *B. anthracis* ist (200). Im Folgenden soll noch genauer auf den durch Bikarbonat beeinflussten Regulationspfad und die daran beteiligten Regulatorgene eingegangen werden.

#### 3.4.5.1 Der sogenannte Bikarbonat – CO<sub>2</sub> – Effekt und der Regulator AtxA

Es ist bereits lange bekannt, dass vegetative Zellen von *B. anthracis* in Gegenwart von Bikarbonat und CO<sub>2</sub> bei 37 °C die größten Mengen an Toxinen und Kapsel produzieren (145,194). Schon 1964 wurde erstmals eine verstärkte Kapselbildung bei Vorhandensein von Bikarbonat und CO<sub>2</sub> beobachtet (156). Ein komplizierter Regulationsmechanismus ist hierfür verantwortlich, bei dem der auf pXO1 kodierte globale Transkriptionsregulator *atxA* (*Anthrax toxin activator*) eine zentrale Rolle spielt (66). *AtxA* kontrolliert die Expression der Gene des Kapsel-Operons *capBCDAE* (88,235), der Toxingene *pagA*, *lef* und *cya* (48,133,234) sowie verschiedener anderer plasmid- und chromosomal kodierter Gene, wie die der S-layer-Proteine EA1 und Sap (19). Bei der Induktion der Kapselbildung wirkt *atxA* jedoch nicht direkt auf die Expression der Zielgene, sondern indirekt über zwei weitere Regulatorgene, die auf pXO2 liegen, *acpA* (238) und *acpB* (56). In Abwesenheit von *atxA* ist das Transkriptionslevel von *acpB* stark herabgesetzt (55), während dieser Effekt bei *acpA* etwas weniger stark ausgeprägt ist. *AcpA* besitzt sowohl eine Transkriptionsstartstelle, die durch *atxA* reguliert wird, als auch eine *atxA*-unabhängige Startstelle (56). Wie genau die Bikarbonat/CO<sub>2</sub>-abhängige Regulation der beteiligten Gene durch *atxA* abläuft, ist nicht

vollständig geklärt, jedoch sind *atxA*-Deletionsmutanten von *B. anthracis* im Tierversuchsmodell avirulent und überlebende Mäuse weisen eine deutlich verringerte Bildung von Antikörpern gegen die drei Toxinkomponenten PA, LF und EF auf (103). Es gibt keinerlei Hinweise auf eine Bindung des *atxA*-Genprodukts, eines basischen, löslichen Proteins von 56 kDa, an DNA-Sequenzen (162). Überraschenderweise ist auch die Expression von *atxA* selbst konstitutiv und in Gegenwart von CO<sub>2</sub> und Bikarbonat lediglich 2,5-fach höher (56,177). 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 (17). Außerdem scheint die Aktivität von AtxA von Phosphorylierung und Dephosphorylierung konservierter Histidin-Reste des Proteins abzuhängen, die durch Enzyme katalysiert werden, die auch am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt sind (233). Abbildung 4 zeigt die schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen plasmid- und chromosomal kodierten Genen im Regulationsnetzwerk bei *B. anthracis*.



**Abbildung 4: Signaleffekte der Genregulation zwischen Chromosom und Plasmiden**

Schematische Darstellung der Genregulationsmechanismen bei *B. anthracis*

Chr = Chromosom, ORF = offenes Leseraster (*open reading frame*)

Rall and Koehler, © 2011 by John Wiley & Sons, Inc., in *Bacillus anthracis* and Anthrax, 157-177

Auch *atxA* wird von anderen, an den komplexen Regulationsprozessen bei *B. anthracis* beteiligten Regulatorgenen beeinflusst. So scheint das Genprodukt des Regulators *abrB* mit der RNA-Polymerase um eine der beiden Promotor-Bindungsstellen von *atxA* zu konkurrieren (186). Untersuchungen haben aber gezeigt, dass beide Promotoren für die vollständige Aktivierung des Gens essentiell sind (17). Somit hemmt AbrB die *atxA*-Expression, was auch eine Hemmung der Expression der Toxingene zur Folge hat. Dies

konnte an *B. anthracis*-Stämmen mit *abrB*-Deletion gezeigt werden, die in Kultur *atxA* und die Toxingene deutlich früher und in höherem Maße exprimieren als Stämme ohne *abrB*-Deletion (200).

#### 3.4.5.2 Der pleiotrope Regulator PlcR

In *B. thuringiensis* und *B. cereus* wird die Synthese von eher unspezifisch wirkenden Virulenzfaktoren wie Hämolytinen, Proteasen, Phospholipasen und Enterotoxinen durch den pleiotropen Regulator PlcR (Phospholipase C Regulator) geregelt (1,78,146). Wird das kodierende Gen *plcR* bei *B. cereus* und *B. thuringiensis* deletiert, so sind die jeweiligen Stämme im Tierversuch mit Mäusen, bzw. Insektenlarven deutlich weniger virulent oder avirulent (202). Die Transkription von *plcR*, das im Chromosom lokalisiert ist, ist selbstinduzierend und beginnt kurz vor Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (146). *PlcR* ist gemeinsam mit *papR* Teil eines Operons aus zwei Genen, die ein sog. Quorum Sensing-System bilden (176,218). Mit Hilfe dieses Mechanismus sind einzelne Bakterien in der Lage, chemisch miteinander zu kommunizieren und auf diesem Weg die Zelldichte zu ermitteln. Bei der Besiedelung eines Wirts können so beispielsweise Virulenzfaktoren nur dann synthetisiert werden, wenn eine bestimmte Bakterienanzahl überschritten wird, die zu einer Infektion führt (240). *PapR* wird als Vorstufe unter der Kontrolle von *PlcR* gebildet, aus der Bakterienzelle ausgeschleust und als prozessiertes Heptapeptid über ein spezielles Permease-System wieder in die Zelle aufgenommen (78,218). *PapR* bindet dort an das *PlcR*-Protein und ist für die Aktivierung von *PlcR* als Regulator notwendig. Somit reguliert *PlcR* auch die eigene Expression. Der *PapR-PlcR*-Komplex bindet anschließend an eine palindromische DNA-Sequenz, die als sog. *PlcR*-Box bezeichnet wird und jedem *PlcR*-regulierten Zielgen vorgeschaltet ist (1,134).

*B. anthracis* besitzt eine charakteristische Mutation im *plcR*-Gen, die bei keinem anderen Vertreter der *B. cereus*-Gruppe vorhanden ist und den Regulator inaktiv macht (1,220). Dementsprechend sekretiert *B. anthracis* keine signifikanten Mengen an abbauenden Enzymen und ist nicht hämolytisch (158), im Gegensatz zu den meisten Vertretern von *B. cereus* und *B. thuringiensis*, deren sekretierte Menge an extrazellulären Proteinen die von *B. anthracis* um ein Vielfaches übersteigt (79). Das Vorhandensein der nonsense-Mutation im *plcR*-Gen an Nukleotid-Position 640 bei ausnahmslos allen Vertretern von *B. anthracis* wird mit einer Inkompatibilität der beiden Regulatoren *plcR* und *atxA* bei der Sporulation erklärt (69,158). *B. anthracis*-Stämme, in die ein intaktes *plcR* integriert wird, sind 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 (158). 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 (69). Jedoch lässt die Existenz des pXO1-tragenden Stammes *B. cereus* G9241 an der bis dahin allgemein gültigen Theorie zweifeln, da dieser sowohl *atxA* als auch ein intaktes *plcR*-Gen besitzt, was keinerlei Einfluss auf die Sporulationsfähigkeit hat. Auch konnte gezeigt werden, dass *B. anthracis* Sterne, der nach Modifikation in der Lage ist, einen intakten PlcR-PapR-Komplex zu bilden, hämolytisch ist, jedoch unvermindert sporulieren kann (206). Die Insertion eines intakten *plcR*-Gens ins Genom von *B. anthracis* führt nicht zu verstärkter Virulenz. Die Toxizität im Tierversuch mit Mäusen ist hierbei nicht erhöht (158). Daraus lässt sich schließen, dass das *plcR*-Regulon nicht wichtig für die Pathogenität von *B. anthracis* ist (134).

### **3.4.6 Die Infektion des Wirts mit *B. anthracis***

Wie bereits unter 3.4.2 beschrieben, kann eine Infektion mit *B. anthracis* auf mehreren Wegen stattfinden. Am intensivsten in Tiermodellen untersucht ist hierbei die Aufnahme von Sporen über die Atemwege und durch die Haut. Um dem Immunsystem des Wirts entkommen zu können, muss *B. anthracis* der bakteriziden Aktivität von Phagozyten entgehen, die in unterschiedlichen Formen in den meisten Wirtsgeweben vorliegen oder in infizierte Gewebe einwandern (237). Makrophagen sind ein Bestandteil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems, und stellen eine der ersten Abwehrmechanismen des Wirts gegen Pathogene dar. Makrophagen bzw. Monozyten nehmen Pathogene über Phagozytose auf, indem sie diese mit ihrer Zellmembran umschließen und anschließend als Vesikel ins Zellinnere abschnüren. Das Pathogen befindet sich dann im sog. Phagosom, das wiederum innerhalb des Makrophagen mit einem sog. Lysosom fusioniert und damit ein Phagolysosom bildet. Beim Lysosom handelt es sich um ein Zellkompartiment mit niedrigem pH-Wert, das hydrolytische Enzyme und Phosphatasen enthält. Nach Fusion mit dem Phagosom können diese pathogene Partikel aufspalten und somit unschädlich machen.

Generell werden Sporen von *B. anthracis* nach Eindringen in den Wirt von Makrophagen aufgenommen, sind in der Lage intrazellulär zu keimen und zu vegetativen Zellen auszuwachsen und anschließend die Makrophagen zu verlassen (197,199). Genaue Einzelheiten dieses Vorgangs sind allerdings bis heute ungeklärt und werden kontrovers diskutiert. Bekannt ist, dass die Sporen von den Makrophagen zu den nächstgelegenen Lymphknoten transportiert werden (147,213), was auch als „Trojanisches Pferd - Modell“ bezeichnet wird (83). Die Auskeimung und anschließende Vermehrung der vegetativen Bakterien findet dabei auf dem Weg der Makrophage zu den regionalen Lymphknoten oder nach Erreichen derselben statt (75). Die Sporenkeimung geschieht im Phagolysosomen und ist mit einer frühen Expression der Toxingene verbunden (86). Allerdings sind bis heute keine Einzelheiten über die Überlebensstrategie der gekeimten Sporen im Phagolysosomen oder den genauen Mechanismus des Entkommens der vegetativen Zellen aus den Wirtszellen bekannt. Überschreitet jedoch die Anzahl der einwandernden Makrophagen die

Kapazität des Lymphknotens und werden die Erreger durch zytotoxische Effekte aus den Makrophagen freigesetzt, so gelangen die Bakterien in den Blutkreislauf, wo sie sich weiter vermehren (161). Erstmals wurden intrazelluläre vegetative Bakterien in Makrophagen beobachtet (50,86), aber auch dendritische Zellen der Lunge sind am Transport von Sporen durch die epitheliale Zellbarriere beteiligt (22,41). Gezeigt werden konnte dies anhand von Untersuchungen, nach denen auch Makrophagen-freie Mäuse nach Inhalation von Sporen an Anthrax erkrankten (43). Möglicherweise ist die Beteiligung der in der Lunge zahlreich vorhandenen dendritischen Zellen am Transportprozess innerhalb des Wirts auch der Grund für den deutlich schwerwiegenderen Verlauf von Lungenmilzbrand im Vergleich zu Hautmilzbrand (228). Zusätzlich zur Keimung in Makrophagen oder dendritischen Zellen konnte mittels Biolumineszenzversuchen an Mäusen gezeigt werden, dass lokal am Ort der Eintrittsstelle der Sporen in den Wirt eine Keimung stattfindet und es zur lokalen Verbreitung der vegetativen Zellen kommt. Dies geschieht unabhängig vom Portal in den Wirtsorganismus und wurde für Inhalation, kutane und gastrointestinale Infektion von Mäusen beschrieben (76,77).

*B. anthracis* besitzt ein sog. Keimungsoperon *gerX* auf Plasmid pXO1 (161), das allen anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe fehlt. Gemeinsam mit den im Chromosom lokalisierten Operons *gerS* (112) und *gerH* (243) ist *gerX* mit für die Keimung von Sporen im Makrophagen verantwortlich. Ein Ausschalten von einem der drei Operons reduziert die Keimfähigkeit der Sporen deutlich (9,105,112). Es gibt noch keine Antwort auf die Frage, welche Rolle die Anthrax-Toxine bei diesen Vorgängen genau spielen. Gezeigt werden konnte allerdings, dass *B. anthracis*-Vertreter, die nicht in der Lage sind, Letal- und Ödemtoxin zu bilden, nach Keimung innerhalb von Makrophagen nicht überleben, während nur ein *B. anthracis*-Stamm, der pXO1 besitzt und beide Toxine bildet, dazu in der Lage ist (9,84). Ebenso ist noch unklar, welche Rolle die Polyglutaminsäurekapsel von *B. anthracis* im Infektionsverlauf spielt.

### **3.5 *B. cereus* biovar *anthracis***

#### **3.5.1 Herkunft der afrikanischen *Bacillus* - Isolate**

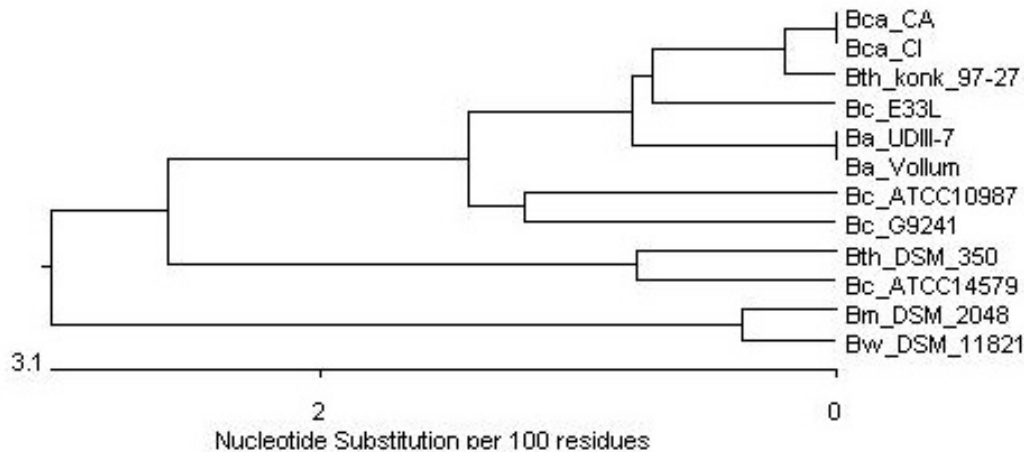
Zwischen Oktober 2001 und Juni 2002 wurden im Regenwald des Taï National Parks, Elfenbeinküste, Todesfälle unter wilden Schimpansen (*Pan troglodytes verus*) beobachtet, deren Gruppen dort seit 1984 bezüglich Verhalten und Gesundheit erforscht werden (140). Insgesamt acht scheinbar gesunde Tiere starben innerhalb weniger Stunden bis Tage an einer akuten Infektion. Die Überreste von sechs Tieren wurden zunächst auf die in der Region endemisch vorkommenden Viren Ebola, Marburg und Lassa untersucht, ohne positiven Befund. Die pathologischen und histologischen Untersuchungen zweier Kadaver zeigten Blutungen annähernd aller inneren Organe, am stärksten betroffen waren



abdominale Organe und die Lunge. Letztere war zusätzlich von Ödemen und Emphysemen gekennzeichnet. Aus den untersuchten Gewebeproben von Milz, Leber, Lunge, Lymphknoten und Darm konnten Gram-positive, stäbchenförmige Bakterien nachgewiesen und auch rekultiviert werden (128), was auf eine akute Infektion als Todesursache hinwies (140). Mittels Real-Time PCR (60) konnte das Vorhandensein der *B. anthracis*-spezifischen Genmarker *capC* und *pagA* und des chromosomalen Markers für die *B. cereus*-Gruppe, *rpoB*, nachgewiesen werden, was zunächst auf eine Infektion mit *B. anthracis* schließen ließ (140). Zwischen Dezember 2004 und Januar 2005 starben drei Schimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*) und ein Gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) im Dja Reservat, Kamerun. Knochen und Muskelgewebe der gefundenen Kadaver wurden ebenso wie die Gewebeproben von der Elfenbeinküste positiv auf *capC*, *pagA* und *rpoB* getestet (141). Aufgrund der Sequenzen der chromosomalen Gene *rpoB* und *gyrB* wurden die Isolate aus West- und Zentralafrika zunächst als neue *B. anthracis*-Stämme eingestuft (142). Weiterführende mikrobiologische, molekulargenetische und Sequenzanalysen führten jedoch dazu, die Isolate zunächst als *B. anthracis*-like (128) und schließlich als *B. cereus* variation *anthracis* (126) zu bezeichnen, was letztlich auf Empfehlung des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) in *B. cereus* biovar (bv) *anthracis* geändert wurde.

### 3.5.2 Einordnung in die *B. cereus*-Gruppe und Taxonomie

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *B. anthracis*-ähnlichen Isolate werden aufgrund ihrer mikrobiologischen und molekulargenetischen Eigenschaften in die *B. cereus*-Gruppe eingestuft (126,128). Die Bezeichnung *B. cereus* bv *anthracis* trägt dabei der Tatsache Rechnung, dass es sich bei den Primärisolaten aus Kamerun, CA (für Cameroon), und der Elfenbeinküste, CI (für Côte d'Ivoire), um Bakterien handelt, die eine Anthrax-ähnliche Infektion hervorrufen und im Tierversuch eine mit *B. anthracis* vergleichbare Letalität aufweisen (M. Mock, pers. Mitteilungen). Der Grund hierfür liegt im Vorhandensein der beiden für *B. anthracis* charakteristischen Virulenzplasmide pXO1 und pXO2, auf denen die Kapsel- und Toxingene kodiert sind, und deren Sequenz zu annähernd 100 % mit der Sequenz von *B. anthracis* identisch ist (126). Die afrikanischen *Bacillus*-Stämme werden jedoch nicht als *B. anthracis* eingestuft, da sie weder die charakteristische Mutation im *plcR*-Gen noch die vier Prophagen-Regionen im Chromosom besitzen (175). Auch zeigen molekulare Typisierungsmethoden wie MLST (*multilocus sequence typing*) (183), dass die afrikanischen Isolate außerhalb des monophyletischen Genclusters von *B. anthracis* liegen (128). Sie sind daher als Vertreter von *B. cereus* zu bezeichnen, deren chromosomaler Hintergrund sie verwandtschaftlich zwischen *B. anthracis* und *B. thuringiensis* sv konkukian einordnet (126,128). Auch eine enge Verwandtschaft zu *B. cereus* E33L, dem Isolat aus einem Zebrakadaver aus Namibia (93), lässt sich aus Abbildung 5 ablesen, die die phylogenetische Einordnung von *B. cereus* bv *anthracis* auf Grundlage von MLST zeigt.



**Abbildung 5: Phylogenetische Analyse von *B. cereus* bv *anthracis***

Phylogenetische Charakterisierung auf Basis von *multi locus sequence typing* (MLST) der *B. cereus*-Gruppe. Basis des phylogenetischen Stammbaums sind die aneinandergesetzten Sequenzen von 7 Haushaltsgenen (183). Bca = *B. cereus* bv *anthracis*, Bth = *B. thuringiensis*, Ba = *B. anthracis*, Bc = *B. cereus*, Bm = *B. mycoides*, Bw = *B. weihenstephanensis*

### 3.5.3 Charakterisierung von *B. cereus* bv *anthracis*

Mikrobiologische und molekulargenetische Untersuchungen von *B. cereus* bv *anthracis* zeigen sowohl gravierende Unterschiede gegenüber Vertretern von *B. anthracis* als auch bedeutende Gemeinsamkeiten mit diesem monophyletischen Klon. Die beiden Primärisolate CI und CA sind im Gegensatz zu *B. anthracis* beweglich und resistent gegenüber dem diagnostischen  $\gamma$ -Phagen (128). Während das Isolat von der Elfenbeinküste sensitiv für Penicillin G ist, ist das Isolat aus Kamerun resistent dagegen (128). Demgegenüber weisen beide Isolate keinerlei Phospholipase C-Aktivität auf, wachsen mit dem für *B. anthracis* charakteristischen „Medusenhaupt“ und sind auf Blutagar nicht hämolytisch, was sie deutlich von anderen Vertretern von *B. cereus* abgrenzt (128). Allerdings sind nach wiederholter Subkultivierung von *B. cereus* bv *anthracis* CI Subklone entstanden, von denen einige eine  $\beta$ -Hämolyse auf Blutagar aufweisen und resistent gegenüber Penicillin G sind (128). Die molekulare Charakterisierung der afrikanischen Stämme zeigte schon kurz nach Isolation aus den Tierkadavern positive PCR-Signale für die Anthrax-spezifischen Markergene *capC* und *pagA* (140). Die Sequenzierung des Genoms von *B. cereus* bv *anthracis* CI bestätigte eine annähernd 100 %-ige Homologie der Virulenzplasmide pCI-XO1 und pCI-XO2 mit pXO1 und pXO2 von *B. anthracis* (126), was auch für die Plasmide von *B. cereus* bv *anthracis* CA zutrifft (S. Klee, pers. Mitteilungen). Die Ergebnisse der Real-Time PCR für den chromosomalen Marker *rpoB* zeigen verzögerte Amplifikationssignale für CI und CA (128), die charakteristisch für mehrere Vertreter von *B. cereus* sind und eine Abgrenzung gegenüber *B. anthracis* in der Real-Time PCR zulassen (60,127). Untersuchungen mittels Immunfluoreszenztest decken bei beiden *Bacillus*-Isolaten das Vorhandensein der für *B. anthracis* spezifischen Poly-D-Glutaminsäurekapsel auf (S. Klee, pers. Mitteilungen), während Western Blot-Analysen die Bildung der Anthrax-Toxinkomponente PA zeigen (128).

Im Tierversuch an Mäusen konnte die Funktionsfähigkeit der Virulenzfaktoren bestätigt werden, die Letalität von CI und CA war dabei mit der von klassischen *B. anthracis*-Vertretern vergleichbar (M. Mock, pers. Mitteilungen). Eine Sequenzierung des *plcR*-Gens von *B. cereus* bv *anthracis* CI enthüllte das Vorhandensein der Insertion einer Einzelbase am 3'-Ende des Gens, die zu einem Protein mit verändertem C-Terminus mit vier zusätzlichen Aminosäuren führt (128). Diese Insertion, die auch beim Isolat aus Kamerun vorhanden ist, führt wahrscheinlich zu einem PlcR-Protein, an das PapR nicht mehr binden kann, was den Funktionsverlust des Proteinkomplexes zur Folge hat (126).

Im Hinblick auf die beschriebenen Charakteristika von *B. cereus* bv *anthracis* lässt sich der Ursprung der Stämme nur vermuten. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen eng verwandten Stamm, der mit *B. anthracis* einen gemeinsamen Vorfahren teilt (128). Möglich ist ebenfalls, dass es sich bei den afrikanischen *Bacillus*-Isolaten um eine im Regenwald endemisch vorkommende Subspezies von *B. anthracis* handelt (126). Es könnte aber auch ein Plasmidtransfer von pXO1 und pXO2 auf einen bis dato unbekanntem *B. cereus*-Vertreter stattgefunden haben (128), wie er bereits in Konjugationsexperimenten innerhalb der *B. cereus*-Gruppe gezeigt werden konnte (10).

### **3.6 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Virulenzmechanismen ungewöhnlicher, *B. anthracis*-ähnlichen *Bacillus*-Isolate zu untersuchen, die aus Menschenaffen von der Elfenbeinküste und Kamerun isoliert wurden. Von besonderem Interesse sind hierbei neben der mikrobiologischen Charakterisierung die von den als *B. cereus* bv *anthracis* bezeichneten Stämmen synthetisierten Toxine und die Polyglutaminsäurekapsel, die eigentlich spezifisch für Vertreter von *B. anthracis* ist. Um Einblicke in die Regulationsmechanismen dieser Virulenzfaktoren zu erhalten, sollen Genexpressionsanalysen verschiedener Struktur- und Regulatorgene durchgeführt werden, um diese mit verwandten Vertretern von *B. anthracis*, *B. cereus* und *B. thuringiensis* zu vergleichen. Durch Anzucht unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen können dabei mögliche Umwelteinflüsse auf die Virulenzmechanismen der Bakterien untersucht werden. Auch soll das Verhalten der *Bacillus*-Isolate im Zellkulturmodell aufgeklärt und dokumentiert werden, da diagnostische Tierversuche im Vorfeld bereits eine mit *B. anthracis* vergleichbare Letalität der Stämme offenbart haben. Durch die Untersuchung der Regulationsmechanismen soll die Pathogenese der Milzbranderkrankung insgesamt besser verstanden werden. Auch soll das Auftreten anderer Phänotypen von Klonen der afrikanischen *Bacillus*-Isolate nach Subkultivierung genauer untersucht werden. Dadurch ist mit einer verlässlicheren Diagnostik der Erreger besonders im Hinblick auf ihre bioterroristische Relevanz zu rechnen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Zelllinien und deren Eigenschaften sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

**Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme**

<b>Stamm</b>	<b>relevante Eigenschaften / Plasmide</b>	<b>Herkunft und Referenz</b>
<i>B. anthracis</i> Vollum (= ATCC 14578)	pXO1, pXO2	W. Beyer (123) Universität Hohenheim, D
<i>B. anthracis</i> UDIII-7	pXO1, pXO2	BgVV Jena (127), D
<i>B. anthracis</i> RPG1 (nur EM)	pXO1, pXO2	M. Mock (73) Institut Pasteur Paris, F
<i>B. thuringiensis</i> sv konkukian strain 97-27	pBT9727	D. Lereclus (100) INRA Paris, F
<i>B. cereus</i> DSM 31 (= ATCC 14579)	Typstamm, pBClin15	DSMZ (113), D
<i>B. cereus</i> ATCC 10987 (= NCCB 72001)	pBc10987	NCCB (189), NL
<i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> „CI“	pCI-XO1, pCI-XO2 (Plasmide homolog zu pXO1 und pXO2), pCI-14	Isolat Milz (Schimpanse „Leo“), ZBS2, RKI (126,140), D
<i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> „CI-1“	pCI-XO1, pCI-XO2, pCI-14	Subklon aus CI, ZBS2, RKI, D
<i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> „CI-18“	pCI-XO1, pCI-14	Subklon aus CI, ZBS2, RKI, D
<i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> „CI-12“	pCI-XO1, pCI-XO2	Isolat Lunge (Schimpanse „Olduvai“) Subklon, ZBS2, RKI
<i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> „CA“	Plasmide homolog zu pXO1 und pXO2	Isolat Zahn (Gorilla) (128,140), ZBS2, RKI, D
<i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> „CA-5“	Plasmid homolog zu pCI-XO1	Subklon aus CA, ZBS2, RKI, D
<i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> “CARP” (nur EM)	Plasmid homolog zu pCI-XO1, $\Delta pagA$	Subklon aus CA, Institut Pasteur Paris, F
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80 lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139$ $\Delta(ara-leu)7697 galJ galK rpsL$ (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, D

**Tabelle 2: Verwendete Zelllinien**

Stamm	Spezies und Typ	Herkunft / Referenz
J774A.1	BALB/c, murine immortalisierte Monozyten/Makrophagen	ATCC, TIB-67, (153), USA
RAW 264.7	BALB/c, murine immortalisierte Monozyten/Makrophagen	ATCC, TIB-71, (187), USA
THP-1	humane Monozyten, nach akuter monozytischer Leukämie	ATCC, TIB-202, (232), USA

## 4.2 Enzyme, kommerzielle Systemlösungen und Kits

In der folgenden Tabelle 3 sind die für PCR, RT-PCR, DNA- und RNA-Isolierung und Klonierung von Standards verwendeten Enzyme, Systemlösungen und Kits aufgelistet.

**Tabelle 3: Verwendete Enzyme, kommerzielle Systemlösungen und Kits**

Enzym/Kit	Hersteller
DNase I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
DNeasy <sup>®</sup> Blood & Tissue Kit	QIAGEN, Hilden, D
Lysozym	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
Proteinase K	QIAGEN, Hilden, D
RiboLock <sup>™</sup> Ribonuclease Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	QIAGEN, Hilden, D
Taq DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
TaqMan <sup>®</sup> Environmental Mastermix 2.0	Applied Biosystems, Darmstadt, D
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

## 4.3 Größenstandards

**Tabelle 4: Verwendete Größenstandards**

Substanz	Hersteller
DNA-Größenstandards: - GeneRuler <sup>™</sup> 100 bp DNA ladder plus - GeneRuler <sup>™</sup> 50 bp DNA ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Protein-Größenstandard: PageRuler <sup>™</sup> Prestained Protein Ladder (10 kDa to 170 kDa)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D

## 4.4 Chemikalien und Mediumzusätze

Alle Chemikalien und Mediumzusätze wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Oxoid (Wesel), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Becton-Dickinson (Heidelberg) bezogen. Einzelheiten hierzu können Tabelle 21 (S. 131 im Anhang) entnommen werden. Für molekularbiologische Arbeiten wurde „Water for molecular biology“ (Fluka) von Sigma-Aldrich verwendet.

## 4.5 Allgemeine Mikrobiologische Techniken

### 4.5.1 Nährmedien und Wachstumsbedingungen

Tabelle 5: Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
Luria Bertani (LB)-Medium (204)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> ; pH 7,0
Luria Bertani (LB)-Agar (204)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> ; pH 7,0
Columbia-Blutagar (61)	39 g Columbia-Blutagar-Basis 23 g Pepton 1 g Stärke 5 g NaCl 10 g Agar ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> ; pH 7,0; autoklavieren, auf 50-55°C abkühlen lassen, 50 ml frisches defibriertes Schafblut zusetzen
Cereus-Selektiv (MYP = Mannitol Egg Yolk Polymyxin) Agar (166)	1 g Fleischextrakt 10 g Pepton 10 g NaCl 10 g Mannit 0,025 g Phenolrot 12 g Agar ad 900 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> ; pH 7,2; autoklavieren, auf 49 °C abkühlen lassen, 100.000 IE Polymyxin B in 2 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> lösen und zu 100 ml Eigelb-Emulsion geben, Eigelb-Emulsion noch flüssigem Agar zusetzen

Nährmedium	Zusammensetzung
Cereus Ident-Agar (Heipha Diagnostika)	siehe Herstellerangaben
Medium G (125)	2,0 g Hefeextrakt 0,025 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 2,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 $\mu\text{l}$ 5 % (w/v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - Stammlösung 100 $\mu\text{l}$ 5 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - Stammlösung 100 $\mu\text{l}$ 0,5 % (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – Stammlösung ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ; pH 7,1; autoklavieren
Rich-Medium (122)	10 g Bacto-Pepton 5 g Hefeextrakt 5 g Malzextrakt 5 g Casamino-Acids 2 g Fleischextrakt 2 g Glycerin 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 $\mu\text{l}$ Tween-80 ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ; pH 7,0; autoklavieren

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Medien bei 121 °C für 20 min autoklaviert und danach bis zu vier Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Nährmedien, die Natriumbikarbonat enthielten, wurden zunächst ohne diesen Zusatz autoklaviert, anschließend wurde 1/10 Volumen sterilfiltriertes Natriumbikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , Stammlösung 8 % in bidest. Wasser gelöst) vor jedem Versuchsansatz frisch hinzugegeben.

Zur Kultivierung der bakteriellen Zellen wurden diese in LB-, Rich-Medium oder in Medium G bzw. auf LB- oder Columbia-Blutagarplatten bei 37 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden zusätzlich bei 200 rpm/min schüttelnd inkubiert, sofern nicht anders angegeben. Kulturen in Rich-Medium wurden außerdem in Gegenwart von 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

#### 4.5.2 Stammhaltung

Da Bakterienzellen in Nährmedien oder auf Agarplatten nur begrenzt lebensfähig sind, bzw. bei längerer Lagerung Sporen ausbilden, 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 und gelagert. Glycerinkulturen sind dabei über mehrere Jahre haltbar.

Des Weiteren wurden die Bakterienstämme mit Hilfe des Cryobank-Systems (Mast Diagnostica, Reinfeld, D) archiviert. Die Bakterienkulturen sind bei diesem System an Keramikkügelchen gebunden und werden bei - 80 °C gelagert. Die Archivierung erfolgte entsprechend des Protokolls der Herstellerfirma.

#### **4.5.3 Herstellung von Toxinüberständen und bakteriellem Zellmaterial**

Um Kulturüberstände von *Bacillus* zu gewinnen, wurden die zu untersuchenden Stämme zunächst in Vorkultur gebracht. Hierzu wurden 3 ml LB-Flüssigmedium in Rundboden-Röhrchen (TPP, Trasadingen, CH) mit einer frischen, auf LB-Agar gewachsenen Einzelkolonie beimpft. Nach 14 bis 18 Stunden schüttelnder Inkubation bei 37 °C wurden 500 µl der Bakteriensuspension in 20 ml des jeweiligen Mediums überimpft und für weitere 20 Stunden in 125 ml-Erlenmeyerkolben mit Belüftungsdeckel (Corning, über VWR, Darmstadt, D) schüttelnd inkubiert. Die Stämme wurden zum einen in LB-Flüssigmedium kombiniert mit atmosphärischem Sauerstoff, zum anderen in Rich-Medium mit 0,8 % Natriumbikarbonat kombiniert mit 5 % CO<sub>2</sub> angezogen. Die Ernte der Kulturüberstände erfolgte durch die Zentrifugation der gesamten Bakteriensuspension in 50-ml Zentrifugenröhrchen für 60 min bei 4 °C und 5000 x g im Ausschwingrotor (Thermo Scientific Heraeus, Schwerte, D). Anschließend wurden die Überstände in frische Zentrifugenröhrchen (TPP, Trasadingen, CH) überführt. Mittels 50 ml-Spritzen (Omnifix, Braun, Melsungen, D) und aufschraubbaren Filteraufsätzen (Schleicher & Schuell, Dassel, D) wurden alle Überstände zunächst durch 0,45 µm und danach nochmals durch 0,22 µm sterilfiltriert. Nach Abnahme von Kulturmaterial für Sterilkontrollen ([siehe 4.5.10](#)) wurden alle Ansätze zu je 1 ml aliquotiert und bei - 80 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert. Wurde bakterielles Zellmaterial für weiterführende Untersuchungen benötigt, wurde den Kulturen jeweils 1 ml Bakteriensuspension nach unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Anschließend wurde 5 min bei 5000 x g zentrifugiert und das Pellet zur schonenderen Inaktivierung zunächst mit 1 ml 4 % Paraformaldehyd (pFA, Carl Roth, Karlsruhe, D) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde das pFA durch 1 ml 10 % Formaldehyd (FA, Carl Roth, Karlsruhe, D) ersetzt und der Ansatz zur Inaktivierung für 12 bis 16 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde das Zellmaterial fünfmal mit sterilem NaCl (0,85 %) gewaschen.

#### **4.5.4 Sporenherstellung**

Zur Herstellung einer Sporensuspension wurde zunächst eine bakterielle Vorkultur in 5 ml LB-Flüssigmedium in Rundboden-Röhrchen für 14 bis 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Von dieser Kultur wurden am nächsten Morgen 4 ml Bakteriensuspension in 96 ml Medium G überführt und in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Belüftungsdeckel drei Tage schüttelnd und zwei weitere Tage stehend bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Sporensuspension wurden



im Anschluss Gram- und Rakettenfärbung durchgeführt (siehe 4.5.7), um den Grad der Versporung zu kontrollieren und mögliche Kontaminationen auszuschließen.

Um die Sporen zu ernten, wurde die Kultur auf 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und mit 5000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Vereinigung der Sporenpellets in 40 ml Aqua bidest. wurde erneut zentrifugiert, das Pellet nochmals in 40 ml Aqua bidest. aufgenommen und dieser Waschschrift noch zwei mal wiederholt, wobei hierbei eine Aufnahme in 20 ml Aqua bidest. erfolgte. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Sporen in 5 ml Aqua bidest. resuspendiert, erneut gewaschen und wieder in 5 ml aufgenommen. Anschließend folgte die Hitzeinaktivierung aller noch verbliebenen vegetativen Zellen bei 65°C für 35 min im Heizblock (Eppendorf, Hamburg, D), gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt. Das Sporenpellet wurde zuletzt in 1 ml Aqua bidest. resuspendiert und die Präparation bei 4 °C gelagert. Vor jedem Einsetzen der Sporensuspension wurde dann aktuell die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) bestimmt. Hierfür wurden serielle Verdünnungsreihen der Sporensuspensionen in Kochsalzlösung (NaCl, 0,85 %) erstellt und in Doppelansätzen je 100 µl auf LB-Agar ausplattiert.

#### **4.5.5 Sporulationsexperimente**

Um die Sporenbildung verschiedener Vertreter der *B. cereus*-Gruppe zu untersuchen, wurden Sporulationsexperimente in Medium G mit anschließender DNA-Extraktion durchgeführt. Dabei sollte das *sigK*-Gen, das den Sporulationsfaktor SigmaK ( $\sigma^K$ ) kodiert, genauer betrachtet werden. Für die Sporulationsexperimente wurden in der vorliegenden Arbeit die zu untersuchenden Stämme in flüssigem Medium G angezogen. Zuerst wurde stets eine bakterielle Vorkultur in 2 ml LB-Flüssigmedium aus einer frisch auf LB-Agar gewachsenen Einzelkolonie erstellt und für 14 bis 18 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden dann 30 ml Medium G mit 300 µl beimpft (1:100) und diese weiter bei 37 °C inkubiert.

Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Kulturaliquots von jeweils 1 ml entnommen und bei 5000 x g für 2 min pelletiert (Tischzentrifuge Eppendorf, Hamburg, D). Nach Abnahme des Überstandes wurde aus dem Bakterienpellet die DNA extrahiert (siehe 4.7.1) und mittels PCR und nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese geprüft, ob die im *sigK*-Gen vorhandene Insertion ausgeschnitten wurde. Zusätzlich wurden zu jedem Zeitpunkt der Probennahme Rakette-Färbungen angefertigt, um die Sporenbildung zu untersuchen.

#### **4.5.6 Elektronenmikroskopie**

Die elektronenmikroskopischen (EM) Untersuchungen erfolgten mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop nach Vorfixierung in Osmiumtetroxid und Ultradünnschnitten (127) in der Abteilung „Toxines et Pathogénies Bactériennes“ am Institut Pasteur in Paris. Hier wurden die bakteriellen Strukturen vor dem Schneiden mit polykationischem Ferritin

angefärbt (114), um die Polysaccharid-Strukturen eines eventuell vorhandenen zweiten Kapseltyps sichtbar machen zu können.

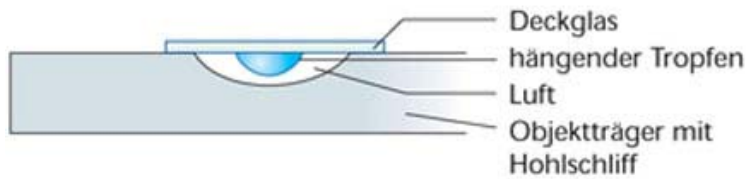
#### **4.5.7 Mikrobiologische Färbungen**

Zur Beurteilung der Morphologie der *Bacillus*-Isolate unter dem Lichtmikroskop wurden Gram-Färbungen mit dem Färbeset der Firma Merck (Darmstadt, D) nach Angaben des Herstellers angefertigt. Zusätzlich wurden bei Anzuchten zur RNA-Gewinnung, der Herstellung von Sporenpräparationen und bei Sporulationsexperimenten 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. Freie Sporen erscheinen bei dieser Färbemethode im Lichtmikroskop grün, vegetative Zellen 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 Formaldehyd (FA)-Lösung auf dem Objektträger fixiert, eine Einwirkzeit von mindestens 12 Stunden diente hierbei gleichzeitig zur Inaktivierung des Kulturmaterials.

Der Nachweis von bakteriellen Kapselstrukturen erfolgte mittels Tuschefärbung. Hierbei werden auf einem Objektträger 5 µl Tusche (Pelikan, Hannover, D) zu 10 µl Bakteriensuspension hinzugegeben. Die dafür verwendeten Bakterienkulturen wurden zunächst 3 min bei 5000 x g pelletiert und anschließend für mindestens 12 Stunden mit 10 % FA inaktiviert. Nach erfolgreicher Sterilkontrolle (siehe 4.5.10) wurde das Probenmaterial mit NaCl (0,85 %) gewaschen und anschließend gefärbt. Ist eine Kapselstruktur vorhanden, so sind die Bakterien bei dieser Färbemethode von einem hellen Kranz umgeben, während der Hintergrund durch die Tusche schwarz erscheint. Zellen ohne Kapselstruktur sind hingegen komplett mit Tusche überfärbt.

#### **4.5.8 Mobilitätstest**

Die in der vorliegenden Arbeit zu charakterisierenden Bakterienstämme wurden auch auf Beweglichkeit untersucht, nach der Methode des sog. hängenden Tropfens (242). Hierzu wurde eine frisch auf Columbia-Blutagar gewachsene Einzelkolonie in 500 µl LB-Flüssigmedium überimpft und durch auf- und abpipettieren eine homogene Bakteriensuspension hergestellt. 10 µl dieser Suspension wurden in die Mitte eines quadratischen Deckgläschens pipettiert. Auf das Deckgläschen wurde anschließend ein Hohlschliff-Objektträger gelegt, ohne dass der Tropfen mit dem Glas in Berührung kam, und mit Vaseline luftdicht fixiert. Vor dem Mikroskopieren wurde der Objektträger umgedreht (siehe Abb. 6), so dass der Präparattropfen vom Deckglas herabhängt.



**Abbildung 6: Technik des hängenden Tropfens**

#### **4.5.9 Phagentest**

Um zu bestimmen, ob die afrikanischen *Bacillus*-Isolate sensitiv für den diagnostischen  $\gamma$ -Phagen sind, wurden alle Stämme einem Phagentest unterzogen. Das hier verwendete  $\gamma$ -Phagenlysat wurde im ZBS2 des Robert Koch-Instituts hergestellt (nach Cherry and Brown, (24)) Für den Phagentest wurde jeweils eine frisch über Nacht auf Columbia-Blutagar gewachsene Einzelkolonie auf Columbia-Blutagar überimpft. Der Ausstrich erfolgte dabei flächendeckend kreisrund, so dass nach Wachstum ein Bakterienrasen entstehen sollte. Direkt im Anschluss an den Ausstrich wurden 15  $\mu$ l der Phagensuspension auf das Areal aufgetropft und der Ansatz für acht bis zehn Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei einem positiven Phagentest war nach der Inkubationszeit eine deutliche, tropfenförmige Freifläche im Bakterienrasen zu beobachten. War hier ein geschlossener Bakterienrasen ohne Lyse durch den  $\gamma$ -Phagen vorhanden, wurde der Phagentest als negativ bewertet.

#### **4.5.10 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. Hierfür wurde jeweils ein Zehntel des Probenvolumens des auszuschleusenden Materials in LB-Flüssigmedium gegeben und für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Material bis zu 100  $\mu$ l Volumen wurden dabei in 2 ml LB-Flüssigmedium inkubiert, Material über 100  $\mu$ l Volumen in 10 ml Medium. Von dieser Anreicherung wurden anschließend 200  $\mu$ l auf Columbia-Blutagar ausgestrichen und für weitere 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Wenn danach kein lebendes Erregermaterial nachweisbar war, wurde das Probenmaterial aus dem Sicherheitslabor ausgeschleust.

## 4.6 DNA- und RNA- Techniken

### 4.6.1 Untersuchte Gene und verwendete Oligonukleotide

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

**Tabelle 6: Untersuchte Gene und verwendete Oligonukleotide**

Gen	Genfunktion	ORF	Oligo-nukleotid	Verwendung
<i>acpA</i>	Kapsel-Biosynthese Regulator	BACI_pCIXO200830	acpA-cDNA	cDNA-Synthese
			acpA-S	PCR, qRT-PCR
			acpA-R	PCR, qRT-PCR
<i>aloA</i>	Anthrolysin O	BACI_c32520	alo-rev2	cDNA-Synthese
			alo-for	PCR
			alo-rev3	PCR
<i>atxA</i>	Transkriptionsregulator	BACI_pXO101440	atxA-cDNA	cDNA-Synthese
			atxA-for	PCR
			atxA-rev	PCR
<i>capB</i>	Kapsel-Biosynthese Protein	BACI_pCIXO200640	capB-cDNA	cDNA-Synthese
			capB-S	PCR, qRT-PCR
			capB-R	PCR, qRT-PCR
			capB-TM	qRT-PCR
<i>cerA</i>	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C	BACI_c06850	cerA-cDNA	cDNA-Synthese
			cerA-ex-for	PCR
			cerA-ex-rev	PCR
<i>cya</i>	Ödemfaktor	BACI_pCIXO101370	cya-seq3	cDNA-Synthese
			cya-S	PCR
			cya-R	PCR
			cya-TM	qRT-PCR
<i>gyrB</i>	Untereinheit DNA-Gyrase	BACI_c00050	gyrB-rev1	cDNA-Synthese
			gyrB-S	PCR, qRT-PCR
			gyrB-R	PCR, qRT-PCR
			gyrB-TM	qRT-PCR
<i>hlyII</i>	Hämolyisin II	BACI_c24970	hlyII-cDNA	cDNA-Synthese
			hlyII-for	PCR
			hlyII-rev	PCR

	<b>Genfunktion</b>	<b>ORF</b>	<b>Oligo-nukleotid</b>	<b>Verwendung</b>
<i>lef</i>	Letalfaktor	BACI_pXO101690	lef-seq5	cDNA-Synthese
			lef-seq2	PCR
			lef-seq3	PCR
<i>pagA</i>	Protektives Antigen	BACI_pCIXO101620	pag-seq6	cDNA-Synthese
			PA-S	PCR, qRT-PCR
			PA-R	PCR, qRT-PCR
			PA-TM	qRT-PCR
<i>plcA</i>	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C	BACI_c37040	PLC-R2	cDNA-Synthese, PCR
			PLC-F1	PCR, qRT-PCR
			PLC-S-CI	qRT-PCR
			PLC-R-CI	qRT-PCR
			PLC-TM	qRT-PCR
<i>plcR</i>	Transkriptionsregulator PlcR	BACI_c53450	plcR-S6	cDNA-Synthese, PCR
			plcR-S5	PCR
<i>rpoB</i>	Untereinheit RNA-Polymerase	BACI_c01209	rpoB-1856-for	PCR, qRT-PCR
			rpoB-1941-rev	PCR, qRT-PCR
			rpoB-cDNA	cDNA-Synthese
			rpoB-TM	qRT-PCR
<i>sfp</i>	Serin-Protease (Kollagenase)	BACI_c37050	coll-cDNA	cDNA-Synthese
			coll-S	PCR, qRT-PCR
			coll-R	PCR, qRT-PCR
			coll-TM	qRT-PCR
<i>sigK</i>	Sporulationsfaktor	BACI_c43070	sigK-for	PCR
			sigK-rev	PCR
			sigK-1	PCR
			sigK-2	PCR
			sigK-3	PCR
			sigK-4	PCR
			sigK-5	PCR
			sigK-6	PCR

Die Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer und Sonden (Metabion, Martinsried, D) sind dem Anhang (Tab. 24, S. 135) zu entnehmen.

#### **4.6.2 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien**

Zur Isolierung genomischer DNA aus bakteriellen Erregern wurde das „DNeasy® Blood & Tissue Kit“ von Qiagen (Hilden, D) verwendet. Je nach Zielstellung wurden 1 bis 2 ml Flüssigkultur nach unterschiedlichen Wachstumsperioden bei 5000 g für 2 min pelletiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Resuspendieren des Pellets in 180 µl Lyse-Puffer und einer einstündigen Behandlung mit Proteinase K bei 56 °C. Alle weiteren Schritte erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 bis 100 µl AE-Puffer eluiert.

#### **4.6.3 Primerdesign**

Für das Design spezifischer Primer und Sonden für die Real-Time PCR wurde das Programm Primer Express® (Applied Biosystems, Darmstadt, D) verwendet. Nach Einladen der Zielsequenzen in die Software werden die am besten passenden Primer- und SONDENSEQUENZEN hierbei automatisch ausgewählt und vorgeschlagen, unter der Berücksichtigung der kritischen Einflussgrößen wie Schmelztemperatur, Oligonukleotidlänge oder GC-Gehalt. Primer für cDNA-Synthese und konventionelle PCR wurden manuell ausgewählt. Kriterien dafür waren ein GC-Gehalt von möglichst 50 % bei einer Primer-Länge von 20 bis 25 Nukleotiden und ein G oder C am 3'-Ende, um die Bindung an die Template-DNA im Bereich der Verlängerung durch die Polymerase zu verstärken.

#### **4.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Bei der PCR handelt es sich um eine automatisierte Methode zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Dabei gelingt der Nachweis kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen. Die PCR-Reaktion besteht aus einem wiederholten Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension (Reaktionsansatz und Cyclerbedingungen siehe Tab. 7).

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der präparativen Amplifikation von DNA-Abschnitten und der Analyse von selbst synthetisierten cDNA-Konstrukten. Für alle Reaktionsansätze wurden Reagenzien der Firma Fermentas (St. Leon-Roth, D) verwendet, die Amplifikationsreaktionen fanden in vollautomatischen Thermocyclern (Eppendorf Mastercycler Epgradient, Hamburg, D) statt.

**Tabelle 7: Allgemeiner Ansatz für PCR-Reaktionen und Thermocycler-Bedingungen**

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
2,5 µl 10 × Puffer	94 °C 5 min 1 ×
1,5 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	94 °C 30 s 25 - 35 ×
2,5 µl dNTP-Mix (2 mM)	55 – 60 °C* 30 s
0,5 µl DNA Polymerase (1 U/µl)	72 °C 30 s
0,5 µl Forward-Primer (10 µM)	72 °C 5 min
0,5 µl Reverse-Primer (10 µM)	
1 µl Template-DNA	
ad 25 µl Wasser	

\*die Wahl der Annealing-Temp. richtete sich nach den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer und lag jeweils 5 bis 10 °C darunter. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) wurde annähernd nach der „4+2“-Regel berechnet:  $T_m = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2$

#### 4.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

##### Verwendete Puffer und Lösungen:

1 × TBE                                89 mM Tris Base (10,781 g)  
     89 mM Borsäure (5,501 g)  
     2 mM EDTA-Na<sub>2</sub>  
     ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, pH 8

4 × Agarosegel-Ladepuffer 30 % Saccharose in TE-Puffer (pH 8,0)  
     0,1 % Xylencyanol  
     0,1 % Bromphenolblau

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 und 2 % (w/v) verwendet. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1 × Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE). Die Agarose wurde in 1 × TBE-Puffer aufgeköcht und nach Abkühlen auf etwa 60 °C mit 3 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe, D) pro 100 ml versetzt. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem geeigneten DNA-Größenstandard auf das entsprechende Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit konstanter Spannung von 60 bis 110 V für 30 bis 90 min in Horizontalelektrophorese-Apparaturen (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D). Die anzulegende Spannung und Laufzeit der Elektrophorese war hierbei von der Größe des Gels und der Laufstrecke der zu untersuchenden DNA- Fragmente abhängig.

#### 4.6.6 Dokumentation von Agarosegelen

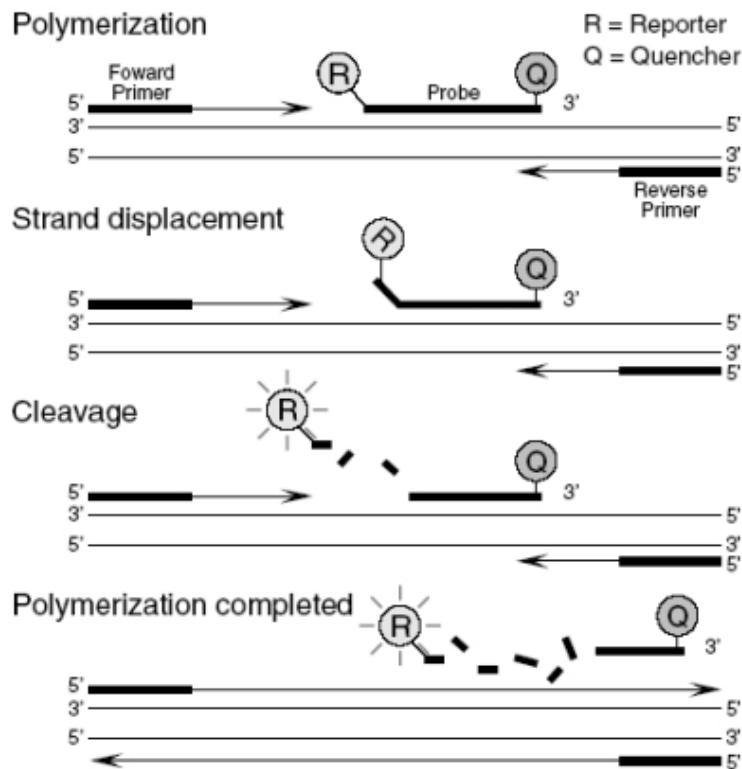
Die Sichtbarmachung und Dokumentation der zu untersuchenden DNA-Fragmente in Agarosegelen erfolgte im UV-Durchlicht (254 nm) mit dem „Molecular Imager ChemiDoc XRS System“ (Bio-Rad, München, D), die Auswertung mit der „Quantity One 1-D Analysis“ Software. Durch das Mitführen eines Größenstandards konnte eine Zuordnung der DNA-Fragmente getroffen werden.

#### 4.6.7 Real-Time PCR

Ein schneller spezifischer Nachweis von DNA kann mittels Durchführung einer Real-Time PCR erfolgen. Durch den Einsatz einer fluorogenen Sonde kann die Amplifikationsreaktion in Echtzeit verfolgt und quantifiziert werden. Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der Verbindung einer konventionellen PCR mit einer fluoreszierenden Sonde, deren Fluoreszenz erst nach spezifischer Bindung innerhalb des PCR-Produkts freigesetzt wird. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten TaqMan-Sonden werden auch als Hydrolyse-Sonden bezeichnet. Die Sonde enthält am 5'-Ende einen sog. „reporter“-Farbstoff (FAM) und am 3'-Ende einen sog. „quencher“-Farbstoff (TAMRA). Die Fluoreszenz des „reporters“ der Sonde wird dabei durch den „quencher“ nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) unterdrückt, indem die Strahlungsenergie von diesem aufgenommen wird. Während der Polymerisation wird die Sonde durch die Taq-DNA-Polymerase geschnitten, da diese neben der Polymerase-Aktivität zusätzlich über eine Exonuklease-Aktivität verfügt. Dies führt zur Separation des „quenchers“ vom „reporter“-Farbstoff, so dass das Fluoreszenzsignal des „reporters“ detektierbar wird. Die Intensität des Signals ist dabei proportional zur Menge der vorhandenen Ziel-DNA und ermöglicht hierdurch durch Mitführen einer Standardreihe quantitative Aussagen über die in der Reaktion vorhandene DNA-Menge.

Die Real-Time PCR wurde mit dem ABI7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, D) durchgeführt, die Auswertung wurde mit der zugehörigen Gerätesoftware (Version 1.4) vorgenommen.





**Abbildung 7: Funktionsprinzip der Real-Time PCR (© Applied Biosystems)**  
Schematischer Ablauf einer Real-Time PCR-Reaktion. Probe = Sonde

Zur Quantifizierung der cDNA verschiedener Zielgene wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Bei der absoluten Quantifizierung wird die in der Reaktion enthaltene Kopiezahl des Zielgens durch Mitführen einer Plasmid-Standardreihe ermittelt. Zur Herstellung der Plasmid-Standards wurden mittels TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Karlsruhe, D) Plasmide mit den gewünschten Genfragmenten in kompetente *E. coli* TOP 10-Zellen nach Angaben des Herstellers transformiert. Aufgrund der durch den Vektor vermittelten Antibiotikaresistenz konnten anschließend Transformanten selektioniert und über eine Kolonie-PCR bestätigt, sowie durch Sequenzierung überprüft werden. Klone mit korrekter Sequenz wurden anschließend vermehrt und die enthaltenen Plasmide mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) aufgereinigt. Die Plasmidkonzentration wurde photometrisch mit dem Nanodrop<sup>®</sup>-Spektrophotometer bestimmt (siehe 4.6.9) und anhand dieser Konzentration und der errechneten Molmasse konnte die Plasmid-Kopiezahl bestimmt werden. Zur Untersuchung der Genexpression variabel regulierter Zielgene eignet sich vor allem die Methode der relativen Quantifizierung durch Normierung auf ein nicht reguliertes Kontrollgen (157). Hierbei wird nicht die vorhandene Kopiezahl des Zielgens im Reaktionsansatz ermittelt, sondern die Expressionsrate im Verhältnis zum Kontrollgen. Dies hat den Vorteil, dass z.B. eine unterschiedlich hohe Zellzahl bei zwei miteinander zu vergleichenden Bakterienanzuchten in die Berechnung der Expressionsrate mit einfließt. In der vorliegenden Arbeit konnten so durch Festlegung eines Kalibratorwertes, der in diesem

Fall der Expression des zu untersuchenden Zielgens unter nicht-induzierenden Bedingungen entsprach, vergleichende Untersuchungen zur Genregulation durchgeführt werden.

Die Berechnung der Expressionsrate erfolgte mit nachfolgender Formel nach der sog.  $\Delta\Delta Ct$ -Methode (180).

1. Normalisierung des Zielgens gegen die endogene Kontrolle

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

2. Normalisierung gegen den Kalibrator

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

3. Bestimmung der Expressionsrate

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Bei Untersuchung der cDNA-Proben wurden 2  $\mu$ l Template-cDNA pro Reaktion eingesetzt, zur absoluten Quantifizierung mittels Standardkurve 1  $\mu$ l Plasmid-DNA.

**Tabelle 8: PCR-Ansätze und Thermocycler-Bedingungen der Real-Time PCR**

Reaktionsansatz		Temperaturprofil	
6,25 $\mu$ l	TaqMan <sup>®</sup> Environmental Mastermix 2.0	50 °C	2 min
0,25 $\mu$ l	Sonde (10 $\mu$ M)	95 °C	10 min
0,75 $\mu$ l	Sense-Primer (10 $\mu$ M)	95 °C	15 s
0,75 $\mu$ l	Antisense-Primer (10 $\mu$ M)	60 °C	30 s
17 $\mu$ l	Wasser		
2 $\mu$ l	Template cDNA bzw.		
1 $\mu$ l	Plasmid-DNA (abs. Quantifizierung)		40 ×

#### 4.6.8 Isolierung von gesamt-RNA aus Bakterien

Um gesamt-RNA aus Gram-positiven Bakterien zu isolieren, wurde eine Kombination aus Lysepuffer, Phenol/Chloroform und kommerziellen Aufreinigungssäulen des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) verwendet, modifiziert nach Bergman et al. (12) und Jahn et al. (115).

##### Verwendeter Lysepuffer

2% SDS (w/v)

16 mM EDTA

20 mM NaCl

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, pH 8,0

Je nach Zielstellung wurden 1 bis 2 ml Flüssigkultur nach unterschiedlichen Wachstumsperioden bei 5000 x g für 2 min pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 500  $\mu$ l

kochendem Lysepuffer resuspendiert und weitere 3 min bei 100 °C inkubiert. Nach Zugabe von 15 µl 3 M Natriumacetat wurde der Ansatz auf Eis überführt, 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, Carl Roth, Karlsruhe, D) zugegeben und erst durch Umdrehen vorsichtig gemischt, dann gründlich gevortext. Nach 15 min Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation von 5 min bei 4 °C und 12000 x g. Der wässrige Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und je 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 mM EDTA, sowie 2,5 Volumenteile eiskaltes Ethanol (EtOH, 100 %) hinzugefügt. Wieder wurde durch Umdrehen gemischt und der Ansatz anschließend für 12 bis 16 Stunden bei -80 °C inkubiert. Im nächsten Arbeitsschritt folgte eine 25-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g, nach der der Überstand sehr gründlich abgenommen wurde, ohne dabei das entstandene RNA-Pellet zu beschädigen. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und 350 µl RLT-Puffer aus dem RNeasy® Mini Kit hinzugegeben. Alle nachfolgenden Aufreinigungsschritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt, die Elution der RNA erfolgte in 50 µl RNase-freiem Wasser für molekularbiologische Zwecke.

#### **4.6.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurden am Spektrophotometer Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) gemessen. Nukleinsäuren zeigen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm ein Absorptionsmaximum. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ist zu der Nukleinsäurekonzentration in der Lösung proportional und kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden. Eine zusätzliche Messung bei 280 nm lässt eine Aussage über Verunreinigungen mit Proteinen zu. Der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  sollte im Idealfall bei DNA-Messungen bei 1,8 und bei RNA-Messungen bei 2,0 liegen. Das Spektrophotometer wurde vor jedem Messvorgang mit dem jeweiligen Medium, in dem die Nukleinsäuren bei der Elution aufgenommen wurden, geeicht. Zum Messen von DNA- und RNA-Lösungen wurden dabei stets 2 µl direkt auf den Messfühler des Gerätes pipettiert und die Absorption der Lösung bestimmt.

#### **4.6.10 Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA**

Für die Synthese von komplementärer DNA aus bakterieller RNA wurden M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, D) und für die jeweiligen Zielgene spezifische Primer verwendet. Vor jedem Syntheseansatz wurde eine Behandlung der RNA-Lösung mit DNase I (Fermentas, St. Leon-Roth, D) durchgeführt, um eventuell vorhandene DNA-Reste aus der Präparation zu entfernen.

**Tabelle 9: Allgemeiner Ansatz für DNase I-Behandlung von RNA-Präparationen**

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
3 µg gesamt-RNA (2 - 18 µl) 3 µl 10x DNase-Puffer 3 µl DNase I (1 U/µl) ad 24 µl Wasser	37 °C                  30 min

Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden 3 µl 25 mM EDTA zum Ansatz hinzugegeben und weitere 10 min bei 65 °C inkubiert, um die DNase-Aktivität zu stoppen. Das EDTA komplexiert hierbei die im Puffer enthaltenen Magnesiumionen, was ebenfalls zur Inaktivierung der DNase führt. Anschließend wurde die behandelte RNA auf Eis verbracht und für alle nachfolgenden Anwendungen dort belassen. Die Synthese der cDNA erfolgte durch M-MLV, eine Reverse Transkriptase, die drei verschiedene hintereinander geschaltete enzymatische Schritte durchführt. Zuerst synthetisiert sie mit ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymerase ein RNA-DNA-Hybridmolekül, das in einem zweiten Schritt wieder hydrolysiert wird. Dabei wird die RNA von dem Doppelstrang durch die Exoribonukleasefunktion des Enzyms getrennt, anschließend wird die dadurch einzelsträngige DNA zum DNA-Doppelstrang komplementiert.

Für die Synthese von cDNA wurden 3 µl der mit DNase I-behandelten RNA mit 15 µl RNase-freiem Fluka-Wasser und 2 µl spezifischem cDNA-Reverse-Primer (10 µM) versetzt und weitere 10 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurde nachfolgender Synthesemix (alle Reagenzien Fermentas, St. Leon-Roth, D) hinzugefügt:

**Tabelle 10: Synthese-Mix für cDNA aus RNA-Präparationen**

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
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 Wasser	42 °C                  60 min      danach sofort auf Eis überführen

Die gewonnene cDNA wurde bei - 20 °C bis maximal acht Wochen gelagert.

## **4.7 Zellbiologische Methoden**

### **4.7.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten**

#### **4.7.1.1 Erhaltungskultur**

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Alle Zelllinien wurden in sterilen Gewebekulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>, Nunc, Langenselbold, D) im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % relativer Luftfeuchte im Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 10 % Serum FBS clone (beides PAA, Pasching, A) kultiviert. Das fötale Kälberserum wurde hierfür vor Zugabe zum Medium bei 56 °C für 30 min im Wasserbad inkubiert, um verbliebene Proteine des Komplementsystems im Serum zu inaktivieren. Die adhärent wachsenden Zelllinien RAW 264.7 und J77A.4 wurden nach Erreichen der Konfluenz mittels Zellschaber (TPP, Trasadingen, CH) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und mit vorgewärmten frischem Medium 1:10 verdünnt in eine neue Flasche wieder ausgesät. Die Suspensionszelllinie THP-1 wurde alle drei Tage 1:5 mit Medium verdünnt in eine neue Zellkulturflasche überführt.

#### **4.7.1.2 Kultur auf Deckgläschen**

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden Zellen auf vorbehandelten Deckgläschen angezogen. Die Deckgläser wurden hierzu mit 60 % Ethanol / 40 % Salzsäure (HCl) für 30 min gereinigt, anschließend gründlich mit Aqua bidest. gewaschen und für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Nach sterilem Auslegen der Deckgläschen in 24-well-Platten (Nunc, Langenselbold, D) erfolgte die jeweilige Aussaat der Zellen.

#### **4.7.1.3 Kryokonservierung von Zellen**

Für eine Kryokonservierung wurden adhärente Zellen nach Erreichen der Konfluenz vom Kulturflaschenboden mittels Zellschaber gelöst und in Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Suspensionszellen wurden direkt in Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation der Suspension von 5 min bei RT und mit 300 x g, danach wurde der Mediumüberstand vorsichtig verworfen. Das Zellsediment wurde anschließend in 4 °C kaltem Einfriermedium (RPMI 1640 + 20 % FBS clone + 10 % DMSO, Carl Roth, Karlsruhe, D) resuspendiert und in ein 1,8 ml Kryoröhrchen (Nunc, Langenselbold, D) überführt. In einer Einfrierbox („Mr. Frosty“ 5100 Cryo, Nalgene, Roskilde, DK) wurden die Zellen langsam auf -80 °C heruntergekühlt und nach zwei bis sieben Tagen in einen Stickstoff-Lagerbehälter (Biosafe, Cryotherm, Kirchen/Sieg, D) für die Langzeitlagerung bei -196 °C in flüssigem Stickstoff überführt.

Da das als Gefrierschutzmittel zugesetzte Dimethylsulfoxid (DMSO) auch zytotoxisch wirkt, wurden die neu zu kultivierenden Zellen zügig aufgetaut. Hierzu wurden die noch gefrorenen

Zellen in ein Wasserbad verbracht und nach dem Auftauen sofort in 10 ml 4 °C kaltes Zellkulturmedium überführt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (s.o.) wurde das Sediment in vorgewärmtem Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen gegeben.

#### 4.7.1.4 Quantifizierung vitaler Zellen

Zur Bestimmung der Zelldichte (Zellen/ml) und der Zellvitalität wurde der Trypanblau-Test nach einer modifizierten Methode von Phillips und Terryberry (181) durchgeführt. Hierzu wurden ein Volumenteil zu untersuchende Zellsuspension mit einem 1:2-Gemisch aus gebrauchsfertiger Trypanblau-Lösung (0,5 % (w/v), Biochrom AG, Berlin, D) und Zellkulturmedium nochmals 1:5 verdünnt und nach 2 min Inkubationszeit in eine Neubauer-Zählkammer verbracht. Lebende, nicht blau angefärbte Zellen wurden dann unter einem Durchlichtmikroskop ausgezählt.

#### 4.7.2 Infektion von Makrophagen

PBS: 137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, pH 7,2

Für die Infektion von Makrophagen mit Sporen wurden die verwendeten Zelllinien in 24-well-Platten (Nunc, Langensfeld, D) auf Deckgläschen mit einer Zellzahl von  $2,0 \times 10^5$  ausgesät und für 12 bis 16 Stunden inkubiert. Da es sich bei THP-1 um eine Suspensionszelllinie handelt, wurden die Zellen vor Aussaat in Kulturmedium mit 100 ng/ml des Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, Merck Chemicals, Darmstadt, D) aufgenommen, was zur Ausreifung und dem Absetzen der Zellen auf das Deckglas führt (38,231). Zur Infektion der Zellen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und  $2,0 \times 10^6$  Sporen in vorgewärmtem RPMI (+ 10 % FBS clone) auf die Zellen gegeben, was einer MOI von 10 entspricht. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 150 x g, um den Zellkontakt zu den Sporen und damit die Phagozytose zu beschleunigen. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde 30 µg/ml Gentamycin pro well zugegeben und alle Ansätze nochmals 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Sporenüberstand abgenommen und die Zellen fünfmal mit vorgewärmtem RPMI ohne Serumzusatz gewaschen, um extrazellulär verbliebene Sporen zu entfernen. Danach wurde 1 ml frisches vorgewärmtes RPMI (+ 10 % FBS clone) auf die gewaschenen Zellen gegeben und alle Ansätze weiter bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Ansätze dreimal mit PBS (phosphate buffered saline) gewaschen und 30 min bei RT mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Danach folgte die Inaktivierung mit 10 % Formaldehyd-

Lösung für 12 bis 16 Stunden und die anschließende Immunfluoreszenzfärbung. Parallel zum Fixieren der Zellen wurde von jedem Ansatz ein zusätzliches Deckgläschen präpariert, um die Zellzahl der verbliebenen Sporen zu bestimmen. Hierfür wurden nach dem letzten Waschschrift mit PBS 500 µl Triton X-100 (0,1 % in PBS, Carl Roth, Karlsruhe, D) auf die Zellen gegeben. Nach 1 min Inkubation erfolgte die vollständige Lyse der Zellen durch Auf- und Abpipettieren, das Lysat wurde 1:2 mit PBS verdünnt und in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde 30 min bei 65 °C inkubiert, um gekeimte Sporen und eventuell vorhandene vegetative Zellen zu inaktivieren, das andere blieb unbehandelt. Von beiden Ansätzen wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) durch serielle Verdünnungsreihen und Ausplattieren auf LB-Agar bestimmt.

#### **4.7.3 Zytotoxizitäts-Test**

Für die Untersuchung des zytotoxischen Effekts von toxinhaltigen Kulturüberständen verschiedener Bakterien auf Zellen wurde das Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, D) verwendet. Metabolisch aktive Zellen spalten bei diesem Verfahren das Tetrazoliumsals WST (water soluble tetrazolium) enzymatisch, dabei entsteht in Wasser unlösliches, rotes Formazan. Dieser Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden. Zur Durchführung des Tests wurden RAW 264.7-Zellen mit einer Zellzahl von  $4,0 \times 10^4$  in 100 µl in 96-well-Platten (Nunc, Langenselbold, D) ausgesät und für 12 bis 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde danach abgenommen und mit 100 µl des zu testenden Toxinüberstands ersetzt. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden jedem well 10 µl WST-1 zugefügt und der gesamte Ansatz nochmals für 4 Stunden inkubiert. Die Messung der Absorption bei 450 nm erfolgte im Anschluss mit einem ELISA-Reader (Tecan, Männedorf, CH). Alle zu testenden Ansätze und die vom Hersteller empfohlenen Kontrollen und Messungen der Hintergrundabsorption wurden in dreifacher Ausführung getestet. Zusätzlich wurde bei jedem Test eine Kontrolle mit rekombinanten Toxinbestandteilen von PA (500 ng pro well) und LF (50 ng pro well) mitgeführt, um die Sensibilität der Zellen auf die bakteriellen Toxine zu zeigen.

## 4.8 Protein-Techniken

### 4.8.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

#### verwendete Puffer:

4 × Laemmli-puffer	4 ml	10 % (w/v) SDS-Lösung
	2,3 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
	4 ml	Glycerin
	600 µl	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	400 µl	2-Mercaptoethanol
	200 µl	5 % (w/v) Bromphenolblau

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

Für die Untersuchung und Darstellung von Proteinen wurden diese entsprechend ihrer molekularen Masse nach der Methode von Laemmli (139) 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 dann die Auftrennung der einzelnen Proteine aus einem Gemisch nicht mehr nach ihrer jeweiligen Ladung, sondern ihrer Größe.

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 hierfür Trenngele mit 7,5 % oder 12 % Acrylamidlösung verwendet. Zur Herstellung zweier Gele, die jeweils aus Trenn- und Sammelgel bestehen, wurden die folgenden Komponenten miteinander gemischt.

#### Sammelgel (5 %):

H <sub>2</sub> 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



<u>Trenngel:</u>	<b>7,5 %</b>	<b>12 %</b>
H <sub>2</sub> O	3,5 ml	1,75 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,5 ml	1,5 ml
Acrylamidlösung	1,5 ml	2,75 ml
10 % SDS	60 µl	60 µl
TEMED	8 µl	8 µl
25 % APS	8 µl	8 µl

Für die SDS-PAGE wurden Minigelapparaturen (Biometra, Göttingen, D) mit 1 mm dicken „Spacern“ verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit 4 × Laemmli-puffer (s.o.) gemischt und die Proteine für 5 min bei 95 °C denaturiert, bevor sie gemeinsam mit einem Protein-Größenstandard auf das Gel aufgetragen wurden. Für den Einlauf des Proteingemisches ins Sammelgel wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Zur Auftrennung der Proben im Trenngel wurde die Spannung auf 180 V erhöht. Als Elektrophoresepuffer diente 1 × SDS-PAGE Laufpuffer (s.o.). Das Gel wurde unmittelbar nach der Elektrophorese für einen Immunoblot verwendet oder mit Coomassie-Farbstoff angefärbt.

#### **4.8.2 Proteinfärbung nach Coomassie**

Coomassie-Färbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie-Brillant-Blue R250  
25 % (v/v) Isopropanol  
10 % (v/v) Essigsäure  
65 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Coomassie-Entfärber: 10 % (v/v) Essigsäure  
40 % (v/v) Methanol  
50 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Für die Sichtbarmachung der zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde Coomassie-Brillant-Blue R250 Farbstoff (Carl Roth, Karlsruhe, D) verwendet. Es handelt sich dabei um einen Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und diese dadurch unspezifisch anfärbt. SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese für 30 bis 60 min bei RT in Coomassie-Färbelösung unter permanenter Bewegung gefärbt. Anschließend erfolgte das Entfernen überschüssiger Farbe bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden über einen Zeitraum von mehreren Stunden durch Inkubation in Coomassie-Entfärbelösung.

## 4.9 Immunologische Methoden

### 4.9.1 Antikörper und Antigene

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

**Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper**

Bezeichnung (Spezies)	Antigen	Anwendung (Konzentration / Verdünnung)	Herkunft / Quelle
A72-24 (Maus)	PI-PLC <i>B. cereus</i> -Gruppe	WB 1:750	c = 1 mg/ml; DSHB, Iowa, USA
BAP0105 (Maus)	PA <i>B. anthracis</i>	ELISA (coating) 1 µg/ml	c = 3,7 mg/ml; Hytest, Turku, FIN
CloneBAL0105 (Maus)	LF <i>B. anthracis</i>	WB 1:2500	c = 2,4 mg/ml; Acris Antibodies, Herford, D
Clone 138 (Maus)	PA <i>B. anthracis</i>	WB 1:1000	c = 0,95 mg/ml; Senova GmbH, Jena, D
EG 4-4 (Maus)	BclA <i>B. anthracis</i>	IF 1:100	c = 1 mg/ml; J. Kearney, Birmingham, USA
F26G3 (Maus)	Kapsel <i>B. anthracis</i>	WB 1:5000 IF 1:500	c = 5 mg/ml; T. Kozel, Reno, USA
H45-EF (Huhn)	EF <i>B. anthracis</i>	WB 1:450 ELISA (detection) 1 µg/ml	c = 1,16 mg/ml; ZBS 2, RKI, Berlin, D
LFA58 (Maus)	LF <i>B. anthracis</i>	ELISA (coating) 2,5 µg/ml	c = 3,7 mg/ml; Hytest
pc133 (Kaninchen)	PA <i>B. anthracis</i>	ELISA (detection) 0,5 µg/ml	c = 1,5 mg/ml; ZBS 2, RKI, Berlin, D
pc134 (Kaninchen)	LF <i>B. anthracis</i>	ELISA (detection) 1 µg/ml	c = 1,17 mg/ml; ZBS 2, RKI, Berlin, D
3BA18Poly (Kaninchen)	Sporenhülle <i>B. anthracis</i>	IF 1:250	c = 5 mg/ml; Acris Antibodies, Herford, D
23-EF-rab (Kaninchen)	EF <i>B. anthracis</i>	ELISA (coating) 1 µg/ml	c = 1 mg/ml; Abcam, Cambridge, UK

**Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper**

Bezeichnung	Anwendung (Verdünnung)	Herkunft
goat $\alpha$ chicken-HRPO	WB 1:2000	c=0,8 mg/ml; Dianova, Hamburg, D
goat $\alpha$ mouse-Alexa 488	IF 1:300	c=2 mg/ml; Molecular Probes/Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
goat $\alpha$ mouse-HRPO	WB 1:2000	c=0,8 mg/ml; Dianova, Hamburg, D
goat $\alpha$ rabbit-Alexa 594	IF 1:300	c=2 mg/ml; Molecular Probes/Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
goat $\alpha$ rabbit-HRPO	WB 1:2000	c=0,8 mg/ml; Dianova, Hamburg, D
rabbit $\alpha$ chicken-HRPO	WB 1:2000	c=0,8 mg/ml; Dianova, Hamburg, D

**Tabelle 13: Verwendete Antigene**

Bezeichnung	Anwendung (Konzentration)	Herkunft
rPA83 <i>B. anthracis</i>	WB 2,2 $\mu$ g/ml ELISA 1 – 0,005 $\mu$ g/ml Zytotoxizitätsassay 5 $\mu$ g/ml	c=1 mg/ml; List Biologicals, Campbell, USA
rLF <i>B. anthracis</i>	WB 4,4 $\mu$ g/ml ELISA 0,5 – 0,005 $\mu$ g/ml Zytotoxizitätsassay 0,5 $\mu$ g/ml	c=1 mg/ml; List Biologicals, Campbell, USA
rEF <i>B. anthracis</i>	WB 2,2 $\mu$ g/ml ELISA 1 – 0,025 $\mu$ g/ml	c=1 mg/ml; List Biologicals, Campbell, USA

#### 4.9.2 Western Blot

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

Als Western Blot bezeichnet man den Transfer von Proteinen auf eine feste Matrix, welche anschließend spezifisch nachgewiesen werden können. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Übertragung der zuvor im SDS-Gel entsprechend ihrem Molekulargewicht (MW) elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore, Schwalbach/Taunus, D) nach dem „Semi-Dry“-Verfahren (229) mit einer Blotapparatur der Firma Biometra (Göttingen, D). Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben Proteine an der Membranoberfläche haften, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt.

Vor dem Transfer wurde die auf Gelgröße zugeschnittene Membran mit Methanol (100 %) aktiviert und kurz in Blotpuffer äquilibriert. Anschließend wurden das SDS-Gel und die PVDF-

Membran zwischen vier mit Blotpuffer benetzte Lagen Whatman-Papier (Fischer Scientific, Schwerte, D) eingebettet. Die Schichtung der einzelnen Lagen auf die Kathode erfolgte luftblasenfrei in folgender Reihenfolge:

2 Lagen Whatman – Papier

SDS – Gel

PVDF – Membran

2 Lagen Whatman – Papier als direkter Abschluss zur Anode

Der Transfer erfolgte für 60 bis 80 min bei 120 mA. Anschließend wurden die gesuchten Proteine immunologisch nachgewiesen.

#### **4.9.3 Immunfärbung und Detektion mittels Chemilumineszenz**

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

Nach erfolgtem Proteintransfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran mit 10 % (w/v) Trockenmagermilchpulver (TMP, Carls Roth, Karlsruhe, D) in TBS-T für 60 min bei RT oder 4 °C über Nacht geblockt.

Anschließend wurde der jeweilige primäre Antikörper in 3 % TMP (w/v) in TBS-T verdünnt und mit der Membran für 60 min bei RT inkubiert. Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in 3 % TMP (w/v) in TBS-T eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug hier ebenfalls 60 min bei RT auf einem Schwenktisch. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss folgte die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung mittels Chemolumineszenz.

Dieses Verfahren basiert auf der Oxidation von Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffsuperoxid 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.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete „Pierce ECL Western Blotting Substrate“ (Pierce, Thermo Scientific, Schwerte, D) wurde den Angaben des Herstellers entsprechend angesetzt. Die mit TBS-T gewaschene Membran wurde bei RT für 1 min schwenkend in Substrat inkubiert und anschließend luftblasenfrei zwischen zwei Klarsicht-Folien eingebettet. Die Belichtung des Röntgenfilms (Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences, Amersham, UK) auf der so eingeschlagenen Membran erfolgte je nach Reaktionsstärke für einige Sekunden bis zu 3 min. Der Film wurde in einer Entwicklungsmaschine (AGFA curix 60, AGFA, Mortsel, B) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

#### 4.9.4 Immunfluoreszenz

Zur Detektion verschiedener Oberflächenantigene mittels Immunfluoreszenz wurden verschiedene Antikörper verwendet (siehe 4.9.1). Die zuvor im Infektionsversuch präparierten Deckgläschen in 24-well-Platten wurden nach Abnahme der FA-Lösung zunächst dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 2 min mit Triton X-100 (0,1 % in 2 % PFA) permeabilisiert, erneut dreimal mit PBS gewaschen und überschüssige Bindungsstellen anschließend mit Blocklösung abgesättigt. Hierfür wurden 50 µl Blocklösung (5 % Ziegenserum in 1 % BSA/PBS, beides Invitrogen, Karlsruhe, D) auf Parafilm in einer feuchten Kammer getropft und das Deckgläschen mit der Zellen tragenden Seite nach unten auf die Lösung gelegt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden 200 µl PBS unter den Rand des Deckgläschens pipettiert, so dass dieses aufschwamm. Dann konnte das Glas mit einer Pinzette aufgenommen werden, ohne dass Scherkräfte die Zellstrukturen auf der Unterseite beschädigen konnten. Durch Tauchen wurde das Gläschen dann einmal mit PBS gewaschen. Für die Visualisierung der Antigene wurde im Anschluss die indirekte Immunfluoreszenzfärbung angewendet. Bei diesem Verfahren bindet ein Primärantikörper an das Protein, der anschließend in einem zweiten Schritt mit einem Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wird. Durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an den primären Antikörper wird dabei eine hohe Sensitivität erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurden die zuvor mit Blocklösung behandelten Deckgläschen nach dem Waschen mit der Zellseite auf einen Tropfen aus 30 µl Antikörperlösung gelegt und in der feuchten Kammer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas wieder mit PBS aufgeschwemmt und dreimal durch Tauchen in Bechergläser mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Primärantikörper vom Präparat zu spülen. Es wurden dann 30 µl der Sekundärantikörper-Lösung auf den Parafilm in der feuchten Kammer aufgetropft, das Deckgläschen erneut mit der Zellseite auf den Tropfen gelegt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach den darauf folgenden drei Waschschrritten in PBS wurde das Präparat zusätzlich in ein Becherglas mit doppelt destilliertem Wasser getaucht, um möglichst alle Salze zu entfernen. Zuletzt wurde ein Tropfen Einbettungsmedium (Prolong Gold antifade with DAPI, Invitrogen, Karlsruhe, D), mit dem zugleich eine Anfärbung von DNA-Strukturen erfolgt, auf einen Objektträger aufgebracht. Das gewaschene Deckgläschen wurde mit der Zellseite auf diesen Tropfen gelegt und 24 bis 48 Stunden bei 4 °C im Dunkeln gelagert, bevor eine Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40 MOT mit Kamera AxioCam MR, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, D) erfolgte.

#### 4.9.5 ELISA

Carbonat/Bicarbonatpuffer, pH 9,0:      0,8 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (= Lsg. A)  
2,92 g NaHCO<sub>3</sub> in 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (= Lsg. B)  
in Lösung B mittels Lösung A pH 9,0 einstellen

Der Nachweis und die Quantifizierung von Protektivem Antigen, Ödemfaktor und Letalfaktor aus bakteriellem Kulturüberstand erfolgte mittels capture-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Bei diesem Verfahren werden jeweils zwei verschiedene Antikörper verwendet, die beide spezifisch an unterschiedliche Stellen des nachzuweisenden Antigens binden. Der erste Antikörper wird als Antigenfänger verwendet und bindet an den Untergrund der 96-well-Mikrotiterplatte. Daran bindet das Antigen, an das wiederum der Detektionsantikörper bindet, über den in den nachfolgenden Schritten der Nachweis des Antigens erfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurden für den Nachweis der Toxine aus Kulturüberständen die unter 4.9.1 aufgelisteten Antikörper für die jeweiligen ELISA verwendet. Alle Waschschritte wurden mit einem ELISA-Washer (96-well Power Washer, Tecan, Männedorf, CH) durchgeführt, anschließend wurde die Platte auf Papiertüchern trockengeschlagen. Die jeweiligen Fängerantikörper wurden in Karbonat/Bicarbonatpuffer auf die entsprechende Gebrauchskonzentration verdünnt und je 100 µl pro well in 96-well-Platten (Maxisorp, Nunc, Langenselbold, D) für 16 bis 20 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit je 300 µl PBS-T (PBS mit 0,05 % Tween-20) pro well gewaschen. Zur Absättigung der freien Bindungsstellen folgte ein Inkubationsschritt, bei dem jeweils 150 µl PBS-T + 10 % Ziegenserum (PAA) pro well zugeben wurde, nach 60 min Inkubation bei 37 °C wurde danach dreimal mit je 300 µl PBS-T gewaschen. Vom zu testenden Kulturüberstand wurden jeweils 100 µl pro well hinzugegeben, wurden verschiedene Verdünnungen untersucht, erfolgte die Verdünnung dabei stets in PBS-T + 10 % Ziegenserum. Zur Quantifizierung der nachzuweisenden Toxine wurde bei jedem Test eine Standardreihe des jeweiligen rekombinanten Proteins in 100 µl PBS-T + 10 % Ziegenserum mitgeführt. Bei PA und LF wurden jeweils acht Stufen von 1 µg/ml bis 0,0025 µg/ml, bei EF fünf Stufen von 1 µg/ml bis 0,025 µg/ml aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde die Platte erneut dreimal mit je 300 µl PBS-T gewaschen, anschließend wurden jeweils 100 µl des Detektionsantikörpers zugegeben. Beim PA-ELISA wurde hierbei der polyklonale Antikörper pc133 aus dem Kaninchen, beim EF-ELISA der polyklonale Antikörper H45-EF aus dem Huhn und beim LF-ELISA der polyklonale Antikörper pc134, ebenfalls aus dem Kaninchen, verwendet. Im Anschluss folgte eine Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper, abgestimmt auf die jeweilige Spezies, der der verwendete Primärantikörper entstammt (siehe Tab. 11, S. 45). Alle Assays wurden danach fünfmal mit je 300 µl PBS-T gewaschen. Als Substrat für die

nachfolgende Auswertung diente OPD (ortho-Phenyldiamin) in Tablettenform (Sigma, Steinheim, D), das in je 20 ml bidestilliertem Wasser pro ELISA-Platte gelöst wurde. Nach Zugabe von 200 µl gelöstem OPD pro well erfolgte die Inkubation für 8 min bei RT, bei der das OPD von der Peroxidase zu einem orange-roten Produkt komplexiert wird. Die enzymatische Reaktion wurde anschließend mit je 50 µl 2,5 M Schwefelsäure abgestoppt. Direkt im Anschluss wurde der Ansatz mittels ELISA-Reader bei einer OD von 492 nm gegen 620 nm gemessen. Anhand der mitgeführten Standardreihe konnte dann die Konzentration an Proteinen im Kulturüberstand bestimmt werden. Alle Versuchsansätze wurden in Vierfachbestimmungen durchgeführt, die mitgeführten Toxin-Standards in Triplikaten. Die ELISA-Standardkurven wurden mittels GraphPad Prism-Software (Version 5.0, GraphPad Software, La Jolla, USA) als sigmoidale Kurven dargestellt. Die analytische Sensitivität der im ZBS 2 des Robert Koch-Instituts validierten capture-ELISA wurde durch das Detektionslimit (*limit of detection*, LOD) bestimmt. Die LOD-Werte setzten sich hierbei aus dem arithmetischen Mittelwert von mindestens sechs Nullwerten plus der dreifachen Standardabweichung zusammen.

## 4.10 Bioinformatik

### 4.10.1 Software und Internet-Datenbanken

Tabelle 14: 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 4.6 Software	Aufnahme und Auswertung Immunfluoreszenzbilder und lichtmikroskopischer Bilder	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, D
Magellan™ Version 6.6 (ELISA Reader Software)	Enzymaktivitäts- Messungen	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Adobe Photoshop CS4	Bildauswertung und -bearbeitung	Adobe Systems GmbH, München
Microsoft Office Excel	Datenauswertung	Microsoft Deutschland GmbH, D
GraphPad Prism 5	Datenauswertung und Kurvenerstellung	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
NCBI („National Center for Biotechnology Information“)	Homologie-Vergleiche, BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Primer Express®	Auswahl Oligonukleotide für PCR	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Quantity One 1-D Analysis Software	Größenbestimmung von DNA- Fragmenten	Bio-Rad, München, D
LaserGene: EditSeq, SeqMan, MapDraw, MegAlign	verschiedene DNA-Analysen	DNA Star Inc.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Mikrobiologische Charakterisierung der untersuchten Stämme

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten afrikanischen Isolate der *B. cereus*-Gruppe wurden mittels verschiedener mikrobiologischer Techniken charakterisiert und mit bekannten Vertretern dieser Gruppe verglichen. Einer eindeutigen Charakterisierung kam dabei besondere Bedeutung zu, da die beiden ursprünglichen Isolate aus Kamerun, *B. cereus* bv *anthracis* CA, und der Elfenbeinküste, *B. cereus* bv *anthracis* CI, sowohl Eigenschaften von verwandten Erregern der RG 2 und 1, als auch der RG 3 aufzeigen. Somit war auch die detaillierte Charakterisierung der Subklone, die nach wiederholter Subkultivierung aufgetreten sind, ein wichtiges Ziel dieser Arbeit.

Arbeiten mit Erregern der biologischen RG 3 sind nur unter hohen Sicherheitsvorkehrungen in dafür speziell ausgerüsteten Laboren zugelassen. Erhöhte Sicherheitsanforderungen, die zum einen das Freisetzen der Erreger innerhalb des Labors verhindern und zum anderen den Handhabenden vor einer Infektion schützen sollen, machen das Arbeiten innerhalb eines solchen Labors sehr kompliziert. So ist sowohl der Zeit- als auch Materialaufwand deutlich erhöht, da ein sicheres Arbeiten absolute Priorität hat. Viele Methoden, die Standardverfahren in einem Labor der RG 2 darstellen, sollten hier nicht angewendet werden, wie beispielsweise alle Arbeiten, die Aerosolbildung verursachen oder bei denen ein Wasserbad zum Einsatz kommt. Auch Fixierungsmethoden, wie sie zum Beispiel für Objektträgerpräparate angewendet werden, müssen zusätzlich um Inaktivierungsschritte erweitert werden, bei denen auch das Abtöten der hochresistenten *B. anthracis*-Sporen gewährleistet ist. Bevor letztendlich Material aus dem Sicherheitslabor herausgebracht werden kann, sind langwierige Sterilkontrollverfahren notwendig. Für die Sterilkontrollen werden Teile des auszuschleusenden Materials wie Kulturüberstände, Nukleinsäurepräparationen oder inaktiviertes Zellmaterial in Nährmedien gegeben, wodurch das getestete Material anschließend für nachfolgende Versuche nicht mehr verwendbar ist. Zu den durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen gehörten der Vergleich des Wachstums auf verschiedenen nicht-selektiven und selektiven Nährmedien, die Beurteilung der Motilität der Bakterien, das Verhalten nach Infektion mit dem diagnostischen  $\gamma$ -Phagen und das Erscheinungsbild nach unterschiedlichen Anfärbemethoden. Alle Untersuchungen wurden parallel ebenfalls mit bekannten *B. cereus*- und *B. anthracis*-Stämmen durchgeführt, um einen direkten Vergleich unter identischen Kulturbedingungen anstellen zu können. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse hierzu ist in Tabelle 15 dargestellt.



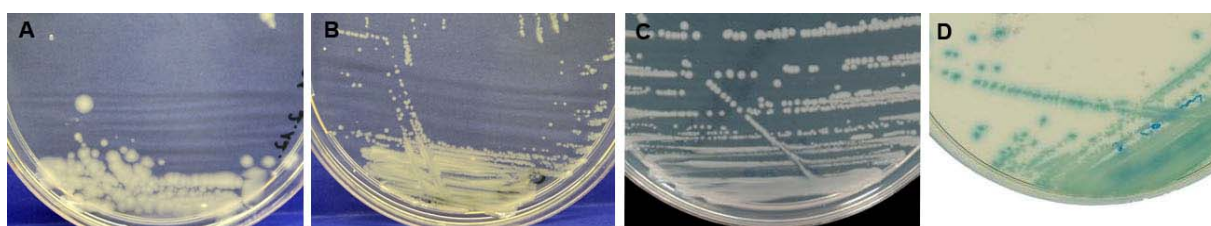
**Tabelle 15: Mikrobiologische Eigenschaften von *B. cereus* bv *anthracis***

Zusammenfassung der untersuchten mikrobiologischen Eigenschaften von *B. cereus* bv *anthracis* CI, CA, CI-1, CI-12, CI-18 und CA-5, sowie typischen Vertretern von *B. anthracis* und *B. cereus*

	CI	CA	CI-1	CI-12	CI-18	CA-5	<i>B.anthraxis</i>	<i>B.cereus</i>
β-Hämolyse	-	-	+	+	-	-	-	+
Phospholipase C-Aktivität	-	-	-	-	-	-	-	+
Lecithinase-Aktivität	+	+	+	+	+	+	+	++
Motilität	+	+	+	+	+	+	-	+
γ-Phage Sensitivität	-	-	-	-	-	-	+	-

Wie bereits zuvor teilweise beschrieben (126,128), weisen die untersuchten afrikanischen Isolate und deren Subklone mikrobiologische Eigenschaften auf, die sie sowohl als Vertreter von *B. cereus* als auch *B. anthracis* einstufen würden. Die Auswahl der untersuchten Subklone stellt hierbei die Diversität der verschiedenen Isolate dar. In die Untersuchungen wurden so Vertreter ohne pXO2-Plasmid (CI-12 und CI-18) oder mit hämolytischem Phänotyp (CI-1 und CI-12) eingeschlossen.

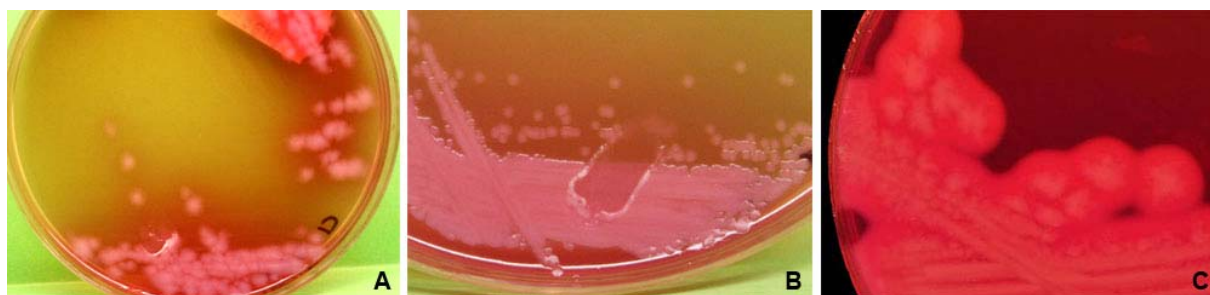
Die zum Vergleich ebenfalls untersuchten Stämme *B. anthracis* UDIII-7 und *B. anthracis* Vollum zeigen wie die Primärisolate CI und CA und ihre Subklone keine Phospholipase C-Aktivität auf chromogenem Selektivagar, während bei Stämmen von *B. cereus* und *B. thuringiensis* eine deutliche Blaufärbung der Kolonien zu beobachten ist (siehe Abb. 8).



**Abbildung 8: Phospholipase C-Nachweis**

Nachweis der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C-Aktivität von *B. cereus* bv *anthracis* CI (A) und CA (B), *B. anthracis* (C) und *B. cereus* (D) auf chromogenem Cereus Ident-Agar

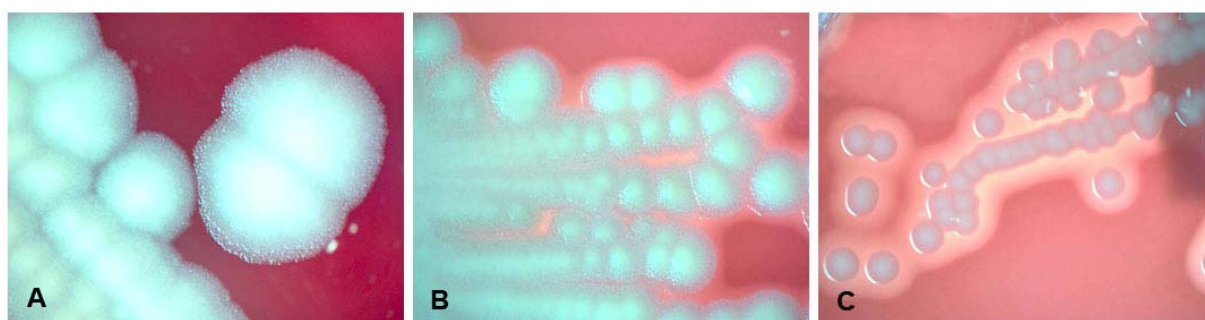
Ebenso charakteristisch ist eine nur schwache Lecithinase-Aktivität und Präzipitatbildung nur unter der Kolonie auf Cereus Selektiv-Agar, die vergleichbar zu *B. anthracis* ist (siehe Abb. 9). Bei *B. cereus* ist das Präzipitat deutlich stärker ausgeprägt und bildet einen Hof um die Kolonien. Aufgrund der fehlenden Mannit-Fermentation sind die Kolonien bei allen Stämmen rot gefärbt.



**Abbildung 9: Lecithinase-Nachweis**

Nachweis der Lecithinase-Aktivität von *B. cereus* bv *anthracis* CI (A), CI-12 (B) und *B. cereus* (C) auf Mannitol-Eigelb-Polymyxin (= Cereus Selektiv) Agar

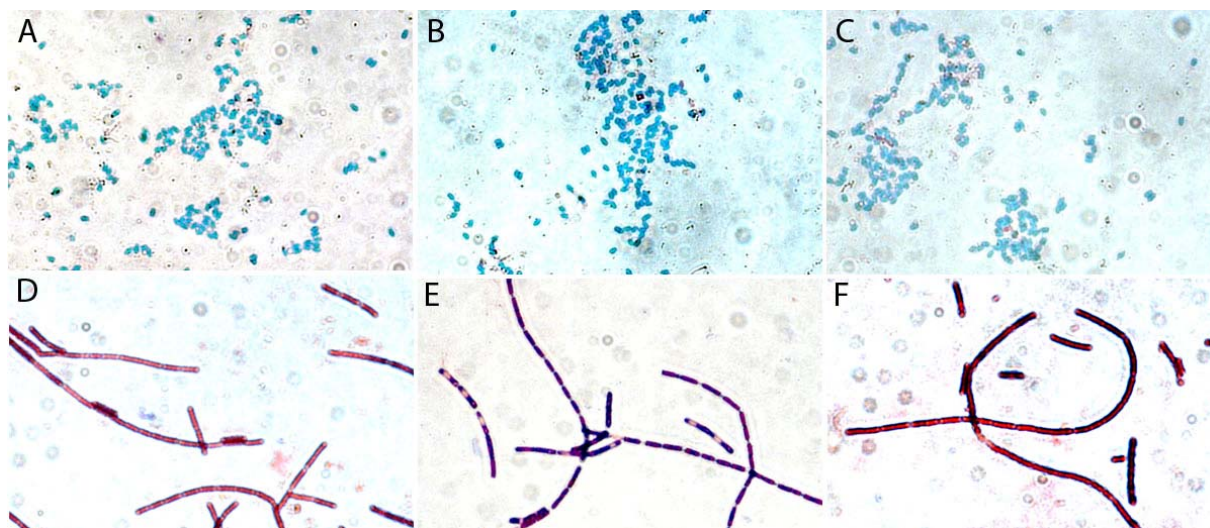
Im Gegensatz dazu weisen die afrikanischen Isolate aber auch Merkmale auf, die sie mit den ebenfalls untersuchten Stämmen *B. cereus* ATCC 14579, *B. cereus* ATCC 10987 und *B. thuringiensis* sv konkukian gemein haben, und die sie deutlich von klassischen Vertretern von *B. anthracis* abgrenzen. So sind die *Bacillus*-Primärisolate gegen den diagnostischen  $\gamma$ -Phagen resistent und zeigen im hängenden Tropfen im Gegensatz zu *B. anthracis* deutliche Beweglichkeit (128). In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl die Resistenz gegen den *B. anthracis*-spezifischen  $\gamma$ -Phagen als auch die Beweglichkeit der vegetativen Zellen zusätzlich für die Subklone CI-1, CI-12, CI-18 und CA-5 gezeigt werden. Bis auf die überraschenderweise auftretende  $\beta$ -Hämolyse bei den Subklonen des Isolates von der Elfenbeinküste, CI-1 und CI-12, zeigen die afrikanischen *Bacillus*-Isolate analog zu *B. anthracis* keine  $\beta$ -Hämolyse bei Wachstum auf Columbia-Blutagar (siehe Abb. 10). Die meisten *B. cereus*- und *B. thuringiensis*-Vertreter wachsen dagegen auf Blutagar mit stark ausgeprägter  $\beta$ -Hämolyse.



**Abbildung 10:  $\beta$ -Hämolyse**

Wachstum von *B. cereus* bv *anthracis* CI (A), CI-1 (B) und CI-12 (C) auf Columbia-Blutagar nach 16 – 20 Stunden Inkubation bei 37°C

Gram-Färbungen der einzelnen Isolate zeigen in allen Fällen gram-positive Stäbchen, die lange Ketten bilden, die mikroskopischen Untersuchungen lassen hierbei keine Unterscheidung der neuen *Bacillus*-Isolate von *B. anthracis* zu. Endosporenbildung wurde mittels Rakette-Färbung gezeigt (siehe Abb. 11), auffällig war hierbei, dass Subklon CI-12 nicht in der Lage ist, Sporen zu bilden.



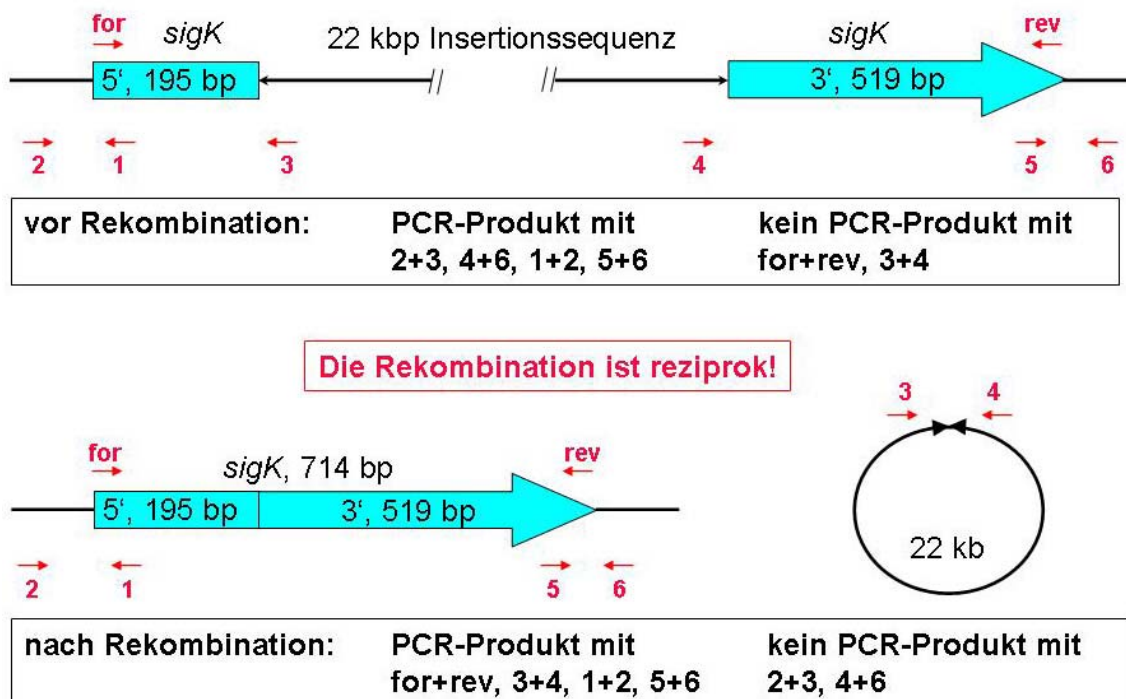
**Abbildung 11: Raketten- und Gramfärbung**

Sporenfärbung nach Raketten (A – C) und Gram-Färbung (D – F) von *B. cereus* bv *anthracis* CI (A, D), CA (B, E) und *B. anthracis* UDIII-7 (C, F). Erkennbar sind helle Endosporen innerhalb der Mutterzelle bei *B. cereus* bv *anthracis* CA (E)

## 5.2 Untersuchung der Sporulation und Insertion im Sporulationsgen *sigK*

Die Regulation der Sporulation bei *Bacillus* ist äußerst komplex und findet auf mehreren Ebenen statt. Einer der beteiligten Faktoren, Sigma K, wird in der späten Phase der Sporulation von der Mutterzelle gebildet. Das kodierende Gen *sigK* ist bei *B. subtilis* durch ein Prophagen-ähnliches Element unterbrochen, das während des Sporulationsvorgangs spezifisch ausgeschnitten wird, so dass beide *sigK*-Fragmente zusammengefügt und das Gen exprimiert wird (225), was letztlich zur Ausbildung einer intakten Spore innerhalb der Mutterzelle führt. Das Chromosom der Mutterzelle und das aus ihm ausgeschnittene DNA-Fragment gehen nach vollendetem Prozess verloren, da nur das Chromosom in der Spore weitergegeben wird und die Mutterzelle abstirbt (137,225). *B. cereus* bv *anthracis* CI besitzt eine 22 kbp große Insertion im *sigK*-Gen, die keine Homologie zur Insertion in *B. subtilis* aufweist und deren Funktion noch unbekannt ist (126). Es ist davon auszugehen, dass diese Insertion ebenfalls aus dem *sigK*-Gen ausgeschnitten wird und beide Fragmente zusammengefügt werden (siehe Abb. 12), da sowohl das Primärisolat als auch die Subklone CI-1, CI-18 und CA-5 in der Lage sind, zu sporulieren. Ein weiterer Hinweis hierauf ist das Vorhandensein eines Gens für eine Rekombinase innerhalb der Insertion bei *B. cereus* bv *anthracis* CI, die 53 % homolog ist zur Rekombinase in der Insertion von *B. subtilis* (126,207). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels PCR das Vorhandensein eines intakten *sigK*-Gens während der Sporulation in Medium G überprüft. Durch das Einsetzen verschiedener Primerkombinationen, die Abbildung 12 entnommen werden können (siehe

auch Tab. 6, S. 31-32), konnten hierbei die beiden *sigK*-Fragmente, die Insertionssequenz und die das *sigK*-Gen flankierenden Bereiche untersucht werden.



**Abbildung 12: Insertion im *sigK*-Gen**

Primerkombinationen und zu erwartende PCR-Ergebnisse bei Amplifikation des *sigK*-Gens vor und nach dem Rekombinationsereignis bei Sporulation von *B. cereus* bv *anthracis*. Rote Pfeile zeigen die Lokalisation und Orientierung der einzelnen Primer an.

Die PCR-Analysen ergaben, dass bei allen getesteten afrikanischen Isolaten ein Ausschneiden der Insertionssequenz im *sigK*-Gen in der stationären Wachstumsphase stattfindet, was die Bildung intakter Endosporen zur Folge hat. Einzig Subklon *B. cereus* bv *anthracis* CI-12 bildet hier eine Ausnahme. Auch nach bis zu einer Woche Inkubation in Medium G konnte kein intaktes *sigK*-Gen nachgewiesen werden. Stattdessen waren lediglich die flankierenden Bereiche außerhalb der 22 kbp-Insertionssequenz amplifizierbar. Sporenfärbungen nach Rakette bestätigten das Fehlen von Sporen in der Kultur, ebenso Hitzeinaktivierungsversuche, bei denen keinerlei KBE nach Behandlung von 65 °C für 30 min nachweisbar waren. Sporen würden eine solche Temperatur überleben und anschließend auf Agar ausgekeimen, während vegetative Zellen bei 65 °C absterben.

## 5.3 Untersuchung der Genexpression und Genregulation

### 5.3.1 Auswahl der Zielgene

Um vergleichende Untersuchungen zur Genregulation der afrikanischen Isolate und bekannter Vertreter der *B. cereus*-Gruppe durchführen zu können, mussten zunächst Zielgene ausgewählt werden, die Tabelle 6 (S. 31-32) zu entnehmen sind. Von besonderer Bedeutung waren hierbei vor allem die bei *B. anthracis* durch Natriumbikarbonat und CO<sub>2</sub>

regulierten Toxin- und Kapselgene, die auf den beiden Virulenzplasmiden pXO1 und pXO2 kodiert sind. Die Expression dieser Gene ist bei Vorhandensein von CO<sub>2</sub> und Natriumbikarbonat im Kulturmedium erhöht, da diese Bedingungen das Wirtsmilieu bei einer Infektion mit *B. anthracis* simulieren (68,133,217). Die Stämme *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA besitzen ebenso wie ihre Subklone beide, bzw. ein Virulenzplasmid und bilden die jeweiligen Toxine und die für *B. anthracis* spezifische Poly-D-Glutaminsäurekapsel (außer CI-18 und CA-5). Aus diesem Grund war es in der vorliegenden Arbeit von Interesse herauszufinden, ob die Regulationsmechanismen der afrikanischen Isolate mit denen klassischer Vertreter von *B. anthracis* vergleichbar sind. Es wurden als Zielgene für die Expressionsanalysen nicht nur *pagA* (Protektives Antigen), *lef* (Letalfaktor), *cya* (Ödemfaktor) und *capB* (Kapsel) ausgewählt, sondern auch ihre bekannten Regulatorgene *acpA* (kodiert auf pXO2) und *atxA* (kodiert auf pXO1). Da die untersuchten Stämme auch eine enge Verwandtschaft zu untypisch virulenten Vertretern von *B. cereus* und *B. thuringiensis* aufweisen (126), wurden zusätzlich Gene ausgewählt, deren Expression durch den pleiotropen, bei *B. cereus* und *B. thuringiensis* aktiven Regulator PlcR beeinflusst wird. Da die afrikanischen *Bacillus*-Isolate eine Mutation im Gen *plcR* besitzen, sollte gezeigt werden, ob die *plcR*-regulierten Gene *pclA*, *sfp*, *cerA* und *aloA* (Gene, deren Expression zu Hämolyse führt) exprimiert werden oder durch die Mutation einer Beeinflussung unterlegen sind, wie es auch bei *B. anthracis* der Fall ist.

### 5.3.2 Kulturbedingungen und Zellzahlbestimmung

Alle zu untersuchenden Stämme wurden unter zwei unterschiedlichen Bedingungen angezogen und die RNA für nachfolgende Genexpressionsanalysen isoliert. Hierfür wurde als Zeitpunkt zur mRNA-Extraktion der Übergang von später exponentieller in beginnende stationäre Wachstumsphase ausgewählt, da zu diesem Zeitpunkt die Expression der ausgewählten Zielgene am höchsten ist (14,200,217). Da unter anderem auch Gene untersucht wurden, von denen eine Abhängigkeit der Regulation vom Vorhandensein von Natriumbikarbonat und CO<sub>2</sub> bekannt ist, wurden zwei unterschiedliche Wachstumsbedingungen gewählt. Alle zu testenden Stämme wurden sowohl in LB-Flüssigmedium kombiniert mit atmosphärischem Sauerstoffgehalt (im Folgenden als „nicht-induzierend“ bezeichnet) und in Rich-Medium mit Natriumbikarbonat kombiniert mit 5 % CO<sub>2</sub> (im Folgenden als „induzierend“ bezeichnet) angezogen. In Vorversuchen wurden Wachstumskurven der verschiedenen Stämme in unterschiedlichen Anzuchtmedien erstellt. Aufgrund der Ergebnisse wurde anschließend eine Wachstumsdauer von 4,5 Stunden ausgewählt, vom Zeitpunkt des Überimpfens aus der Vorkultur in die Untersuchungskultur. Nach dieser Inkubationszeit lag die Lebendzellzahl pro ml konstant bei ca. 10<sup>8</sup> Bakterien. Einzig Subklon *B. cereus* bv *anthracis* CI-12 wuchs deutlich schlechter in Rich-Medium, die Lebendzellzahl der Bakterien lag hier durchschnittlich bei 10<sup>6</sup> pro ml. Die Auswahl des

Zeitpunktes der Entnahme der Bakterienkultur für die Extraktion von RNA war dabei von entscheidender Wichtigkeit, da zum einen der mRNA-Gehalt in der Zelle maximal sein sollte, zum anderen die Kultur noch nicht zu weit gewachsen sein durfte, um das Ausbilden von Sporen zu verhindern. Aus diesem Grund wurde vor jeder Entnahme von bakteriellem Material eine Kontrollfärbung nach Raketten durchgeführt, um das Vorhandensein von Sporen in der Präparation auszuschließen. Zum Zeitpunkt der Bakterienentnahme für die Extraktion von RNA nach 4,5 Stunden Wachstum wurde außerdem die optische Dichte (OD) der Kultur photometrisch bestimmt und die Lebendzellzahl ermittelt. Die Ergebnisse der Messungen der OD der Kulturen und die dazugehörigen Lebendzellzahlen der Bakterien können dem Anhang (Tab. 22, S. 132-133) entnommen werden.

### 5.3.3 RNA-Extraktion

Für vergleichende Untersuchungen der Expression ausgewählter Regulator- und Toxingene wurde von allen Stämmen RNA isoliert, die die Grundlage für die nachfolgende Reverse Transkriptase (RT)-PCR bildete. Die dafür benötigte mRNA kann bei Eukaryoten mit kommerziellen Kits selektiv nach einfachen Protokollen über spezielle Bindungssäulen isoliert werden, bei Prokaryoten ist dies 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 dann die mRNA, die nur etwa 5 % des gesamten RNA-Gehaltes der Zelle ausmacht, isoliert gewonnen werden. Prokaryoten fehlt dieser Poly-A-Schwanz, weshalb lediglich ein mRNA-Aufreinigungskit kommerziell verfügbar ist (siehe 6.3). 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 (101). Alle diese Faktoren führen dazu, dass eine effektive mRNA-Extraktion sehr schwierig ist. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombination aus denaturierendem Lysepuffer, Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung und Aufreinigung der gesamt-RNA über kommerzielle Bindungssäulen verwendet. Primäres Ziel beim Optimieren eines geeigneten Protokolls war dabei die gefahrlose Anwendung in einem Labor der Sicherheitsstufe 3. Aus diesem Grund schied auch die in vielen Protokollen verwendete mechanische Aufspaltung der Bakterien durch Keramik- oder Stahlkügelchen aufgrund der entstehenden Aerosolbildung generell für die RNA-Extraktion aus. Um eine möglichst reine RNA-Präparation hoher Konzentration zu erhalten, wurde die Behandlung der zuvor mit SDS-haltigem Lysepuffer aufgespaltenen Bacilli mit Phenol-Chloroform gewählt. Die bei der

Extraktion freigesetzten Proteine sammeln sich dabei nach anschließendem Zentrifugationsschritt in der unteren, organischen Phase des Chloroforms, während die Nukleinsäuren mit der wässrigen oberen Phase abgenommen werden können. Gleichzeitig erfolgt bei Zugabe von Phenol-Chloroform auch eine schnelle Inaktivierung der bei der Zellyse freigesetzten RNasen. Eine spezifische Fällung der RNA erfolgte im Anschluss durch Zugabe von reinem Ethanol, die endgültige Reinigung der RNA über kommerzielle RNA-Bindungssäulen mit nachfolgenden Waschschritten. Im Anschluss an die Extraktion wurde die Konzentration der RNA und deren Reinheitsgrad photometrisch bestimmt. Eine Verunreinigung der RNA-Präparation durch Proteine oder Reste von Chloroform sollte damit ausgeschlossen werden. Insgesamt wurden drei voneinander unabhängige Versuche von Bakterienanzucht und anschließender RNA-Extraktion durchgeführt. Die Ergebnisse der photometrischen Messungen können dem Anhang (Tab. 23, S. 134) entnommen werden.

### 5.3.4 Qualitativer Expressionsnachweis

Komplementäre DNA wurde aus RNA hergestellt, die zuvor mit DNase I behandelt wurde. DNase I spaltet dabei Einzel- und Doppelstrang-DNA in Oligodinukleotide. Dies war notwendig, da die cDNA als Template für die nachfolgende PCR für den Expressionsnachweis eingesetzt wurde. Geringste Mengen an verbliebener DNA in der Präparation hätten dabei zu falsch positiven Transkriptionsnachweisen führen können. Um das Vorhandensein von DNA-Resten nach der DNase-Behandlung ausschließen zu können, wurde nach jeder neuen RNA-Präparation eine Kontroll-PCR mit RNA für den Nachweis des Hauhaltsgens *rpoB* durchgeführt. Nur wenn sich im anschließenden Agarosegel kein Amplifikationsprodukt nachweisen ließ, wurde die RNA für den nachfolgenden cDNA-Syntheseschritt verwendet. Tabelle 16 zeigt eine Zusammenfassung der jeweiligen PCR-Ergebnisse, die durch Einsetzen der erhaltenen cDNA in die Amplifikationsreaktion gewonnen wurden. Es erfolgte hierbei eine Unterscheidung der Ergebnisse in negative (mit einem „-“ beschrieben) und positive (mit einem „+“ beschrieben) Amplifikationsreaktionen. Fiel ein Signal besonders stark aus, wurde dies extra gekennzeichnet (mit einem „++“ beschrieben). Grenzwertige Ergebnisse mit einer nur sehr schwachen Bande im Agarosegel und einer nicht eindeutigen Reproduktivität wurden ebenfalls berücksichtigt (mit einem „(+“ bezeichnet). Es fällt auf, dass anhand des Nachweises mittels PCR und Agarosegel kein Unterschied der Expression von *cya* zwischen der Anzucht unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen zu erkennen ist. Die Bandenintensität der PCR-Produkte auf dem Gel war auch nach zwei Wiederholungsansätzen stets als gleich einzustufen. Ebenfalls bemerkenswert ist der fehlende Nachweis von *cerA* bei den Primärisolaten CI und CA, sowie Subklon CI-18. Analog zu *B. anthracis* konnte hier kein Signal nach Amplifikation detektiert werden. Im Gegensatz dazu war ein schwaches PCR-Produkt des Gens bei den Subklonen CI-1, CI-12 und CA-5 nachweisbar.

**Tabelle 16: Ergebnisse der RT-PCR**

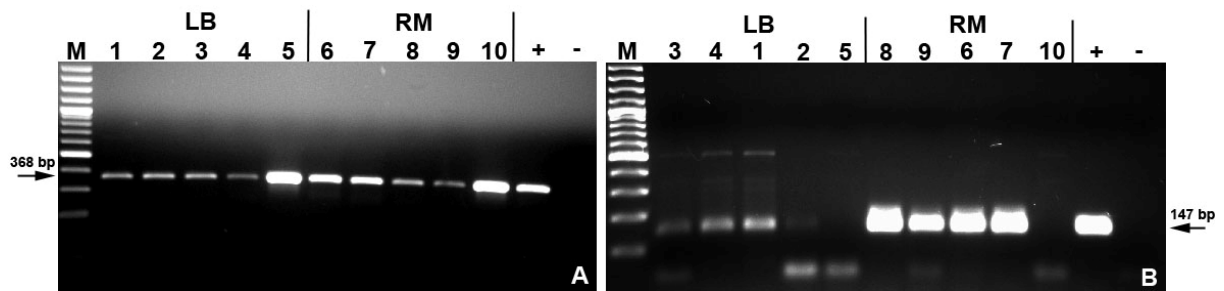
Zusammenfassung der RT-PCR-Ergebnisse zum Nachweis der Expression der aufgeführten Zielgene mittels Agarose-Gelelektrophorese.

	CI		CA		CI-1		CI-12		CI-18		CA-5		<i>B. anthracis</i>		<i>B. cereus / B. thuring.</i>	
	LB	RM	LB	RM	LB	RM	LB	RM	LB	RM	LB	RM	LB	RM	LB	RM
<i>rpoB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>gyrB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>pagA</i> <sub>1</sub>	(+)	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	--	--
<i>lef</i> <sub>1</sub>	(+)	+	+	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	--	--
<i>cya</i> <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--
<i>atxA</i> <sub>1</sub>	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	+	+	+	+	--	--
<i>capB</i> <sub>2</sub>	+	++	(+)	++	(+)	+	(+)	+	--	--	--	--	(+)	++	--	--
<i>acpA</i> <sub>2</sub>	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	--	--	--	--	+	+	--	--
<i>plcR</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>hlyII</i>	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	+	+	+	+
<i>plcA</i>	(+)	--	(+)	--	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	--	--	++	++
<i>cerA</i>	--	--	--	--	(+)	(+)	(+)	(+)	--	--	(+)	(+)	--	--	+	+
<i>sfp</i>	(+)	--	(+)	--	(+)	(+)	+	+	--	--	(+)	(+)	(+)	--	+	+
<i>aloA</i>	+	+	+	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)	+	+	(+)	+	+	++	++

*B. cereus* = *B. cereus* DMS 31 und ATCC10987, *B. anthracis* = *B. anthracis* UDIII-7 und Vollum, *B. thuring.* = *B. thuringiensis* sv konkukian. LB = Anzucht unter nicht-induzierenden Bedingungen, RM = Anzucht unter induzierenden Bedingungen. <sup>1</sup> kodiert auf pXO1, <sup>2</sup> kodiert auf pXO2. Die Funktionen der einzelnen Zielgene können Tabelle 6 (S. 31-32) entnommen werden

Abbildung 13 zeigt exemplarisch für alle PCR-Ergebnisse die Agarosegele zweier verschiedener Zielgene, *aloA* und *capB*, mit unterschiedlich starken Signalen von PCR-Produkten.





**Abbildung 13: Expressionsnachweis von *aloA* und *capB***

Amplifikationsprodukte von *aloA* (A) und *capB* (B) nach RT-PCR und anschließender Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel (1,5%).

*B. cereus* bv *anthracis* CI (1, 6), CA (2, 7), *B. anthracis* UDIII-7 (3, 8), Vollum (4, 9), *B. thuringiensis* sv konkukian (5, 10), + Positivkontrolle mit DNA, - Negativkontrolle ohne DNA

LB = Anzucht unter nicht-induzierenden Bedingungen, RM = Anzucht unter induzierenden Bedingungen.

### 5.3.5 Quantitativer Expressionsnachweis mittels Real-Time PCR

Zusätzlich zu den qualitativen Untersuchungen der Expression der verschiedenen Zielgene wurden auch einige Assays für den quantitativen Nachweis mittels Real-Time PCR entwickelt. Hierfür mussten anhand der Sequenzen der Zielgene Primer und geeignete Sonden entworfen werden. Zur Auswertung und Auswahl der Sequenzabschnitte, die die Grundlage für das Oligonukleotid-Design bildeten, wurde das Programm Primer Express® (Software Version 2.0) der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, D) verwendet. Es war nicht möglich, für alle ausgewählten Gene passende Real-Time-Assays zu entwickeln, da die für Sonden und Primer notwendigen Kriterien von geeigneter Lage in der Nukleotidsequenz des Gens und Schmelztemperatur nicht für alle zu untersuchenden Stämme kompatibel waren. Da aber nur jeweils ein für alle zu testenden Stämme geeigneter Assay pro Zielgen verwendet werden sollte, um einen Vergleich der Expression anstellen zu können, wurde in manchen Fällen auf die quantitative Analyse verzichtet. Für die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Assays für die Real-Time PCR wurden außerdem Plasmidstandards hergestellt, die bei jedem Lauf mitgeführt wurden. Auf ihrer Basis wurde bei jeder Reaktion eine Standardkurve erstellt und somit eine quantitative Zuordnung der Signalstärke der Amplifikationsprodukte ermöglicht. Damit konnte die Kopienzahl des jeweiligen Zielgens im Reaktionsansatz ermittelt werden. Außerdem wurde die Standardkurve für die Ermittlung der Effizienz des PCR-Laufs herangezogen. Ausgewertet wurden nur Läufe, deren Amplifikationseffizienz bei mindestens 95 % lag (siehe 6.3.2). Tabelle 17 zeigt die Zusammenfassung der absoluten Quantifizierung der Expression der untersuchten Zielgene von zwei untersuchten Vertretern von *B. anthracis* und den afrikanischen Primärisolaten. Anhand der ermittelten Kopienzahlen pro Reaktionsansatz des jeweiligen Gens wurde die Expressionssteigerung ermittelt. Der Quotient aus der Kopienzahl des Zielgens im Reaktionsansatz nach Anzucht unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen gibt hierbei die Steigerung der Expression an.

**Tabelle 17: Ergebnisse der quantitativen Real-Time RT-PCR**

Expressionsuntersuchungen der Zielgene mittels quantitativer Real-Time RT-PCR. Angaben in Kopienzahl pro Reaktionsansatz, ermittelt per Standardkurve

LB = Anzucht unter nicht-induzierenden Bedingungen, RM = Anzucht unter induzierenden Bedingungen

	<i>B. anthracis</i> UDIII-7	<i>B. anthracis</i> Vollum	<i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> CI	<i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> CA
<i>gyrB</i> LB	2,1 x 10 <sup>4</sup>	2,8 x 10 <sup>4</sup>	3,3 x 10 <sup>4</sup>	2,3 x 10 <sup>4</sup>
<i>gyrB</i> RM	3,9 x 10 <sup>4</sup>	5,2 x 10 <sup>4</sup>	6,7 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>
<b>Expressions- steigerung <i>gyrB</i></b>	<b>1,9-fach</b>	<b>1,9-fach</b>	<b>2,0-fach</b>	<b>5,2-fach</b>
<i>rpoB</i> LB	3,4 x 10 <sup>4</sup>	5,5 x 10 <sup>4</sup>	2,7 x 10 <sup>5</sup>	8,1 x 10 <sup>4</sup>
<i>rpoB</i> RM	1,0 x 10 <sup>5</sup>	5,9 x 10 <sup>4</sup>	7,6 x 10 <sup>4</sup>	6,4 x 10 <sup>4</sup>
<b>Expressions- steigerung <i>rpoB</i></b>	<b>2,9-fach</b>	<b>1,1-fach</b>	<b>0,3-fach</b>	<b>0,8-fach</b>
<i>capB</i> LB	4,8 x 10 <sup>3</sup>	2,4 x 10 <sup>4</sup>	3,5 x 10 <sup>3</sup>	7,2 x 10 <sup>3</sup>
<i>capB</i> RM	5,7 x 10 <sup>5</sup>	8,7 x 10 <sup>5</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup>	1,6 x 10 <sup>6</sup>
<b>Expressions- steigerung <i>capB</i></b>	<b>118,8-fach</b>	<b>36,3-fach</b>	<b>65,7-fach</b>	<b>222-fach</b>
<i>acpA</i> LB	2,0 x 10 <sup>3</sup>	7,5 x 10 <sup>3</sup>	9,5 x 10 <sup>2</sup>	2,1 x 10 <sup>3</sup>
<i>acpA</i> RM	3,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	2,8 x 10 <sup>4</sup>	4,8 x 10 <sup>4</sup>
<b>Expressions- steigerung <i>acpA</i></b>	<b>15,0-fach</b>	<b>13,3-fach</b>	<b>29,5-fach</b>	<b>22,9-fach</b>
<i>pagA</i> LB	6,0 x 10 <sup>4</sup>	7,2 x 10 <sup>4</sup>	3,7 x 10 <sup>4</sup>	4,7 x 10 <sup>4</sup>
<i>pagA</i> RM	1,2 x 10 <sup>6</sup>	6,0 x 10 <sup>5</sup>	3,4 x 10 <sup>5</sup>	8,2 x 10 <sup>5</sup>
<b>Expressions- steigerung <i>pagA</i></b>	<b>20,0-fach</b>	<b>8,3-fach</b>	<b>9,2-fach</b>	<b>17,4-fach</b>

Beispiel

$$B. anthracis \text{ UDIII-7 } gyrB \quad \frac{3,9 \times 10^4 \text{ Kopien/Ansatz}}{2,1 \times 10^4 \text{ Kopien/Ansatz}} = 1,9$$

Das rechnerische Ergebnis von 1,9 bedeutet in diesem Fall eine 1,9-fache Steigerung der Expression des Gens *gyrB* unter induzierenden Bedingungen. Ein rechnerischer Wert von 1 ergäbe also eine vergleichbare Expression des Zielgens unter beiden Anzuchtbedingungen. Ein Wert von < 1 bedeutet dagegen, dass die Expression des Gens unter nicht-induzierenden Bedingungen höher ist. Bei Betrachtung der Ergebnisse in Tabelle 17 fällt die deutliche Steigerung der Expression von *capB* bei allen vier untersuchten Stämmen unter

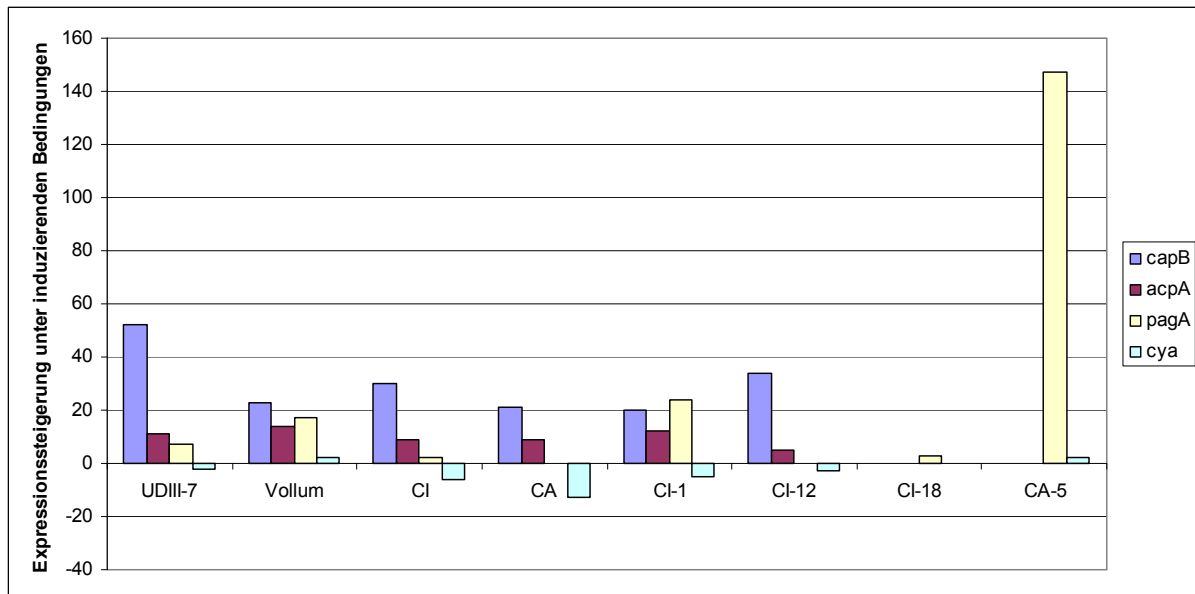
induzierenden Bedingungen auf. Auch die Gene *acpA* und *pagA* sind in Gegenwart von CO<sub>2</sub> und Natriumbikarbonat stärker exprimiert. Allerdings zeigen die oben dargestellten Expressionssteigerungen der Haushaltsgene *rpoB* und *gyrB* die Grenzen der absoluten Quantifizierung auf. Die Expressionsraten würden bei diesen beiden Kontrollgenen auf eine Induktion abhängig von den Anzuchtbedingungen hinweisen. Da es sich bei *rpoB* und *gyrB* aber um nicht-regulierte Gene handelt, sind die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung der Expression als problematisch einzuschätzen. So kann beispielsweise der unterschiedliche RNA-Gehalt nach Extraktion oder eine möglicherweise gehemmte RT-Reaktion Einfluss auf die in die Real-Time PCR eingesetzte cDNA-Menge haben. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zur absoluten Quantifizierung der Expression mittels Standardkurve auch die relative Quantifizierung der mRNA ohne Standards durchgeführt.

### 5.3.6 Relative Quantifizierung der Genexpression

Bei der relativen Quantifizierung der Genexpression durch Normierung gegen ein Haushaltsgen nach Pfaffl (180) spielt die in der Reaktion vorhandene absolute Kopiezahl eines Gens keine Rolle. Stattdessen 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  $\beta$ -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase). Bei diesem Analyseverfahren wird eine Expressionsrate ermittelt, die zum Vergleich von beispielweise verschiedenen Wachstumsbedingungen 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 sog.  $\Delta\Delta Ct$ -Methode (siehe 4.7.6) 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. Kalibratorprobenmaterial bezogen. Im vorliegenden Fall handelt es sich dabei um die RNA-Präparation des Versuchsansatzes, der unter nicht-induzierenden Bedingungen durchgeführt wurde, wenn ein Gen mit induzierbarer Expression untersucht wurde. Dies betraf die Gene *capB*, *acpA*, *pagA* und *cya*. Wurden dagegen die Gene *sfp* und *plcA* untersucht, deren Expression bei *B. cereus* und *B. thuringiensis* durch ein intaktes PlcR aktiviert ist, wurde als Vergleichsmaterial die RNA-Präparation des Ansatzes gewählt, in dem eine maximale Expression des jeweiligen Zielgens vorlag. Da die Expression von *sfp* und *plcA* durch das fehlende bzw. inaktive PlcR bei *B. anthracis* und *B. cereus* bv *anthracis* nicht aktiviert ist, sollte so der Unterschied zwischen aktivierter und ruhender Expression aufgezeigt werden. Nach Vorversuchen konnte hierfür die Anzucht von *B. thuringiensis* sv konkukian in LB-

Flüssigmedium kombiniert mit atmosphärischem Sauerstoff als Kontrollmaterial bestimmt werden.

Abbildung 14 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Expression der durch Natriumbikarbonat und CO<sub>2</sub> induzierten Zielgene. Dargestellt ist jeweils der Median aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Kulturanzuchten der untersuchten Stämme mit nachfolgenden Real-Time RT-PCRs, die ihrerseits ebenfalls jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

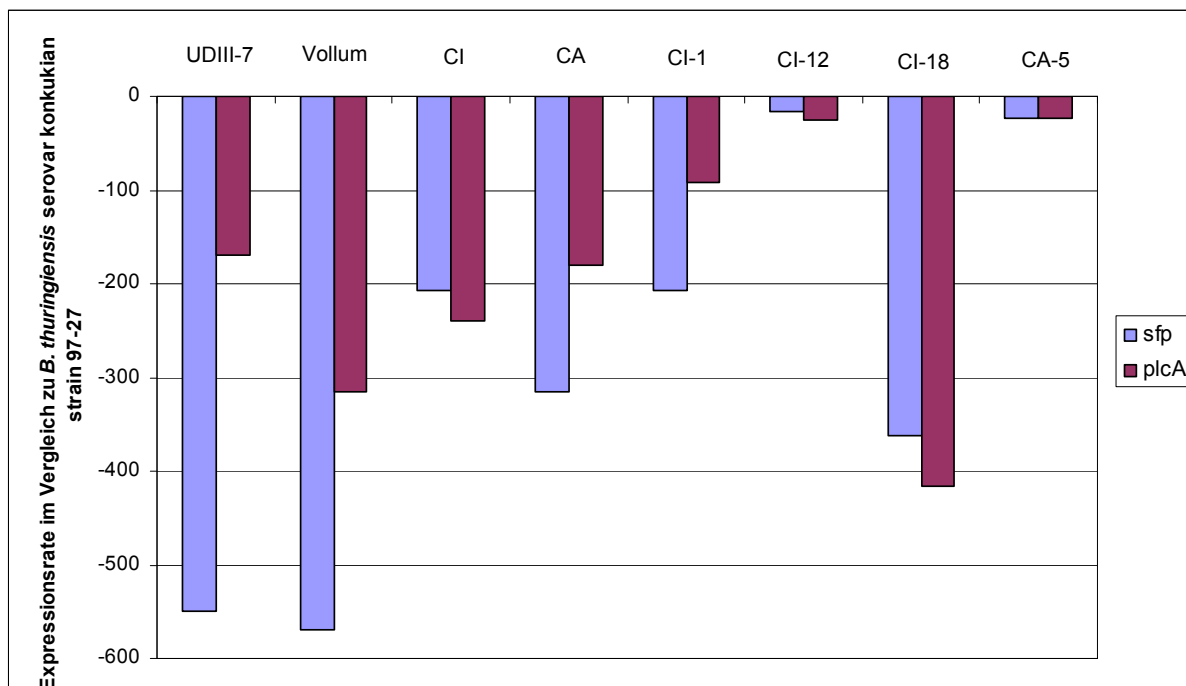


**Abbildung 14: Relative Quantifizierung der induzierbaren Gene**

Median der Steigerung der Expression der untersuchten, durch Natriumbikarbonat und CO<sub>2</sub> induzierten Zielgene *capB*, *acpA*, *pagA* und *cya* bei *B. anthracis* und *B. cereus* bv *anthracis* im Vergleich zur Anzucht unter nicht-induzierenden Bedingungen

Aus Abbildung 14 wird deutlich, dass bei allen untersuchten Stämmen die Expression des Kapselgens *capB* am stärksten durch das Vorhandensein von Natriumbikarbonat und CO<sub>2</sub> beeinflusst wird. Die Expression von *capB* ist unter induzierenden Bedingungen zwischen 52- und 20-fach höher als die der Kontrollproben, die in LB-Flüssigmedium mit atmosphärischem Sauerstoff angezogen wurden. Die Expressionsraten der pXO2-tragenden afrikanischen Isolate sind hierbei mit denen der beiden getesteten *B. anthracis*-Stämme vergleichbar. Die Expression des auf pXO2 lokalisierten Regulators *acpA* ist bei allen Stämmen in Gegenwart von CO<sub>2</sub> und Natriumbikarbonat ebenfalls erhöht, sie ist zwischen 14- und 5-fach höher. Auch hier lässt sich kein Unterschied zwischen der Regulation dieses Gens bei den afrikanischen Isolaten, ihren hämolytischen Subklonen CI-1 und CI-12 und den klassischen *B. anthracis*-Vertretern UDIII-7 und Vollum nachweisen. Beim Toxingen *pagA* ist hingegen eine deutlich schwankende Expressionssteigerung zwischen den untersuchten Stämmen zu beobachten. Besonders auffällig ist *B. cereus* bv *anthracis* CA-5, bei dem *pagA* unter induzierenden Bedingungen 147-fach stärker exprimiert wird. Im Gegensatz dazu ist

beim Primärisolat CA und Subklon CI-12 keine Induktion der Expression nachzuweisen, beim Primärisolat CI ist sie in Gegenwart von CO<sub>2</sub> und Natriumbikarbonat doppelt so hoch, beim Subklon CI-18 dreifach. Überraschenderweise lässt sich beim Toxingen *cya* keine eindeutige Induktion der Expression durch CO<sub>2</sub> zeigen, lediglich bei *B. anthracis* Vollum und Subklon CA-5 ist die Expression von *cya* unter induzierenden Bedingungen doppelt so hoch wie unter nicht-induzierenden Bedingungen. Bei *B. anthracis* UDIII-7 und den Vertretern von *B. cereus* bv *anthracis* ist im Gegenteil eine leicht erhöhte Expression des Gens in Abwesenheit von CO<sub>2</sub> zu beobachten.



**Abbildung 15: Relative Quantifizierung der PlcR-regulierten Gene**

Median der Expressionsraten der untersuchten PlcR-regulierten Zielgene *sfp* und *plcA* bei *B. anthracis* und *B. cereus* bv *anthracis* im Vergleich zum Kontrollstamm *B. thuringiensis* sv konkukian unter gleichen Anzuchtbedingungen in LB-Flüssigmedium und atmosphärischem Sauerstoff

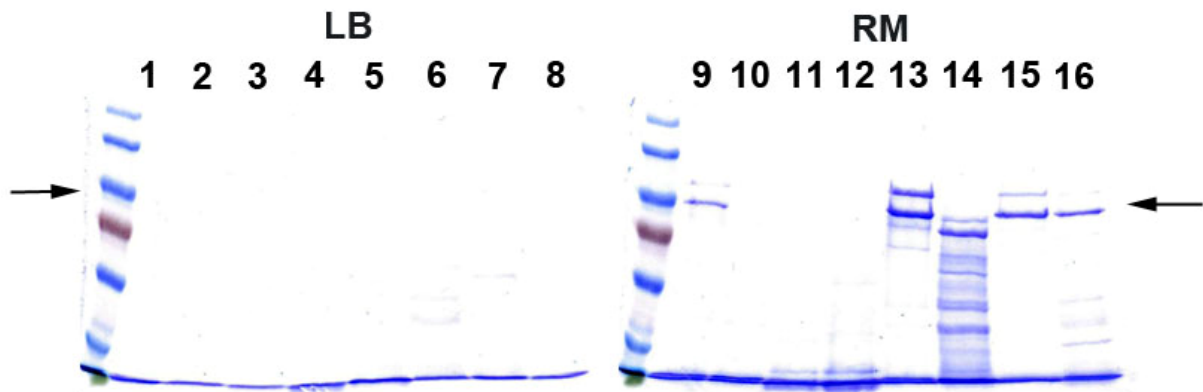
Abbildung 15 zeigt die Expressionsraten der beiden untersuchten PlcR-regulierten Gene *sfp* und *plcA* von *B. anthracis* und den afrikanischen Isolaten im Vergleich zum Kontrollstamm *B. thuringiensis* sv konkukian. Bei gleichen Wachstumsbedingungen ist die Expression von *sfp* bei *B. thuringiensis* über 500-fach höher als bei den untersuchten *B. anthracis*-Vertretern. Im Vergleich zu den Primärisolaten CI und CA, sowie den Subklonen CI-1 und CI-18 konnte noch eine 200- bis 360-fach höhere Expression von *sfp* ermittelt werden. Im Gegensatz dazu ist die Expression des Zielgens bei *B. thuringiensis* verglichen mit den Subklonen CI-12 und CA-5 überraschenderweise lediglich 16- bis 24-mal so hoch. Bei diesen beiden Isolaten scheint eine deutliche Hochregulation von *sfp* im Vergleich zu den anderen afrikanischen Stämmen stattzufinden. Auch die Expression von *plcA* unterscheidet sich bei diesen beiden Stämmen deutlich weniger von der Expression von *B. thuringiensis*. Sie ist hier bei *B. thuringiensis* nur 32- bis 26-fach höher, während sie zwischen 170- und 315-fach höher liegt

als bei den klassischen *B. anthracis*-Vertretern und den Primärisolaten CI und CA. Ausnahmen hiervon bilden lediglich Subklon CI-18, dessen *plcA*-Expression im Vergleich zum Kontrollstamm über 400-fach geringer und der hämolytische Subklon CI-1, dessen *plcA*-Expression 90-fach geringer ist.

Zusätzlich zum Vergleich mit der endogenen Kontrolle *rpoB* wurde ein weiterer Vergleich aller Zielgene gegen *gyrB* (die  $\beta$ -Untereinheit der DNA-Gyrase) durchgeführt. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse waren mit den oben dargestellten vergleichbar.

## 5.4 Untersuchung der Toxinproduktion

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob die afrikanischen Isolate und ihre Subklone biologisch wirksame Toxine produzieren. Ebenso sollte geklärt werden, ob die Regulation der Toxinproduktion vergleichbar mit der klassischen *B. anthracis*-Stämme ist. Von besonderem Interesse waren dabei die Bestandteile der spezifischen Anthrax-Toxine Protektives Antigen, Letal- und Ödemfaktor. Hier sollte festgestellt werden, ob sich die Ergebnisse der Expressionanalysen auch auf Proteinebene widerspiegeln. Es wurde auch die Produktion der von *B. cereus* und *B. thuringiensis* synthetisierten, *plcA*-kodierten Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC), die der Kontrolle durch den Regulator PlcR unterworfen ist, untersucht. Im Fokus standen hierbei die Untersuchungen der hämolytischen Subklone *B. cereus* bv *anthracis* CI-1 und CI-12, da eine spontan auftretende Hämolyse unter anderem auf funktionsfähiger Phospholipase und Sphingomyelinase basieren kann (11,173). Um die genannten Toxine im Kulturüberstand nachzuweisen und anschließend zu quantifizieren, wurden die zu untersuchenden Bakterienstämme unter zwei unterschiedlichen Bedingungen angezogen. Dies geschah analog zur Anzucht für die Genexpressionsanalysen bei Vorhandensein von atmosphärischem Sauerstoff in LB-Flüssigmedium und bei 5 % CO<sub>2</sub> in Rich-Medium mit Natriumbikarbonat. Nach 20 bis 24 Stunden Wachstum erfolgte die Ernte der Kulturüberstände mit anschließender Sterilfiltration. Die Toxinüberstände wurden zum einen quantitativ im ELISA gemessen, zum anderen wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Bei anschließender Färbung des Proteingels mit Coomassie-Blau waren in der Präparation der unter nicht-induzierenden Bedingungen angezogenen Stämme keine Proteinbanden sichtbar, was auf einen sehr geringen Anteil an Proteinen im Kulturüberstand hinweist. Nach Anzucht unter induzierenden Kulturbedingungen waren im Coomassie-Gel nur bei *B. cereus* bv *anthracis* CI, CI-1, CI-18 und CA-5 Proteinbanden in der richtigen Größe von ca. 90 kDa anfärbbar (siehe Abb. 16).



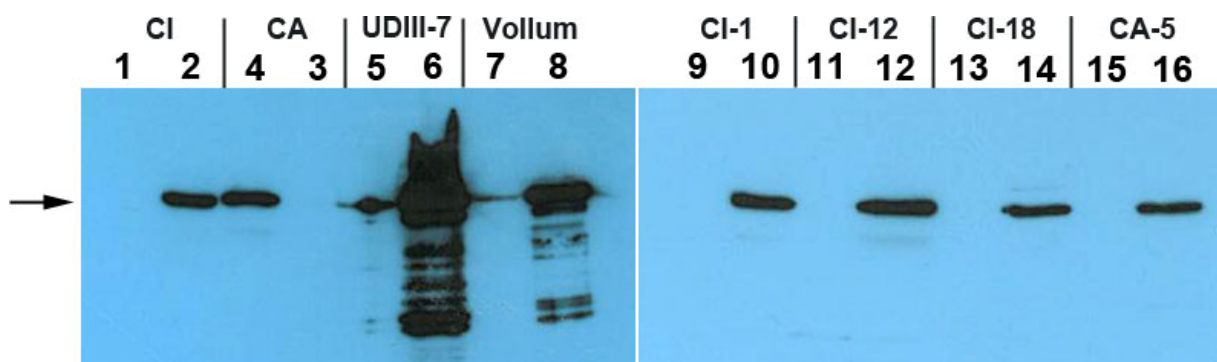
**Abbildung 16: Proteinnachweis aus Kulturüberständen mittels Coomassie-Blau**

Mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Proteingel (7,5 %) von Kulturüberständen von *B. anthracis* und *B. cereus* bv *anthracis* nach 20 Std. Anzucht unter induzierenden (RM) und nicht-induzierenden (LB) Bedingungen. Die Pfeile zeigen ein ungefähres Molekulargewicht von 90 kDa an. Aufgetragene Kulturüberstände: *B. cereus* bv *anthracis* CI (1, 9), CA (2, 10), *B. anthracis* UDIII-7 (3, 11), Vollum (4, 12), Subklone CI-1 (5, 13), CI-12 (6, 14), CI-18 (7, 15), CA-5 (8, 16)

Außerdem erfolgte der spezifische Nachweis der untersuchten Proteine im Immunoblot.

#### 5.4.1 Nachweis der Toxine im Western Blot

Um die Toxinkomponenten PA, LF und EF im Kulturüberstand der getesteten Stämme nachzuweisen, wurde die Methode des Western Blottings mit anschließender Detektion der Proteine durch spezifisch bindende Antikörper angewendet. Die ausgewählten Primärantikörper (siehe 4.9.1) binden an das jeweilige Antigen und mit Hilfe eines Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers können die Proteinbanden danach auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis des Nachweises von PA nach elektrophoretischer Auftrennung von jeweils 30 µl bakteriellem Kulturüberstand nach Anzucht in LB-Flüssigmedium mit O<sub>2</sub> und Rich-Medium mit Natriumbikarbonat und CO<sub>2</sub>.

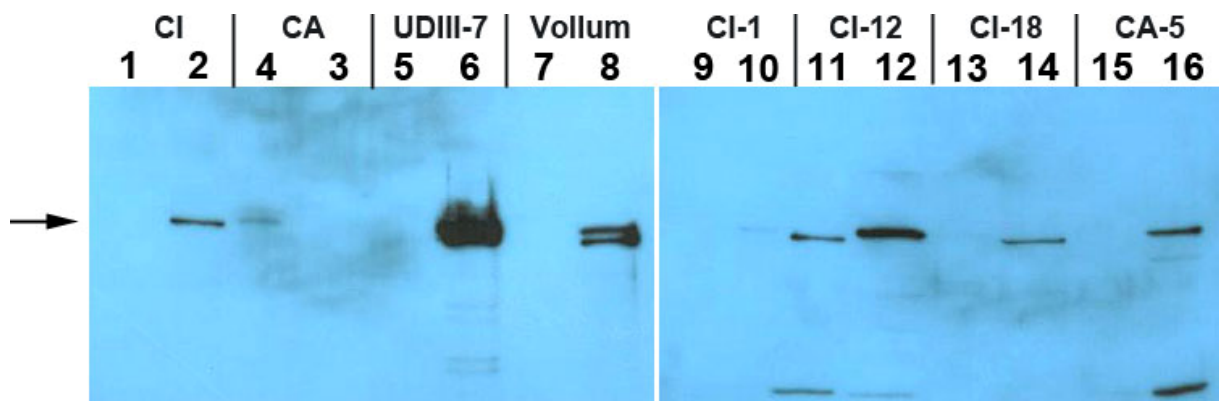


**Abbildung 17: Nachweis von Protektivem Antigen im Western Blot**

Nachweis von protektivem Antigen mittels mAb clone138 aus Kulturüberständen nach 20 Stunden Wachstum unter nicht-induzierenden (LB) und induzierenden (RM) Bedingungen. Der Pfeil zeigt ein Molekulargewicht von 83 kDa an (7,5 % SDS-Gel).

Aufgetragene Kulturüberstände: *B. cereus* bv *anthracis* CI aus LB (1) und RM (2), CA aus LB (3) und RM (4), *B. anthracis* UDIII-7 aus LB (5) und RM (6), Vollum aus LB (7) und RM (8), Subklone CI-1 aus LB (9) und RM (10), CI-12 aus LB (11) und RM (12), CI-18 aus LB (13) und RM (14), CA-5 aus LB (15) und RM (16)

Die spezifische Proteinbande für PA hat ein MW von 83 kDa, was in Vorversuchen durch die Bande des mitgeführten Kontrollansatzes an rekombinatem PA (rPA) bestätigt wurde. Die getesteten Bakterienstämme der beiden *B. anthracis*-Vertreter zeigen eine deutlich erhöhte PA-Produktion und Sezernierung in den Kulturüberstand unter Einfluss von CO<sub>2</sub> und Bikarbonat. Außerdem sind Abbauprodukte von PA detektierbar. Im Gegensatz zu den afrikanischen Isolaten ist hier eine geringe Menge an PA auch unter nicht-induzierenden Bedingungen nachzuweisen. Die afrikanischen *Bacillus*-Stämme sezernieren nur unter induzierenden Anzuchtbedingungen PA, die Menge ist jedoch geringer als bei den getesteten *B. anthracis*-Vertretern.



**Abbildung 18: Nachweis von Letalfaktor im Western Blot**

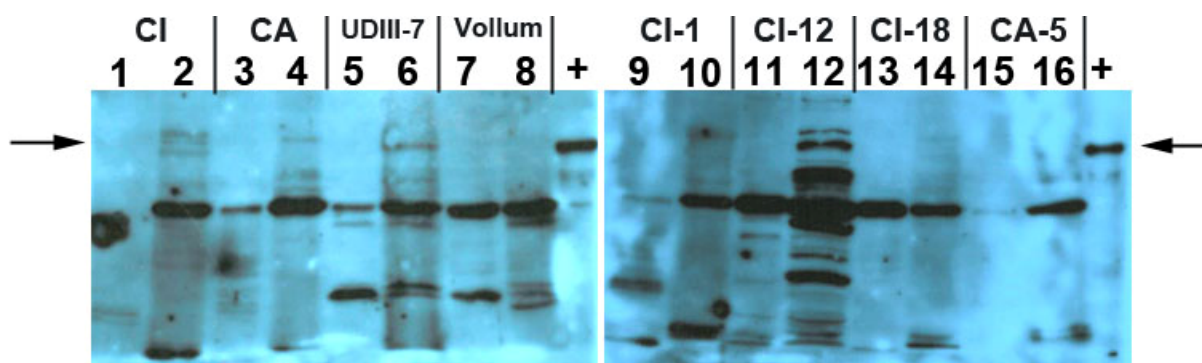
Nachweis von Letalfaktor mittels mAB cloneBAL0105 aus Kulturüberständen nach 20 Stunden Wachstum unter nicht-induzierenden (LB) und induzierenden (RM) Bedingungen. Der Pfeil zeigt ein Molekulargewicht von 90 kDa an (7,5 % SDS-Gel).

Aufgetragene Kulturüberstände: *B. cereus* bv *anthracis* CI aus LB (1) und RM (2), CA aus LB (3) und RM (4), *B. anthracis* UDIII-7 aus LB (5) und RM (6), Vollum aus LB (7) und RM (8), Subklone CI-1 aus LB (9) und RM (10), CI-12 aus LB (11) und RM (12), CI-18 aus LB (13) und RM (14), CA-5 aus LB (15) und RM (16)

Die spezifische Proteinbande für LF hat ein MW von 90 kDa. Aus Abbildung 18 wird deutlich, dass *B. anthracis* UDIII-7 unter induzierenden Bedingungen etwas mehr Toxin zu produzieren scheint als die afrikanischen Isolate. Auffällig ist außerdem, dass im Kulturüberstand von Primärisolat CA und Subklon CI-1 auch unter induzierenden Bedingungen sehr wenig Letalfaktor nachweisbar ist. Demgegenüber produziert Subklon CI-12 auch unter nicht-induzierenden Bedingungen deutlich detektierbar LF. Beim Nachweis von Ödemfaktor, dessen spezifische Proteinbande ein MW von 89 kDa besitzt, spiegelt sich ein etwas anderes Bild wider (siehe Abb. 19). Ein eindeutiger Nachweis von EF im Kulturüberstand war in der vorliegenden Arbeit lediglich beim afrikanischen Stamm CI-12, sowie bei *B. anthracis* UDIII-7 möglich, dies jedoch nur nach Anzucht unter induzierenden Bedingungen. Allerdings sind die betreffenden spezifischen Banden mit dem richtigen Molekulargewicht nur sehr schwach ausgeprägt. Auch aus den Kulturüberständen der anderen untersuchten Stämme konnte ein Nachweis von EF nicht mit Sicherheit erfolgen. Die hier deutlich sichtbaren Proteinbanden weisen nicht die richtige Größe von 89 kDa auf,



sondern sind deutlich kleiner. Da die Signale jedoch einheitlich ein definiertes, geringeres Molekulargewicht anzeigen, ist es möglich, dass in allen Kulturüberständen ein spezifisches Spaltprodukt von EF mit dem verwendeten polyklonalen Antikörper H45-EF nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 19: Nachweis von Ödemfaktor im Western Blot**

Nachweis von Ödemfaktor mittels pAB H45-EF aus Kulturüberständen nach 20 Stunden Wachstum unter nicht-induzierenden (LB) und induzierenden (RM) Bedingungen. Der Pfeil zeigt ein Molekulargewicht von 90 kDa an (7,5 % SDS-Gel). + = rEF

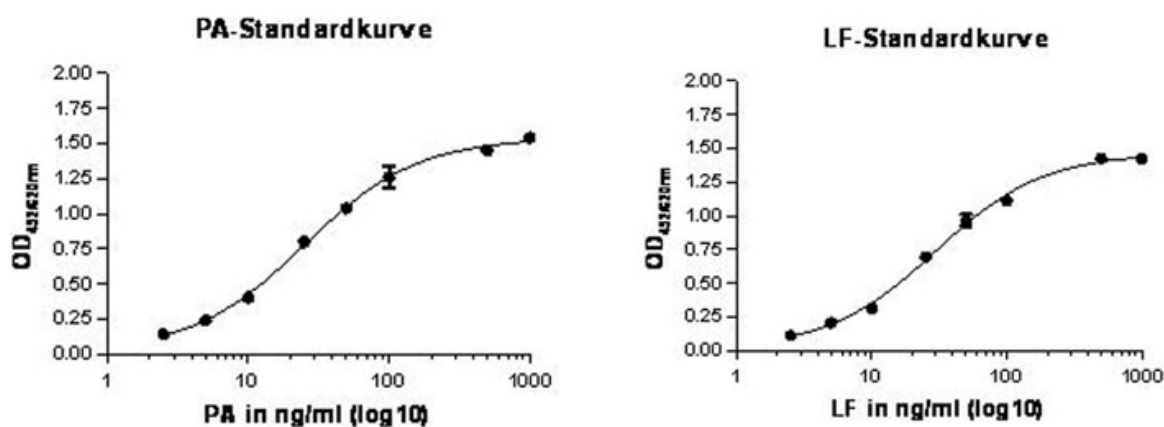
Aufgetragenen Kulturüberstände: *B. cereus* biovar *anthracis* CI aus LB (1) und RM (2), CA aus LB (3) und RM (4), *B. anthracis* UDIII-7 aus LB (5) und RM (6), Vollum aus LB (7) und RM (8), Subklone CI-1 aus LB (9) und RM (10), CI-12 aus LB (11) und RM (12), CI-18 aus LB (13) und RM (14), CA-5 aus LB (15) und RM (16)

Eine Untersuchung der Bakterienpellets auf PA, LF und EF im Western Blot erbrachte keine Ergebnisse, die von denen der Untersuchung der Kulturüberstände abweichen. Es ist demnach davon auszugehen, dass eine geringerer Toxingehalt in den Kulturüberständen bei *B. cereus* bv *anthracis* nicht durch eine verminderte Sekretion aus der Zelle heraus verursacht wird.

#### 5.4.2 Konzentrationsbestimmung der Toxine mittels ELISA

Die nach 20 bis 24 Stunden Kultur gewonnenen bakteriellen Überstände wurde auch mittels capture-ELISA quantitativ untersucht. Hierbei war von größtem Interesse, ob sich die Mengen der von den afrikanischen Isolaten sezernierten Toxinkomponenten von denen klassischer *B. anthracis*-Stämme unterscheiden. Für die verschiedenen ELISA der drei untersuchten Toxinkomponenten wurden die in Tabelle 11 (S. 45) aufgeführten Fänger- und Detektionsantikörper verwendet. Die Kulturüberstände der Anzuchten unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen wurden zunächst unverdünnt getestet. Da die Ergebnisse allerdings schwankten wurden sie letztlich 1:2 in PBS-T + 10 % Ziegen Serum verdünnt und die Verdünnung bei den erhaltenen Ergebnissen verrechnet. Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen der Toxinkomponenten PA, LF und EF aus je zwei unabhängig voneinander hergestellten Kulturüberständen mit nachfolgendem ELISA. Die errechneten Toxinkonzentrationen

basieren auf den jeweiligen Standardkurven der bei den Versuchen mitgeführten Toxinstandards (siehe Abb. 20). Das Detektionslimit (LOD) lag beim PA- und LF-ELISA bei 0,25 - 0,5 ng/ml.



**Abbildung 20: Standardkurven PA- und LF-capture-ELISA**

Antikörperkombination PA-capture-ELISA: Fänger BAP0105, Detektor pc133

Antikörperkombination LF-capture-ELISA: Fänger BAL0105, Detektor pc134

Die anhand der Standardkurven ermittelten Konzentrationen der Toxinkomponenten PA und LF können den nachfolgenden Tabellen 18 und 19 entnommen werden. Die jeweiligen Ergebnisse der beiden unabhängig voneinander durchgeführten Versuche liegen dicht beieinander, lediglich bei der Konzentration von PA weichen sie aufgrund der höheren Werte in Rich-Medium mit Bikarbonat und CO<sub>2</sub> leicht voneinander ab. Es ist klar ersichtlich, dass alle untersuchten Stämme unter induzierenden Wachstumsbedingungen deutlich größere Mengen an PA in den Kulturüberstand sezernieren als unter nicht-induzierenden Bedingungen. Die jeweiligen Steigerungsraten schwanken jedoch stark zwischen 12-fach (*B. cereus* bv *anthracis* CA) und 422-fach (*B. anthracis* Vollum) mehr. *B. anthracis* Vollum produziert unter induzierenden Bedingungen am meisten PA, zwischen 770 und 1394 ng/ml. Im Vergleich dazu produzieren *B. anthracis* UDIII-7 mit 285 bis 441 ng/ml und *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA mit durchschnittlich 115 bis 145 ng/ml deutlich weniger dieser Toxinkomponente. *B. anthracis* CA-5 hebt sich mit einer Produktion von ca. 200 ng/ml deutlich von den anderen Subklonen ab, deren PA-Konzentration im Kulturüberstand nach Anzucht unter induzierenden Bedingungen bei etwa 60 bis 90 ng/ml liegt.

**Tabelle 18: PA-Konzentration in Kulturüberständen**

Zusammenfassung der quantitativen Bestimmung der PA-Konzentration im Kulturüberstand von *B. anthracis* UDIII-7, Vollum und *B. cereus* bv *anthracis* CI, CA, CI-1, CI-12, CI-18 und CA-5 nach Anzucht für 20 – 24 Std. unter nicht-induzierenden (LB) und induzierenden (RM) Bedingungen mittels capture-ELISA; Konzentrationsangaben in ng/ml; n.d. = nicht detektierbar

	PA-ELISA 1 (LB)	PA-ELISA 1 (RM)	PA-ELISA 2 (LB)	PA-ELISA 2 (RM)
<b>CI</b>	4,38	130,32	4,60	139,06
<b>CA</b>	12,84	145,34	13,38	115,12
<b>UDIII-7</b>	2,68	285,58	2,74	441,20
<b>Vollum</b>	3,32	1394,60	2,82	771,5
<b>CI-1</b>	3,82	88,02	3,82	82,12
<b>CI-12</b>	n.d.	74,14	n.d.	77,02
<b>CI-18</b>	n.d.	60,69	n.d.	57,94
<b>CA-5</b>	8,72	215,9	8,98	205,34

Das Niveau der von den untersuchten Stämmen produzierten Menge an LF liegt wie erwartet deutlich unter dem des PA. Auch von dieser Toxinkomponente produziert *B. anthracis* Vollum mit 152 bis 163 ng/ml unter induzierenden Wachstumsbedingungen am meisten, dagegen sezerniert *B. anthracis* UDIII-7 mit ca. 50 ng/ml nur ein Drittel davon. Die LF-Konzentrationen, die unter gleichen Anzuchtbedingungen in den Kulturüberständen von CI und CA nachgewiesen werden konnten, liegen zwischen ca. 40 und 71 ng/ml. Überraschenderweise produzieren die Subklone CI-1, CI-12, CI-18 und CA-5 unter induzierenden Kulturbedingungen nicht mehr LF, teilweise liegen die Level unter der Nachweisgrenze des LF-ELISA. Bemerkenswert ist jedoch die etwas erhöhte Konzentration von LF im Überstand des Subklons CI-12. Jedoch ist auch in diesem Fall keine vermehrte Produktion dieser Toxinkomponente unter induzierenden Wachstumsbedingungen nachweisbar.

**Tabelle 19: LF-Konzentration in Kulturüberständen**

Zusammenfassung der quantitativen Bestimmung der LF-Konzentration im Kulturüberstand von *B. anthracis* UDIII-7, Vollum und *B. cereus* bv *anthracis* CI, CA, CI-1, CI-12, CI-18 und CA-5 nach Anzucht für 16 – 20 Std. unter nicht-induzierenden (LB) und induzierenden (RM) Bedingungen mittels capture-ELISA; Konzentrationsangaben in ng/ml; n.d. = nicht detektierbar

	LF-ELISA 1 LB	LF-ELISA 1 RM	LF-ELISA 2 LB	LF-ELISA 2 RM
<b>CI</b>	n.d.	38,84	3,28	39,62
<b>CA</b>	2,68	70,68	3,66	71,00
<b>UDIII-7</b>	2,82	49,2	3,86	49,78
<b>Vollum</b>	6,04	152,84	6,34	163,22
<b>CI-1</b>	n.d.	n.d.	3,14	3,36
<b>CI-12</b>	7,70	8,36	8,12	8,16
<b>CI-18</b>	n.d.	n.d.	2,44	2,76
<b>CA-5</b>	n.d.	n.d.	3,02	3,16

Die im Kulturüberstand enthaltenen Konzentrationen an EF lagen unterhalb des Detektionslimits von 5 ng/ml des im ZBS 2 des Robert Koch-Instituts angewendeten capture-ELISA. Somit ergaben beide Versuchsansätze keine detektierbaren Mengen an EF, was durch die Ergebnisse des EF-Western Blots bestätigt wurde.

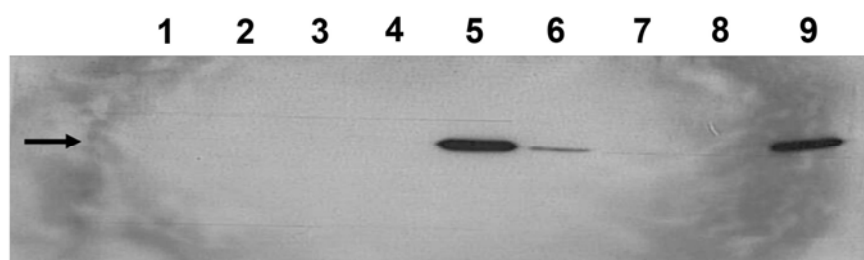
### **5.4.3 Zytotoxizitätstest mit toxinhaltigen Kulturüberständen**

Um auch die biologische Aktivität der im Kulturüberstand vorhandenen Toxinkomponenten zu testen, wurde ein Zytotoxizitätstest mit der Maus-Monozytenlinie RAW 264.7 durchgeführt. Durch den Einsatz einer adhärenenten Zelllinie lässt sich schon nach wenigen Stunden unter dem Lichtmikroskop ein möglicher toxischer Effekt gut erkennen. Geschädigte Zellen geben ihre Spindelform auf und kugeln sich ab, es sind deutlich sichtbare große Vakuolen in der Zellstruktur zu sehen. Im fortgeschrittenen nekrotischen Stadium wird die Zellmembran sichtbar dünn und porös. Einströmende Flüssigkeit lässt die Zelle stark aufblähen, da die Barrierefunktion der Zellmembran nicht mehr gegeben ist. Um die Reaktion auch quantifizieren zu können, wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen gemessen. Der Test wurde mit dem kommerziell erhältlichen Reagenz WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, D) durchgeführt, das nach einer definierten Einwirkzeit des Toxinüberstands zugefügt wurde. Je größer der toxische Effekt auf die Zellen ist, desto geringere Mengen des Formazans werden von den Zellen aus dem Substrat WST gebildet. In der vorliegenden Arbeit konnte in keinem der dreimal durchgeführten Versuche ein toxischer Effekt auf die Zellen gezeigt werden. Auch eine Durchführung des Tests mit Zellen der humanen Makrophagenlinie THP-1 oder der murinen Monozytenlinie J774.1 ergab keine abweichenden Ergebnisse, was eine verringerte Sensitivität der RAW 264.7-Zellen gegenüber den Toxinkomponenten ausschließt. Dies lässt sich auch an den Ergebnissen der Kontrollansätze mit den rekombinanten Toxinen PA und LF erkennen. Bei Zugabe von 500 ng PA und 50 ng LF konnte eine toxische Wirkung auf die Makrophagen beobachtet werden. Hier befand sich das am Ende des Tests gemessene Absorptionsniveau auf gleicher Höhe mit dem der lytischen Kontrolle, hervorgerufen durch 0,1 %-iges Triton X-100, was einer Zytotoxizität von 100 % entspricht. Wurde hingegen nur eine der beiden Toxinkomponenten in oben genannten Konzentrationen zu den zu testenden Überständen zugegeben, war ebenfalls keinerlei toxische Wirkung auf die Zellen nachweisbar.

### **5.4.4 Nachweis von Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C im Western Blot**

Ein wichtiges Kriterium zur Abgrenzung von *B. anthracis* gegenüber anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe ist die spezifische nonsense-Mutation im *plcR*-Gen. Durch den daraus resultierenden Transkriptionsabbruch ist der Regulator PlcR inaktiv und die durch ihn bei *B.*

*cereus* und *B. thuringiensis* aktivierten Gene führen bei *B. anthracis* zu keinem funktionsfähigen Protein, auch wenn sie auf sehr geringem Niveau exprimiert werden (206). Die bei den afrikanischen Isolaten vorliegende Mutation im *plcR*-Gen unterscheidet sich zwar von der typischen nonsense-Mutation von *B. anthracis*, führt aber zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einem veränderten C-Terminus des Proteins (126). In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die Funktion der durch *PlcR* regulierten PI-PLC gestört ist. Die Ergebnisse der Anzucht der afrikanischen Isolate auf *Cereus*-Ident-Agarplatten (siehe 5.1) zeigen keine Aktivität der Phospholipase, somit blieb die Frage, ob diese von den Bakterienzellen produziert wird und nicht funktionsfähig ist, oder ob eine Synthese nicht stattfindet. Aus diesem Grund wurden die Kulturüberstände im Western Blot auch auf das Vorhandensein von PI-PLC untersucht, die ein Molekulargewicht von 35 kDa besitzt (138). Zusätzlich zu den getesteten Stämmen *B. cereus* bv *anthracis* CI, CA, CI-1 und C-12 und den *B. anthracis*-Stämmen Vollum und UDIII-7 wurden auch drei Stämme der *B. cereus*-Gruppe in die Untersuchungen mit einbezogen, von denen eine Aktivität der PI-PLC auf Selektivagar nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Analyse konnten im Immunoblot bestätigt werden. Der Phospholipase-Nachweis aus Kulturüberstand mit dem spezifischen Antikörper A72-24 war nur bei den beiden *B. cereus*-Stämmen und bei *B. thuringiensis* möglich, bei allen anderen untersuchten Stämmen war keinerlei Signal im Western Blot detektierbar (siehe Abb. 21). Auch die Untersuchung von inaktiviertem Bakterienmaterial lieferte keine abweichenden Ergebnisse, auch hier konnte nur in Bakterienpellets von *B. cereus* DSM 31 und ATCC 10987, sowie in *B. thuringiensis* Phospholipase C nachgewiesen werden.



**Abbildung 21: Nachweis von Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C im Western Blot**

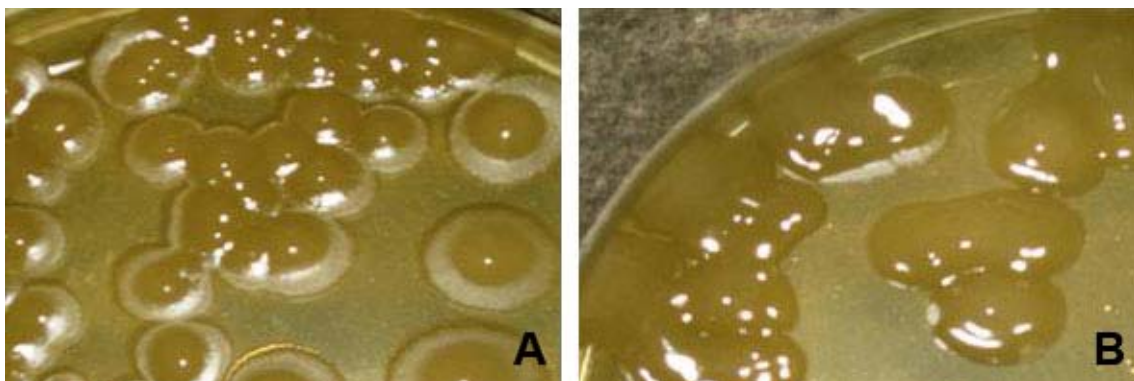
Immunologischer Nachweis von Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C mittels mAb A72-24 im Western Blot. Der Pfeil zeigt ein Molekulargewicht von 35 kDa an.

Aufgetragene Kulturüberstände nach 16 – 20 Stunden Anzucht: *B. cereus* bv *anthracis* CI (1), CA (2), *B. anthracis* Vollum (3), UDIII-7 (4), *B. cereus* DSM 31 (5), ATCC 10987 (6), *B. cereus* bv *anthracis* CI-1 (7), CI-12 (8), *B. thuringiensis* sv konkukain (9).

## 5.5 Untersuchung der Kapselbildung

Die Isolate *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA besitzen ein zu *B. anthracis* annähernd identisches Virulenzplasmid (*pCI-XO2*), auf dem die Gene für die spezifische Poly-D-

Glutaminsäurekapsel liegen (126). Bei Wachstum unter induzierenden Bedingungen auf LB-Agar mit Bikarbonat und CO<sub>2</sub> zeigen die Kolonien beider Primärisolate ein extrem schleimiges Aussehen, das deutlich stärker ausgeprägt ist als bei *B. anthracis* (siehe Abb. 22). Ebenso verhalten sich die pXO2-tragenden Subklone CI-1 und CI-12. Da die Subklone CI-18 und CA-5 kein Kapselplasmid besitzen, erscheinen die Kolonien etwas weniger gallertig. Eine Frage, die in der vorliegenden Arbeit geklärt werden sollte war, ob die Regulation der Kapselbildung mit der klassischer Vertreter von *B. anthracis* übereinstimmt. Zu diesem Zweck wurde Kulturmaterial von Anzuchten unter induzierenden und nicht induzierenden Bedingungen (siehe 5.3.2) nach verschiedenen Methoden auf Kapselstrukturen untersucht.

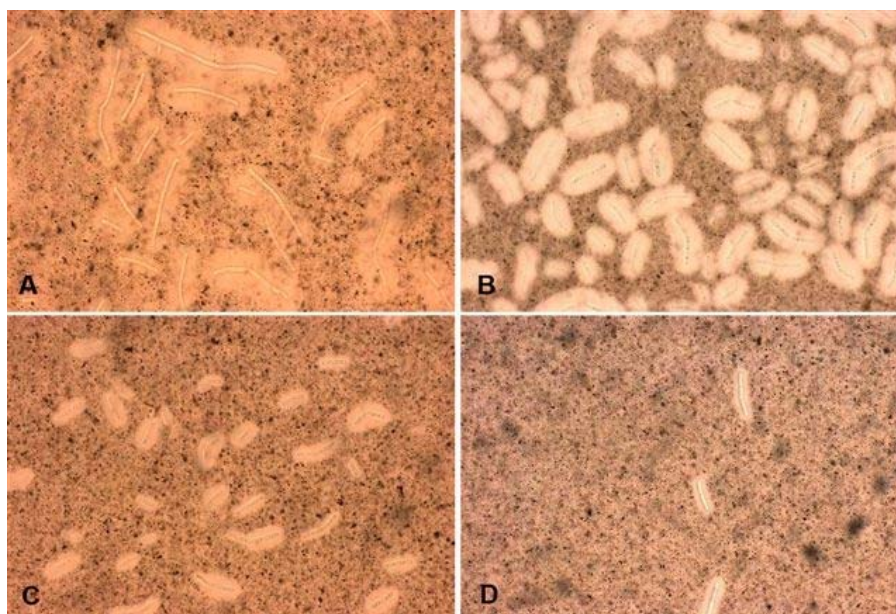


**Abbildung 22: Kapselbildung auf Agar mit Natriumbikarbonat**

Wachstum von *B. cereus* *bv anthracis* CI (A) und CA (B) nach 16 Std. Wachstum auf LB-Agar mit 0,8 % Natriumbikarbonat und 5 % CO<sub>2</sub>.

### 5.5.1 Kapselnachweis durch Tuschefärbung

Beim Kapselnachweis durch Tuschefärbung wird nicht direkt die Kapselstruktur der Bakterien angefärbt, sondern sie erscheint im Lichtmikroskop als heller Hof um die vegetative Zelle herum, während der Hintergrund von der Tusche dunkel gefärbt wird. Nach Anzucht unter induzierenden Bedingungen waren bei allen untersuchten afrikanischen Isolaten deutliche Höfe zu erkennen, ebenso wie bei den *B. anthracis*-Vertretern UDIII-7 und Vollum. Bei den ebenfalls untersuchten *B. cereus*-Vertretern DSM 31 und ATCC 10987 waren hingegen keine Kapselstrukturen nachweisbar. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Tuschefärbung der Stämme *B. cereus* *bv anthracis* CI, CA und CA-5, sowie *B. anthracis* UDIII-7 nach Anzucht unter induzierenden Bedingungen. Auffällig ist hierbei, dass auch Subklon CA-5 eine kapselähnliche Struktur ausbildet, obwohl ihm das Kapseloperon-tragende Virulenzplasmid pXO2 fehlt.

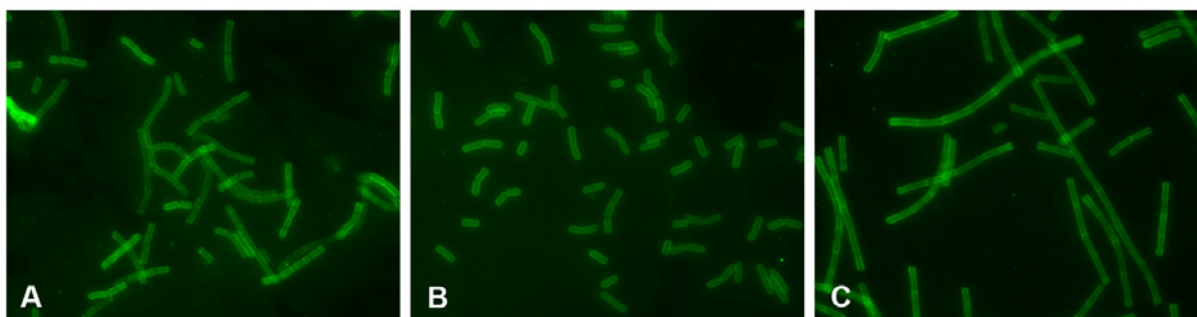


**Abbildung 23: Kapselnachweis durch Tuschefärbung**

Tuschefärbung von *B. cereus* bv *anthracis* CI (A), CA (B), CA-5 (C) und *B. anthracis* UDIII-7 (D) nach Anzucht unter induzierenden Bedingungen für 4 Stunden. Die vegetativen Zellen wurden mit 4 % pFA für 60 min fixiert und anschließend mit 10 % FA für 16 bis 20 Stunden inaktiviert.

### 5.5.2 Kapselnachweis mittels Immunfluoreszenztest

Um die Ausbildung der Anthrax-spezifischen Poly-D-Glutaminsäurekapsel zu bestätigen, wurde auch ein Immunfluoreszenztest mit dem spezifischen Antikörper F26G3 (135) mit allen Stämmen durchgeführt. Abbildung 24 zeigt den Nachweis der spezifischen Anthrax-Kapsel bei den afrikanischen Isolaten CI und CA wie bereits zuvor beschrieben (126), bei *B. cereus* bv *anthracis* CI-18 und CA-5, denen das Plasmid pXO2 fehlt, konnte erwartungsgemäß kein Signal detektiert werden.



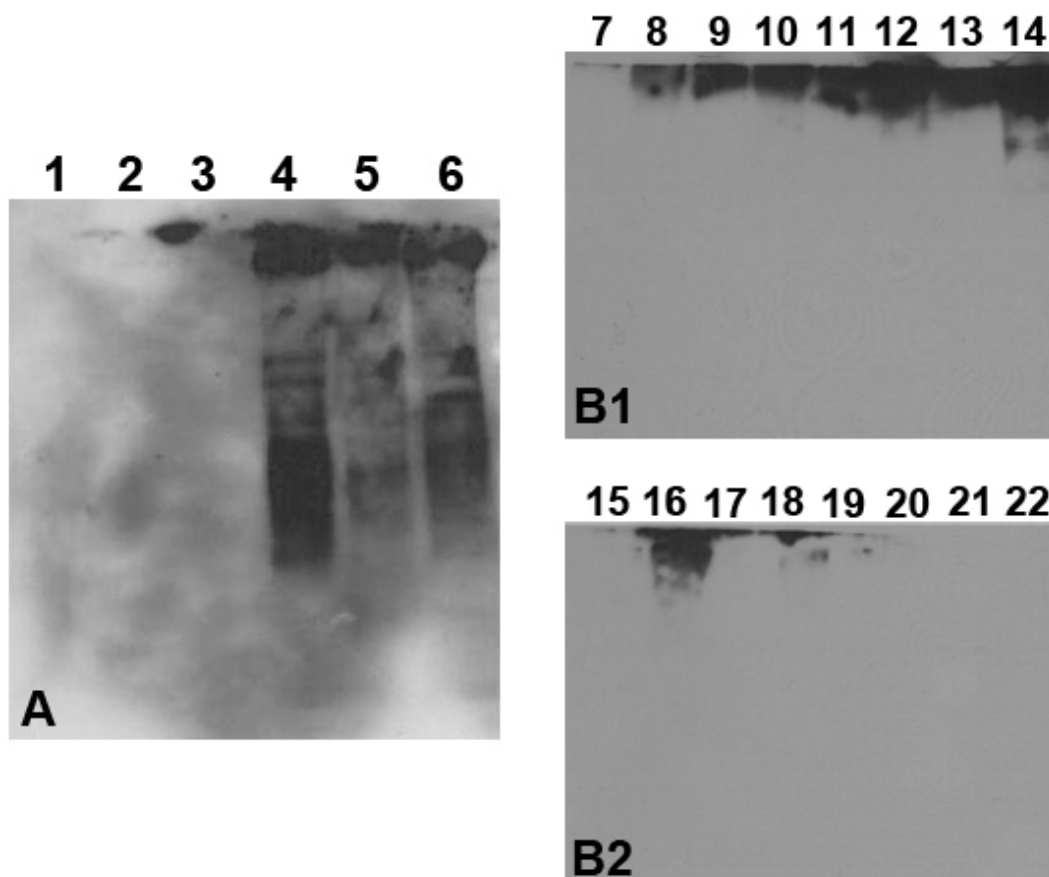
**Abbildung 24: Nachweis der Poly-D-Glutaminsäurekapsel mittels Immunfluoreszenz**

Immunologischer Nachweis der *B. anthracis*-spezifischen Poly-D-Glutaminsäurekapsel von *B. cereus* bv *anthracis* CI (A), CA (B) und *B. anthracis* UDIII-7 (C) mittels mAb F26G3 +  $\gamma$ m-Alexa488 nach Anzucht unter induzierenden Bedingungen für 4 Stunden. Die vegetativen Zellen wurden mit 4 % pFA für 60 min fixiert und anschließend mit 10 % FA für 16 bis 20 Stunden inaktiviert.

### 5.5.3 Kapselnachweis im Western Blot

Der Nachweis von Kapselmateriale im Western Blot wurde ebenfalls mit Hilfe des Antikörpers F26G3 durchgeführt. Wie Abbildung 25 zeigt, ist nach Anzucht der untersuchten Stämme unter induzierenden Bedingungen deutlich die hochmolekulare Kapselfraktion aus dem Kulturüberstand und aus bakteriellem Zellmaterial nachweisbar. Wurden die Stämme

dagegen unter nicht-induzierenden Bedingungen angezogen, so blieb ein Signal im Immunoblot mit vegetativen Bakterien aus. Allerdings konnte im Kulturüberstand von *B. cereus* bv *anthracis* CA und *B. anthracis* UDIII-7 und Vollum auch nach Anzucht in LB-Flüssigmedium und atmosphärischem Sauerstoff Kapselmaterial im Kulturüberstand nachgewiesen werden (B1 und B2, Laufspuren 9, 11 und 13). Lediglich bei den Stämmen *B. cereus* bv *anthracis* CI-18 und CA-5 konnte unter keiner der beiden Anzuchtbedingungen eine Poly-D-Glutaminsäurekapsel nachgewiesen werden.



**Abbildung 25: Nachweis der Poly-D-Glutaminsäurekapsel im Western Blot**

Immunologischer Nachweis der *B. anthracis*-spezifischen Poly-D-Glutaminsäurekapsel mittels mAb F26G3 im Western Blot aus Bakterienpellets (A) und Kulturüberständen (B1, B2).

A: Anzucht unter nicht-induzierenden Bedingungen für 4 Stunden: *B. cereus* bv *anthracis* CI (1), CA (2), *B. anthracis* Vollum (3); Anzucht unter induzierenden Bedingungen: *B. cereus* bv *anthracis* CI (4), CA (5), *B. anthracis* Vollum (6).

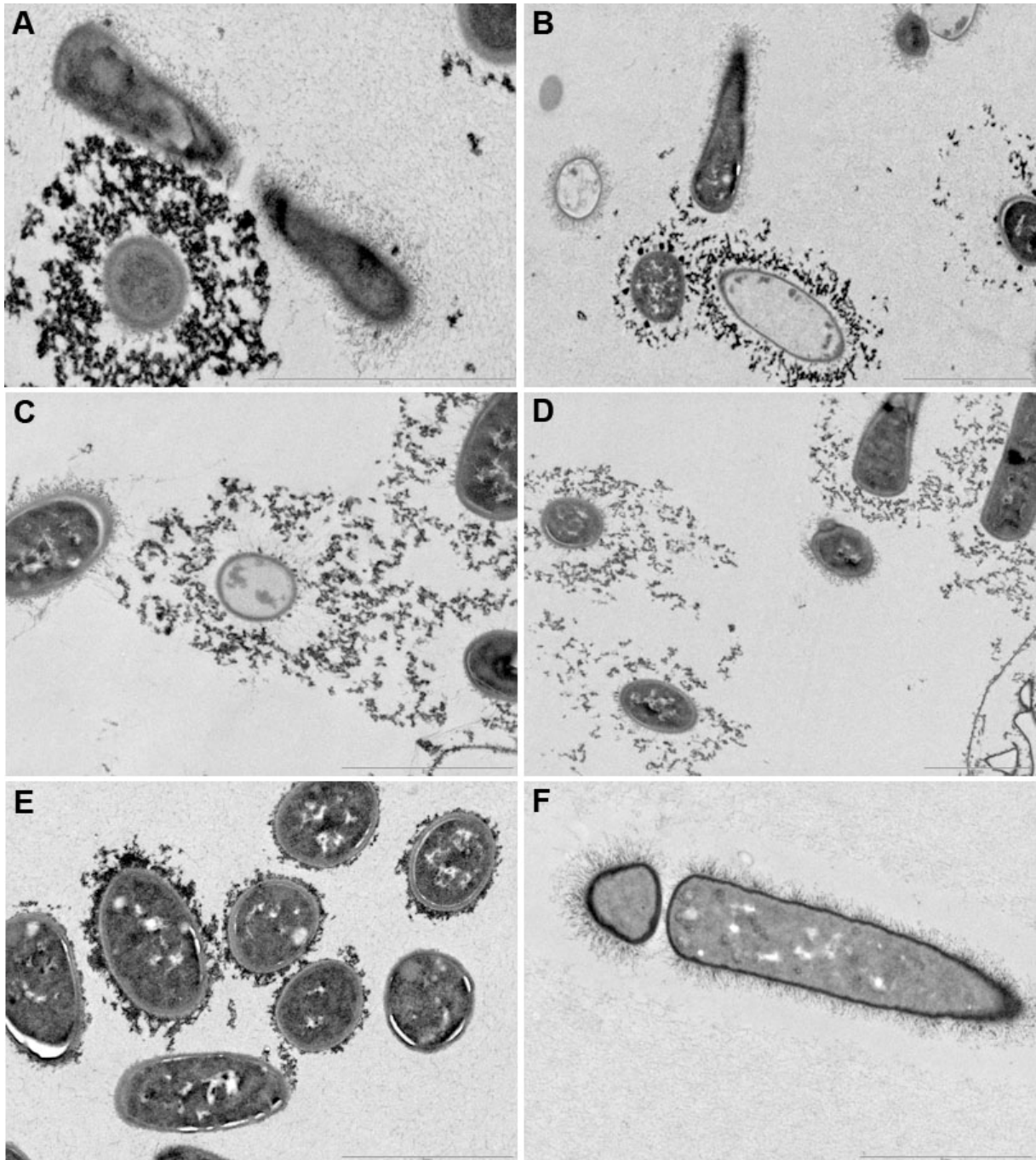
B1 und B2: Aufgetragene Kulturüberstände nach 16 – 20 Stunden: *B. cereus* bv *anthracis* CI aus LB (7) und RM (8), CA aus LB (9) und RM (10), *B. anthracis* UDIII-7 aus LB (11) und RM (12), Vollum aus LB (13) und RM (14), Subklone CI-1 aus LB (15) und RM (16), CI-12 aus LB (17) und RM (18), CI-18 aus LB (19) und RM (20), CA-5 aus LB (21) und RM (22)

#### 5.5.4 Kapselnachweis im Elektronenmikroskop

Zusätzlich zum Nachweis der Kapselstruktur mit immunologischen und mikrobiologischen Methoden wurde in Kooperation mit dem Institut Pasteur Paris auch eine Untersuchung mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) durchgeführt. Da sich auch bei den



Subklonen *B. cereus* bv *anthracis* CI-18 und CA-5, denen das Plasmid pXO2 fehlt, nach Tuschefärbung eine Kapselstruktur zeigen lässt, sollte die Frage nach einem eventuell vorhandenen zweiten Kapseltyp geklärt werden. Hierfür wurden die zu untersuchenden Stämme vier Stunden unter induzierenden Bedingungen angezogen und anschließend mit polykationischem Ferritin gefärbt. In Abbildung 26 sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der untersuchten Stämme nach Dünnschnitten dargestellt. Die Aufnahmen von *B. cereus* bv *anthracis* CA (A, B) und CI (C, D) zeigen deutlich erkennbar zwei unterschiedliche Strukturen um den Querschnitt der vegetativen Zelle herum. Eine dieser beiden Strukturen ist granulär angefärbt. Da sich polykationisches Ferritin dazu eignet, polysaccharidreiche Kapselstrukturen verschiedener Bakterien sichtbar zu machen (114), ist davon auszugehen, dass es sich um eine solche Formation handelt. Die typische, fädige Struktur der Anthrax-spezifischen Poly-D-Glutaminsäurekapsel, die bei klassischen Vertretern von *B. anthracis* wie Stamm RPG1 im TEM zu finden ist (siehe Abb. 26 F), hebt sich davon deutlich ab. Bei *B. cereus* bv *anthracis* CARP, der kein pXO2 besitzt, aber in der Tuschefärbung ebenfalls eine Kapselstruktur zeigt, fehlt diese fädige Struktur vollständig (siehe Abb. 26 E). Hier ist nur die granuläre Hüllstruktur zu erkennen, die aber im Gegensatz zu den primären *Bacillus*-Isolaten dicht an der Zelloberfläche anliegt. Bei *B. cereus* bv *anthracis* CA und CI umhüllt die durch Ferritin angefärbte gekörnte Struktur die Bakterien wolkenartig, die fädige Polyglutaminkapsel ist unter dieser Schicht der Zellwand entspringend zu erkennen.



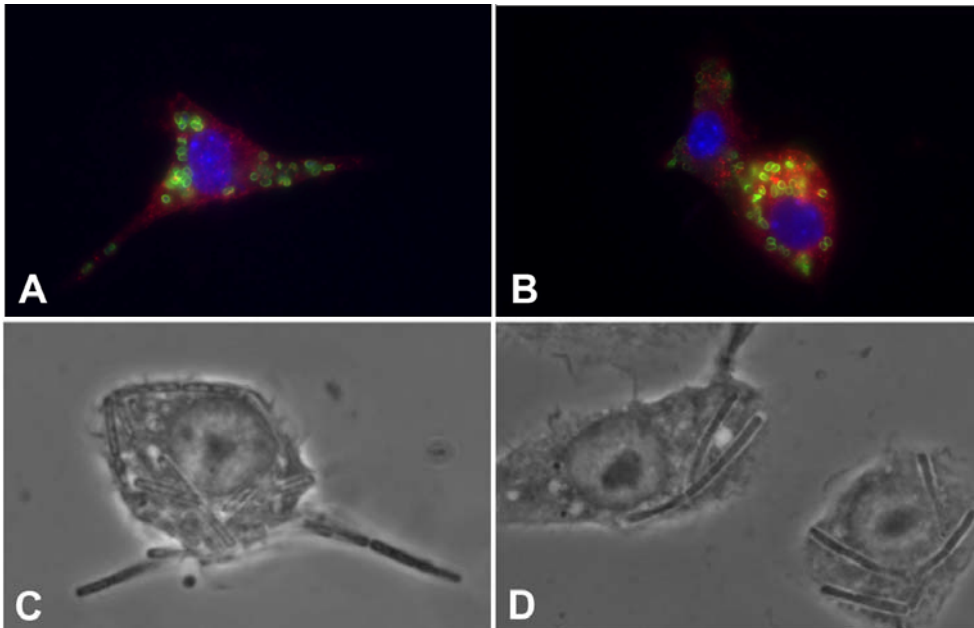
**Abbildung 26: Kapselnachweis im Elektronenmikroskop**

TEM-Aufnahmen von *B. cereus* bv *anthracis* CA (A, B), CI (C, D), CARP (E) und *B. anthracis* RPG1 (F) nach Anzucht unter induzierenden Bedingungen für 4 Stunden. Anfärbung der Präparate mit polykationischem Ferritin nach Fixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid nach Jacques and Foiry (114)

## 5.6 Intrazelluläres Verhalten und Keimung im Makrophagen

Eine weitere Frage, der in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden sollte, war ob die afrikanischen Isolate in der Lage sind, in Makrophagen zu keimen. Hierzu wurden vergleichende Infektionsversuche durchgeführt, in denen Monozyten und Makrophagen mit Sporen von *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* oder *B. cereus* bv *anthracis* infiziert wurden. Als Wirtszellen wurde hierfür die Maus-Monozytenlinie RAW 264.7 verwendet, zu der mit einer MOI von 10 Sporen der zu untersuchenden Stämme zugegeben wurden. Nach 60 min Phagozytosezeit und 30 min Einwirkzeit des anschließend zugesetzten Gentamycins wurden die Versuchsansätze fünfmal gewaschen. Unabhängig vom Bakterienstamm waren nach dieser Zeit in oder an annähernd 100 % der Zellen Sporen unter dem Mikroskop mittels Immunfluoreszenztest oder im Phasenkontrast sichtbar. Freie Sporen, die nicht mit Makrophagen assoziiert waren, konnten nur in Ausnahmefällen beobachtet werden. Die Keimfähigkeit aller untersuchten Stämme in RPMI-Medium mit fötalem Kälberserum wurde in Vorversuchen bestätigt.

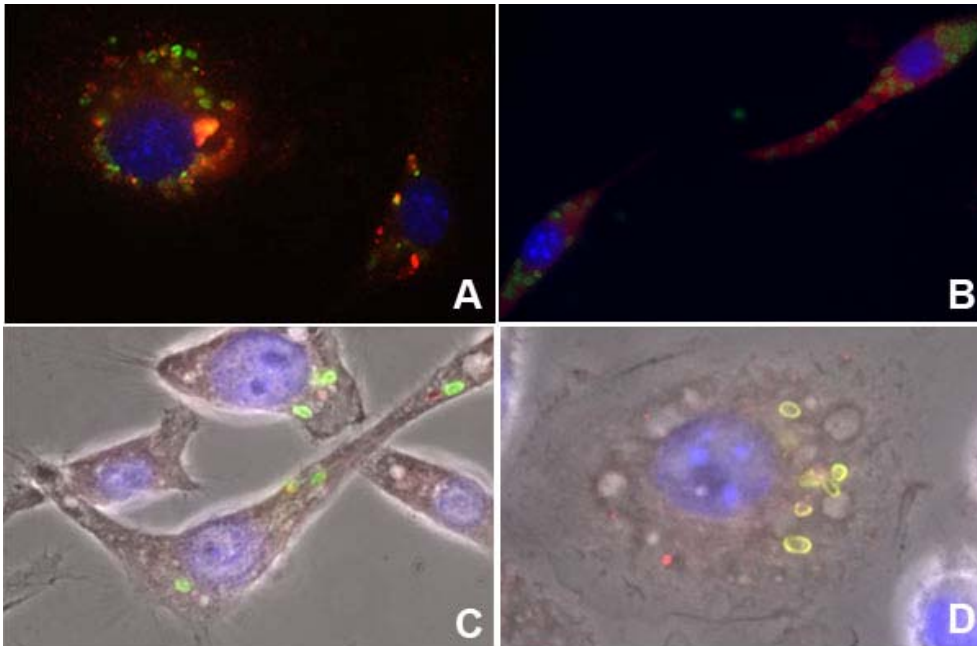
Wurden RAW 264.7-Zellen mit *B. anthracis* UDIII-7 oder Vollum infiziert, so konnten nach sechs Stunden Inkubationszeit in ca. 25 bis 30 % der Makrophagen vegetative Bakterien nachgewiesen werden, die einzeln oder in kurzen Ketten vorlagen. Die restlichen Makrophagen enthielten unverändert Sporen. Als intrazellulär wurden dabei alle Bakterien gewertet, die unterhalb der Oberflächenebene des Makrophagenkörpers lagen, und sich über mehrere Fokusebenen um den Zellkern herum erstreckten. Abbildung 27 zeigt die Aufnahmen von mit *B. anthracis* infizierten Makrophagen nach 90 min und 90 min plus sechs Stunden Inkubationszeit.



**Abbildung 27: Nachweis von *B. anthracis* nach Infektion von Makrophagen**

Nachweis von *B. anthracis* UDIII-7 (A, C) und Vollum (B, D) in RAW 264.7-Zellen nach Infektion mit Sporen. A + B: nach 60 min Phagozytosezeit und 30 min Einwirkzeit von Gentamycin. C + D: nach 60 min Phagozytosezeit und 30 min Einwirkzeit von Gentamycin zusätzlich 6 Stunden Inkubation bei 37°C. A + B: Immunfluoreszenz mit mAB EG4-4 + gam-Alexa488 und pAb 3Ba18Poly + gar-Alexa594, C + D: Phasenkontrast

Wurden dagegen Makrophagen derselben Zelllinie mit Sporen von *B. thuringiensis* sv konkukian, *B. cereus* DSM 31 oder ATCC 10987 infiziert, konnten auch nach sechs Stunden Inkubationszeit keine vegetativen Bakterien in oder an Makrophagen gefunden werden. Lediglich die bereits nach 90 min aufgenommenen Sporen waren unverändert mittels Immunfluoreszenztest oder im Phasenkontrast nachweisbar. Auffällig war beim Dokumentieren der Ergebnisse allerdings die deutlich schlechtere Qualität der Zellen. Die Zahl der an den Deckgläschen auch nach dem Waschen und Fixieren anhaftenden Makrophagen war um etwa 50 % geringer als bei Präparationen, die mit *B. anthracis* durchgeführt wurden. Zahlreiche der verbliebenen Zellen waren stark vergrößert, hatten ihre typische spindelförmige Form verloren und besaßen große Vakuolen. Bei Infektion von Makrophagen mit *B. cereus* bv *anthracis* konnte analog zu Versuchen mit *B. cereus*- oder *B. thuringiensis*-Sporen keine Keimung und Bildung von vegetativen Bakterien nachgewiesen werden. Die Morphologie der Makrophagen nach dem Waschen und Fixieren war hier vergleichbar untypisch, auch wurde eine deutlich geringere Zellzahl auf den Deckgläschen beobachtet. Abbildung 28 zeigt die Aufnahmen von mit *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA infizierten Makrophagen.



**Abbildung 28: Nachweis von *B. cereus* bv *anthracis* nach Infektion von Makrophagen**

Nachweis von *B. cereus* bv *anthracis* CI (A, C) und CA (B, D) in RAW 264.7-Zellen nach Infektion mit Sporen. A + B: nach 60 min Phagozytosezeit und 30 min Einwirkzeit von Gentamycin. C + D: nach 60 min Phagozytosezeit und 30 min Einwirkzeit von Gentamycin zusätzlich 6 Stunden Inkubation bei 37°C. A + B: Immunfluoreszenz mit mAb EG4-4 + gam-Alexa488 und pAb 3Ba18Poly + gar-Alexa594, C + D: zusätzlich Phasenkontrast

Parallel zur Präparation der Infektionen auf Deckgläschen wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Lebendzellzahlbestimmungen der untersuchten Bakterienstämme durchgeführt. Mit ihrer Hilfe sollte eine eventuell auftretende Keimung der Sporen in den Makrophagen bestätigt werden. Nach Lyse der Sporen enthaltenden Makrophagen mit einem Detergenz wurde ein Aliquot jeden Ansatzes bei 65 °C für 30 min hitzeinaktiviert, das andere Aliquot blieb unbehandelt. Anhand der Differenz der KBE nach Ausplattieren auf LB-Agar sollte anschließend die Keimungsrate der Sporen ermittelt werden, da bereits gekeimte Sporen nach Hitzebehandlung nicht mehr lebensfähig sind. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse eines repräsentativen Infektionsversuchs ist der Tabelle 20 zu entnehmen. Gegenübergestellt sind hier die ermittelten Lebendzellzahlen der untersuchten Bakterienstämme *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA und *B. anthracis* UDIII-7 nach 90 min Phagozytosezeit und 90 min Phagozytosezeit plus weiteren sechs Stunden Inkubationszeit wie im Methodenteil beschrieben. Zuerst fällt hierbei auf, dass die Anzahl an ermittelten KBE zwischen den einzelnen Stämmen stark schwankt. So konnten von den zu Beginn eingesetzten  $2,0 \times 10^6$  Sporen/ml nach 90 min Phagozytosezeit und anschließendem Waschen bei *B. anthracis* UDIII-7 lediglich  $2,2 \times 10^3$  KBE/ml (ohne Hitzebehandlung), bzw.  $3,0 \times 10^3$  KBE/ml (mit Hitzebehandlung) rekultiviert werden. Im Gegensatz dazu ließen sich bei *B. cereus* bv *anthracis* CA alle eingesetzten Sporen nachweisen, bei CI lediglich ca.  $10^4$ /ml.

**Tabelle 20: Hitzeinaktivierungsversuche von mit Sporen infizierten Makrophagen**

Ergebnisse der KBE-Bestimmungen im Infektionsversuch von Sporen und RAW 264.7-Zellen mit (30 min 65°C) und ohne Hitzeinaktivierung.

	CI		CA		UDIII-7	
	o.H.	65°C	o.H.	65°C	o.H.	65°C
t <sub>0</sub>	2,6 x 10 <sup>4</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup>	1,7 x 10 <sup>6</sup>	1,3 x 10 <sup>6</sup>	2,2 x 10 <sup>3</sup>	3,0 x 10 <sup>3</sup>
t <sub>6</sub>	1,8 x 10 <sup>4</sup>	2,4 x 10 <sup>4</sup>	3,4 x 10 <sup>4</sup>	2,8 x 10 <sup>4</sup>	2,4 x 10 <sup>3</sup>	1,8 x 10 <sup>3</sup>

Angaben in KBE/ml; t<sub>0</sub> = nach 90 min Phagozytosezeit, t<sub>6</sub> = nach 90 min Phagozytosezeit und 6 weiteren Stunden Inkubation. o.H. = ohne Hitze

Betrachtet man die ermittelte Lebendzellzahl nach sechs Stunden Inkubation, so wird eine ähnlich große Schwankung der Ergebnisse deutlich. Während die Lebendzellzahl der kultivierbaren Bakterien von *B. cereus* bv *anthracis* CI nur in etwa um die Hälfte abnahm und somit innerhalb derselben Zehnerpotenz blieb, sank sie bei CA in beiden Versuchsansätzen um jeweils das Hundertfache. Die Abnahme der Zahl an kultivierbaren Zellen wurde in diesem Fall nicht von einer Hitzebehandlung bei 65 °C beeinflusst. Demgegenüber gab es beim unbehandelten Infektionsversuch mit *B. anthracis* UDIII-7 keinen Unterschied in der Lebendzellzahl der Bakterien nach sechs Stunden zusammen mit Makrophagen. Die Zahl der anschließend bei 65 °C inkubierten Versuchsparallele sank dagegen um etwa die Hälfte. Eine Wiederholung der Infektionsversuche unter gleichen Bedingungen bestätigte die gewonnenen Ergebnisse, die durch KBE-Bestimmung ermittelten Lebendzellzahlen der einzelnen Stämme schwankten minimal innerhalb der gleichen Zehnerpotenz. Zusätzlich durchgeführte Hitzeinaktivierungsversuche mit *B. anthracis* Vollum ergaben in keinem der drei durchgeführten Ansätze verwertbare Ergebnisse. Ob dies auf methodische Artefakte zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden.

## 6. Diskussion

*B. anthracis*, der Erreger des Milzbrandes, ist global verbreitet und verursacht eine der ältesten Zoonosen der Welt. Er ist in der Lage, alle Säugetiere inklusive des Menschen zu infizieren, auch wenn Milzbrand in erster Linie eine Krankheit unter Herbivoren darstellt. Im Gegensatz zu Infektionen mit anderen eng verwandten Spezies der *B. cereus*-Gruppe verläuft eine Milzbranderkrankung meist tödlich, wenn sie nicht rechtzeitig mit Antibiotika behandelt wird. Dies unterscheidet *B. anthracis* von engen Verwandten wie *B. cereus* oder *B. thuringiensis*, die zwar in der Lage sind, nosokomiale Infektionen oder Lebensmittelvergiftungen hervorzurufen, jedoch kaum das Potential für größere Ausbruchsgeschehen oder lebensgefährliche Erkrankungen besitzen. Unter anderem aus diesem Grund werden Vertreter von *B. anthracis* in die biologische RG 3 eingeordnet, was den Umgang mit den Bakterien nur unter strengen Sicherheitsmaßnahmen möglich macht. *B. cereus* wird in die biologische RG 2 eingeordnet und gilt somit als weniger gefährlich für den Menschen. Trotzdem gibt es zahlreiche Fälle schwerer Verläufe von durch diesen Keim verursachten gastrointestinalen Erkrankungen bei immunsupprimierten und auch gesunden Menschen (223). Allerdings wurden in der Vergangenheit auch untypisch pathogene Vertreter von *B. cereus* beschrieben, die Anthrax-ähnliche Erkrankungen hervorrufen können (102,104,140). Eine eindeutige diagnostische Identifizierung verschiedener Vertreter der *B. cereus*-Gruppe und ihre Abgrenzung untereinander ist auch im Hinblick auf die potentielle Verwendung von *B. anthracis* als bioterroristisches Agens dringend notwendig. Spätestens seit den Anthrax-Briefen nach den Anschlägen vom 11. September 2001 in den USA gilt der Weiterentwicklung schneller, sensitiver Nachweismethoden weltweit größte Aufmerksamkeit. In der vorliegenden Arbeit sollten zwei untypisch pathogene Vertreter der *B. cereus*-Gruppe näher charakterisiert werden, die zunächst als *B. anthracis* identifiziert wurden (140,142) und mittlerweile als *B. cereus* bv *anthracis* bezeichnet werden (126). Die Isolate aus Menschenaffen, die an Milzbrand-ähnlichen Erkrankungen verstorben sind, sollten hinsichtlich ihrer Virulenz und der Regulation der Virulenzfaktoren genauer untersucht werden. Dabei sollte auch geprüft werden, welchen Einfluss verschiedene Umweltfaktoren und Wachstumsbedingungen auf die Regulationsmechanismen der Bakterien haben. In die Untersuchungen wurden auch vier Subklone der Primärisolate CI (von der Elfenbeinküste) und CA (aus Kamerun) mit einbezogen, die nach wiederholter Subkultivierung entstanden sind. Die Subklone CI-1 und CI-12 weisen eine vom Primärisolat abweichenden Koloniemorphologie auf, sie wachsen mit deutlich kleineren Kolonien, zeigen im Gegensatz zum Primärisolat CI auf Blutagar eine ausgeprägte  $\beta$ -Hämolyse und Subklon CI-12 ist nicht in der Lage, Endosporen zu bilden. Die Subklone CI-18 und CA-5 unterscheiden sich morphologisch nicht von ihren Elternstämmen, haben aber das Plasmid pXO2 verloren, auf

dem die Gene für die Polyglutaminsäurekapsel und der Regulator AcpA codiert sind. Dies konnte sowohl mittels PCR als auch im Immunfluoreszenztest bestätigt werden.

Die afrikanischen *Bacillus*-Isolate wurden hinsichtlich der Produktion von Toxinen, Kapsel und verschiedenen abbauenden Enzymen untersucht. Um die Virulenzmechanismen auf unterschiedlichen Ebenen der Regulation nachvollziehen zu können, wurden neben Genexpressionsanalysen der beteiligten Zielgene auch Versuche durchgeführt, in denen die einzelnen Toxinkomponenten und die Kapsel aus Kulturüberständen und bakteriellem Zellmaterial nachgewiesen und zum Teil quantifiziert wurden. Auch die Funktionsfähigkeit der Virulenzfaktoren wurde in vitro im Zellkulturmodell mit verschiedenen Zelllinien anhand von Zytotoxizitätstests und Keimungsversuchen untersucht.

Die Ergebnisse der Charakterisierung aller untersuchten Stämme wurden zum Vergleich den Ergebnissen von jeweils zwei in die Untersuchungen einbezogenen Vertretern von *B. anthracis*, *B. cereus* und denen eines Stamms, der als *B. thuringiensis* klassifiziert wurde, gegenübergestellt. Durch den direkten Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sollte in der vorliegenden Arbeit möglichst ein Gesamtbild erstellt werden, welches Hinweise auf eine weitere verwandtschaftliche Einordnung von *B. cereus* *bv anthracis* in die *B. cereus*-Gruppe sowie die Herkunft und Entstehung dieser ungewöhnlichen Stämme geben kann.

## 6.1 Mikrobiologische Eigenschaften von *B. cereus* *bv anthracis*

Um *B. anthracis* labordiagnostisch zu bestimmen und von anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe abgrenzen zu können, empfehlen die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) und die CDC einige relativ einfach durchzuführende mikrobiologische Tests. Im Gegensatz zu *B. cereus* und *B. thuringiensis* ist *B. anthracis* dabei unbeweglich, wächst auf Blutagar ohne  $\beta$ -Hämolyse und ist sensitiv gegenüber dem diagnostischen  $\gamma$ -Phagen und dem Antibiotikum Penicillin G. Allerdings wurden auch schon Vertreter von *B. cereus* und *B. anthracis* beschrieben, die mit diesen Methoden allein nicht eindeutig diagnostiziert werden können (127). Somit sollte zur gesicherten Charakterisierung von Stämmen der *B. cereus*-Gruppe immer auch eine parallele molekulargenetische Untersuchung mittels PCR durchgeführt werden. In der Real Time-PCR können dabei *B. anthracis*-spezifische Genmarker nachgewiesen werden, die auf den Virulenzplasmiden pXO1 und pXO2 lokalisiert sind.

Die von der Elfenbeinküste und aus Kamerun stammenden Primärisolate *B. cereus* *bv anthracis* CI und CA wurden kurz nach Entdeckung der Affenkadaver mittels Real Time-PCR als *B. anthracis* aus verschiedenen Organproben identifiziert (141). Die Plasmid-Marker *capC* und *pagA*, sowie der chromosomale Marker *rpoB* ergaben hier positive PCR-Signale und bestätigten so die mikroskopischen Untersuchungsergebnisse, die in allen untersuchten



Organen Gram-positive Stäbchen zeigten (140). Weiterführende Untersuchungen der Primärisolate und ihrer Subklone zeigten in der vorliegenden Arbeit keine eindeutigen Ergebnisse für die von der WHO und CDC empfohlenen mikrobiologischen Untersuchungen (128). Zwar sind alle sechs *B. cereus* bv *anthracis*-Stämme negativ im  $\gamma$ -Phagen-Test und beweglich im hängenden Tropfen, was sie als Vertreter von *B. cereus* oder *B. thuringiensis* einstufen würde, die Kultivierung auf verschiedenen chromogenen Selektivagar wie z.B. Cereus-Ident, mit dem die Aktivität der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) nachgewiesen werden kann, würde aber alle sechs Stämme als *B. anthracis* diagnostizieren. Bei Wachstum auf diesem Agar ist keinerlei Enzymaktivität nachweisbar, was an der weißen Färbung der Kolonien sichtbar ist (siehe Abb. 8, S. 52). Auch eine Anzucht auf Cereus-Selektiv-Agar, mit dem die Lecithinase-Aktivität aufgezeigt werden kann, würde bei allen sechs getesteten Stämmen auf Vertreter von *B. anthracis* hinweisen. Die Kolonien wachsen im Gegensatz zu *B. cereus* mit nur schwacher Präzipitatbildung, was auf eine nur geringe Lecithinaseaktivität hindeutet, wie sie bei *B. anthracis* vorhanden ist.

Die Unbeweglichkeit typischer *B. anthracis*-Stämme ist höchstwahrscheinlich daraus zurückzuführen, dass zehn bekannte Motilitäts- und Chemotaxis-assoziierte Gene durch Mutationen inaktiv sind (203). Bei *B. cereus* bv *anthracis* CI sind diese Gene jedoch intakt (126), was zur Beweglichkeit der Stämme führt, wie sie im hängenden Tropfen beobachtet wurde. Die betroffenen Sequenzen der anderen afrikanischen Isolate sind nicht bekannt, da alle Stämme jedoch beweglich sind, sind die jeweiligen Sequenzen vermutlich identisch.

Bei Kultivierung auf Columbia-Blutagar zeigt sich ein heterogenes Bild der Ergebnisse der Primärisolate und Subklone. Die Elternstämme CI und CA und die Subklone CI-18 und CA-5 zeigen auf Blutagar ebenso wie *B. anthracis* keinerlei Hämolyse. Die nach wiederholter Kultivierung spontan aufgetretenen Subklone CI-1 und CI-12 wachsen allerdings auf Blutagar mit deutlich ausgeprägter  $\beta$ -Hämolyse (siehe Abb. 10, S. 53). Die Lyse der im Agar enthaltenen Erythrozyten wird dabei durch Toxine verursacht, die in der Lage sind, Zellmembranen zu perforieren. Einige dieser Proteine sind *plcR*-reguliert, andere, wie beispielsweise Hämolsin II, werden nicht durch *plcR* beeinflusst.

Aus welchen Gründen eine solche Änderung des Phänotyps nach Subkultivierung entstehen kann, soll im weiteren Verlauf dieses Kapitels der vorliegenden Arbeit näher erörtert werden. So wird zum einen auf die Genexpressionsanalysen näher eingegangen, zum anderen sollen die *plcR*-regulierten Virulenzfaktoren betrachtet werden.

## 6.2 Sporulation bei *B. cereus* bv *anthracis*

Zur mikroskopischen Untersuchung der Stämme von *B. cereus* bv *anthracis* wurden Gram- und Rakette-Färbungen unterschiedlichen Kulturmateriale angefertigt. Die Gram-Färbung ermöglicht eine Unterscheidung von Bakterien je nach Aufbau ihrer Zellwand in zwei große

Gruppen, die Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Sie wurde bereits 1884 vom dänischen Arzt Hans Christian Gram entwickelt und ist bis heute eine der am häufigsten verwendeten diagnostischen Anfärbemethoden (167). Die Gram-positiven, schlanken Stäbchen von *B. anthracis* bilden in Kultur lange Ketten und können so von anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe unterschieden werden, die meist als einzelne, eher gedrungene Stäbchen oder kurze Ketten von nur wenigen Zellen vorliegen. Abbildung 11 (S. 54, D – F) zeigt die Gram-Färbungen von *B. cereus* bv *anthracis* CI, CA und *B. anthracis* UDIII-7 nach viereinhalb Stunden Wachstum in LB-Flüssigmedium, die morphologisch kaum zu unterscheiden sind. Es fällt allerdings auf, dass bei *B. cereus* bv *anthracis* CA (Abb. 11 E) aufgehellte Bereiche in einigen vegetativen Zellen zu beobachten sind, die bereits vorhandene Sporen darstellen. Sie liegen als Endosporen vor, die den Körper der vegetativen Zelle nicht aufblähen. Da alle Kulturen für die Färbepreparate gleich alt waren und eine Probenentnahme zum selben Zeitpunkt stattfand, ist davon auszugehen, dass *B. cereus* bv *anthracis* CA schneller versport als sein Verwandter von der Elfenbeinküste und andere Vertreter von *B. anthracis*.

Die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls durchgeführten Rakette-Färbungen dienten der spezifischen Anfärbung von freigesetzten Endosporen. Die von *B. cereus* bv *anthracis*, *B. cereus* und *B. anthracis* gebildeten Endosporen unterscheiden sich morphologisch kaum voneinander (vgl. Abb. 11 A – C). Im Rahmen der Herstellung von Sporensuspensionen und Sporulationsversuchen wurden alle afrikanischen *Bacillus*-Isolate in Medium G angezogen, das die Sporulation von *B. anthracis* innerhalb weniger Tage verursacht (125). Um den Grad der Versporung zu bestimmen, wurden Rakette-Färbungen der Kulturen nach fünf Tagen Inkubation in Medium G angefertigt. Beide untersuchten *B. anthracis*- und *B. cereus*-Stämme, *B. thuringiensis* sv konkukian, sowie *B. cereus* bv *anthracis* CI, CA, CI-1, CI-18 und CA-5 waren zu diesem Zeitpunkt fast vollständig versport. Einzig im Präparat von Subklon CI-12 waren keinerlei Sporen nachzuweisen. Auch drei weitere Tage Inkubation in Medium G ergaben keine sichtbaren Sporen. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden auch Hitzeinaktivierungsversuche durchgeführt. Nach 30-minütiger Inkubation eines Kulturaliquots von Subklon CI-12 bei 65 °C war nach Ausplattieren auf LB-Agar kein Koloniewachstum nachweisbar, was das Fehlen von Sporen in der Kultur bestätigte. Im Gegensatz dazu konnten bei allen anderen Sporenpräparationen der verwendeten Stämme nach Hitzebehandlung der Aliquots die gleiche Anzahl an KBE nach Ausstreichen auf Agar ermittelt werden, die auch ohne Behandlung bei 65 °C erzielt wurde, was auf vollständige Versporung schließen lässt.

Der Grund für die fehlende Sporulationsfähigkeit von *B. cereus* bv *anthracis* CI-12 könnte mit dem Sporulationsfaktor Sigma K zusammenhängen. Das kodierende Gen *sigK* ist bei allen *B. cereus* bv *anthracis*-Stämmen durch eine Insertionssequenz unterbrochen ((126) und S.

Klee, pers. Mitteilungen), die jedoch allen anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe fehlt (126). Eine solche Genkonfiguration liegt nur bei *B. subtilis*, der nicht zur *B. cereus*-Gruppe gehört, in einer ähnlichen Form vor. PCR-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphasen von Kulturen der afrikanischen *Bacillus*-Stämme haben gezeigt, dass diese Insertion während der stationären Phase ausgeschnitten wird und es so zur Zusammenfügung der beiden Teile des *sigK*-Gens kommt. Dieses wird anschließend exprimiert, der für die Sporulation essentielle Faktor Sigma K wird gebildet und es kommt schließlich zur Ausbildung von Endosporen. Bei *B. cereus* bv *anthracis* CI-12 wird die Insertion im *sigK*-Gen nicht ausgeschnitten. Die wahrscheinlich am Prozess beteiligte Rekombinase, die innerhalb der 22 kbp großen Insertionssequenz kodiert ist, ist zwar wie bei den anderen Isolaten auch bei Subklon CI-12 vorhanden (S. Klee, pers. Mitteilungen), jedoch kommt es weder in Sporulationsmedium noch bei andauernder Inkubation auf Agar zur Bildung von Sporen. Auch ein Nachweis des intakten *sigK* mittels PCR war nicht möglich, es konnten nur Produkte mit Primerpaaren für die beiden Teilsegmente des unterbrochenen Gens und die flankierenden Bereiche außerhalb von *sigK* nachgewiesen werden. Offensichtlich gibt es innerhalb der Sporulationskaskade eine Mutation oder veränderte Regulation, die dazu führt, dass die Insertion nicht ausgeschnitten wird. Ob diese Änderung jedoch bereits zu Beginn des Sporulationsprozesses oder erst zu einem späteren Zeitpunkt wirksam wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Um herauszufinden, ob die Sporulation von *B. cereus* bv *anthracis* CI-12 durch die Insertionssequenz verhindert wird, wäre das Einsetzen eines intakten *sigK*-Gens ohne Insertion ins Genom von CI-12 sinnvoll. Alternativ könnte auch die Insertion selbst aus dem Gen durch Ausschneiden entfernt werden. Bei *Clostridium difficile* ist das Vorhandensein der Insertion und ihr Herausschneiden für den Sporulationsprozess essentiell (94), es wäre somit interessant aufzuklären, ob dies auch bei *B. cereus* bv *anthracis* der Fall ist. Diese Versuche stellen allerdings gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 3 dar und sind mit hohem Zeitaufwand verbunden, so dass sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten.

### 6.3 Qualitative und quantitative Genexpressionsanalysen

Die Untersuchung der Genexpression diverser Zielgene von *B. cereus* bv *anthracis* und der Vergleich der Ergebnisse mit denen bekannter Vertreter von *B. anthracis*, *B. cereus* und *B. thuringiensis* war einer der Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit. Durch den Vergleich der einzelnen Expressionsraten unterschiedlicher Struktur- und Regulatorgene sollte die Frage geklärt werden, inwieweit die Regulation der untersuchten Virulenzfaktoren der afrikanischen *Bacillus*-Isolate auf DNA-Ebene der anderer Vertreter der *B. cereus*-Gruppe gleicht. Von besonderem Interesse war hierbei die Regulation der Toxinkomponenten PA, EF und LF,

sowie der Polyglutaminsäurekapsel, die von *B. anthracis* gebildet werden und die hohe Virulenz dieser Bakterien hervorrufen. Die afrikanischen Stämme CI und CA stellen eine Besonderheit dar, da sie die beiden Virulenzplasmide pXO1 und pXO2 tragen, deren Sequenzen annähernd 100 % identisch mit denen von *B. anthracis* sind ((126) und Klee, pers. Mitteilungen). Somit sollte untersucht werden, ob auch bei *B. cereus* bv *anthracis* ein Netzwerk aus regulatorischen Elementen zwischen den beiden Plasmiden und dem Chromosom besteht, wie es bei *B. anthracis* der Fall ist.

Um die Genexpression quantifizieren zu können, musste im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst ein Protokoll entwickelt werden, um mRNA aus bakteriellen Kulturen möglichst rein und in ausreichender Menge zu extrahieren. Nach Ausschleusen der RNA-Präparationen aus dem Sicherheitslabor ergaben die spektrophotometrischen Messungen für alle Proben einen Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm Wellenlänge zwischen 1,9 und 2,1. Dies entspricht einer sauberen RNA-Präparation ohne Kontamination durch Proteine, Alkohol oder Phenol. Eine Quantifizierung der RNA bei 260 nm war ebenfalls notwendig, da identische Mengen an gesamt-RNA in den nachfolgenden Behandlungsschritt mit DNase eingesetzt werden sollten, um die Ergebnisse der Quantifizierung miteinander vergleichen zu können. Anzumerken ist hierbei allerdings, dass mit der Konzentrationsmessung keinerlei Aussage über den mRNA-Gehalt in den jeweiligen Proben getroffen werden kann. Da die erhaltenen Konzentrationen an gesamt-RNA stark schwankten (siehe Tab. 23, S. 134 im Anhang), sich diese Schwankungen aber nicht gleichermaßen in den Expressionsergebnissen widerspiegeln, ist anzunehmen, dass der Bestandteil an mRNA in den Präparationen konstant gering ist und kaum von den unterschiedlich großen Mengen an gesamt-RNA beeinflusst wird. Den Hauptanteil der RNA im Eluat stellt rRNA dar, die 80 % der zellulären RNA bei Prokaryoten ausmacht (101). Je nach Effizienz der Aufspaltung der vegetativen Zellen schwankt der Gehalt an gesamt-RNA also deutlich stärker als der der mRNA. Ideal wäre die Anwendung eines Protokoll für eine gezielte mRNA-Aufreinigung, allerdings existieren nur wenige Methoden hierfür, die zusätzlich mit sehr hohem Aufwand verbunden sind (5) oder sich nur eingeschränkt für bestimmte Prokaryoten anwenden lassen (196,248). Ein einziges Produkt für ein breites Spektrum von Prokaryoten ist kommerziell erhältlich (MIKROBExpress™ Bacterial mRNA Enrichment Kit, Ambion, über Applied Biosystems, Darmstadt, D), mit dem eine Anreicherung von mRNA möglich ist (117,178). Allerdings ist hierzu neben den anfallenden hohen Kosten für das Aufreinigungskit selbst auch zusätzliches Gerät notwendig, das nicht zur Verfügung stand.

Bei Betrachtung der Tabellen 22 und 23 (S. 132 - 134 im Anhang) fällt auch auf, dass die Ergebnisse der Messungen der OD<sub>600</sub> einer Kultur, der dazugehörigen Lebendzellzahlbestimmung und der Messung der RNA-Konzentration nach erfolgter Extraktion nicht immer korrelieren. Dies lässt sich am Beispiel der Kulturen von *B. anthracis*

Vollum verdeutlichen, die für den dritten Extraktionsdurchlauf angezogen wurden. Die Kultur, die unter nicht-induzierenden Bedingungen in LB-Flüssigmedium inkubiert wurde, hatte nach viereinhalb Stunden Wachstum eine OD<sub>600</sub> von 2,226, während sie nach derselben Zeit in Rich-Medium mit Bikarbonat und CO<sub>2</sub> nur eine OD<sub>600</sub> von 0,751 hatte. Das bedeutet ein erwartungsgemäß verzögertes Wachstum unter CO<sub>2</sub>-Bikarbonat-Bedingungen, da die bakterielle Energieproduktion unter aeroben Wachstumsbedingungen generell effizienter abläuft, was sich in kürzeren Teilungsraten der vegetativen Zellen niederschlägt (177). Das verzögerte Wachstum von *B. anthracis* Vollum unter induzierenden Bedingungen zeigt sich auch bei der Lebendzellzahlbestimmung. Hier wurde für die LB-Kultur eine Zellzahl von  $1,9 \times 10^8$  KBE/ml ermittelt, während dieser Wert für die in Rich-Medium angezogene Kultur bei  $6,5 \times 10^7$  lag. Im Gegensatz zu den Zellzahlen verhalten sich aber die gemessenen RNA-Konzentrationen abweichend von diesen Ergebnissen. Die Kulturen von *B. anthracis* Vollum erbrachten nach Anzucht in LB-Medium 417,8 ng/μl gesamt-RNA, nach Anzucht in Rich-Medium aber 972,5 ng/μl, also mehr als doppelt so viel. Eine Erklärung hierfür könnte die Anzahl an Bakterien sein, die bei der Extraktion aufgespalten wurden. Möglicherweise ist die geringere Zellzahl von lediglich  $10^7$ /ml für die RNA-Extraktion effektiver als eine höhere Zellzahl. Die zur Reinigung verwendeten RNA-Bindungssäulen besitzen nur eine begrenzte Bindungskapazität, daher könnte eine zu große Menge an aufgereinigter gesamt-RNA zu behindernden Effekten führen, was den Wasch- oder Elutionsprozess am Ende des Extraktionsprotokolls beeinflusst. Generell ist für die Bewertung dieser Einflussgrößen zu erwähnen, dass keine Auswirkung der beschriebenen Effekte auf die vergleichenden Expressionsraten gezeigt werden konnten. Die mittels RT nachzuweisenden Sequenzfragmente der Zielgene sind so klein (vgl. Tab. 24, S. 135 im Anhang), dass von der ohnehin in der Präparation nur wenig vorhandenen mRNA wiederum nur ein äußerst geringer Anteil als Template für die Synthese der cDNA und die nachfolgenden Amplifikationsreaktionen dient. Diese kurzen mRNA-Fragmente sind bei quantitativen Analysen von Vorteil, da lange mRNA-Moleküle sehr anfällig für die Degradation durch RNasen oder falsche Lagerung sind (26,179,210).

Die nach der DNase-Behandlung erhaltene RNA-Lösung wurde vor weiterer Verwendung für die quantitative Expressionsanalyse stets zunächst auf DNA-Reste getestet, indem sie als Template sowohl in die RT-PCR als auch Real Time-RT-PCR für den Nachweis von *rpoB* und *gyrB* eingesetzt wurde. Erst wenn in beiden Reaktionen kein Amplifikationssignal nachweisbar war, galt die RNA-Präparation als frei von DNA und wurde weiter verwendet. Um die Handhabung der instabilen RNA auf möglichst wenige Arbeitsschritte zu beschränken, wurde darauf verzichtet, die RNA-Konzentration nach Behandlung mit DNase nochmals zu messen. Aufgrund der Nutzung kommerzieller RNA-Bindungssäulen bei der Aufreinigung war davon auszugehen, dass nur geringste Mengen an DNA als Kontamination

in den Präparationen vorlagen (12). Diese hätten zwar bei den nachfolgenden RT-PCRs für falsch-positive Amplifikationssignale sorgen können, aber nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Gesamtkonzentration der RNA-Präparation gehabt. Vorversuche, in denen Messungen der RNA-Konzentration vor und nach DNase-Behandlung innerhalb der Schwankungen von Doppelwertbestimmungen lagen, bestätigten diese Annahme.

### **6.3.1 Qualitativer Expressionsnachweis**

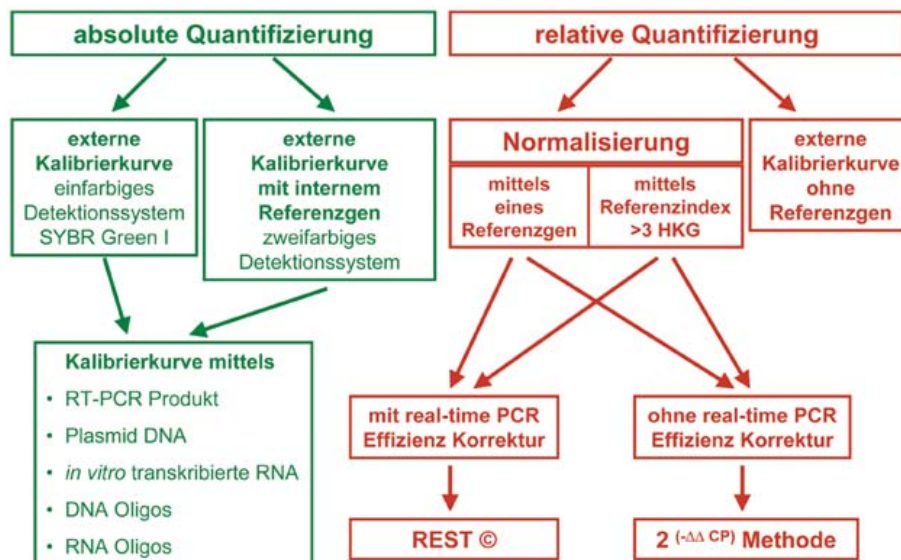
Da für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zielgene Assays für die RT- und Real-Time RT-PCR selbst entwickelt werden mussten, wurde ihre Funktionalität zunächst durch qualitativen Nachweis der Transkriptase-Reaktion überprüft. Es wurden einzelne Assays für die unterschiedlichen Gene verwendet, da Target-spezifische Primer die sensitivste Methode für das Umschreiben von mRNA in cDNA darstellen (143,172). Die Haushaltsgene *rpoB* und *gyrB* dienten bei allen Experimenten als Kontrollgene, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass alle untersuchten Stämme beide Gene unter induzierenden und nicht-induzierenden Anzuchtbedingungen konstant exprimieren. Konnte also bei einem der beiden Gene keine Expression nachgewiesen werden, wenn eine neue RNA-Präparation getestet wurde, so war davon auszugehen, dass die RNA in der Lösung nach Behandlung mit DNase beschädigt war, z. B. durch RNasen. In diesem Fall wurde die Präparation verworfen und erneut RNA aus frischen Kulturen isoliert.

Tabelle 16 (S. 59) zeigt die unterschiedlich stark ausgeprägten Amplifikationssignale der einzelnen untersuchten Zielgene, die die Funktionalität der verschiedenen Assays bestätigen, da ein Transkriptionsnachweis erfolgen konnte. Prinzipiell ist aber das Ablesen der Stärke eines Amplifikationssignals in einem Agarosegel problematisch, daher wurde die RT-PCR ausschließlich für den qualitativen Nachweis der Expression eines Gens verwendet und um die Funktionalität jedes Assays zu überprüfen.

### **6.3.2 Absolute Quantifizierung der Genexpression in der Real-Time RT-PCR durch Mitführen einer Standardkurve**

Die Real-Time RT-PCR stellt eine zuverlässige und exakte Methode zur Quantifizierung spezifischer mRNA dar. Sie ist hochsensitiv und kann routinemäßig innerhalb kürzester Zeit mit relativ geringem Arbeitsaufwand angewendet werden (27). In Echtzeit kann in der Real-Time PCR die Akkumulation der spezifischen DNA-Sequenz durch Amplifikation verfolgt werden (97). Die verschiedenen Strategien zur Quantifizierung mittels Real-Time RT-PCR können der nachfolgenden Abbildung 29 entnommen werden.

## Quantifizierungsstrategien in der real-time RT-PCR



**Abbildung 29: Quantifizierungsstrategien in der Real-Time RT-PCR**  
modifiziert nach Pfaffl (157)

In der vorliegenden Arbeit sollten die Expressionsraten von insgesamt sechs Vertretern von *B. cereus* *bv anthracis*, zwei Vertretern von *B. anthracis* und jeweils einem Vertreter von *B. cereus* und *B. thuringiensis* miteinander verglichen werden. Ein direkter Vergleich zwischen verschiedenen Stämmen ist dabei allerdings nur möglich, wenn für alle Stämme ein identischer Mix aus Primern und Sonde pro Zielgen verwendet werden kann. Andernfalls wären die Ergebnisse nicht miteinander vergleichbar, da jeder Assay eine individuelle Reaktionseffizienz besitzt (25). Sequenzanalysen der ausgewählten Zielgene ergaben, dass nicht für jedes Gen ein für alle Stämme geeigneter Real-Time-Reaktionsmix entwickelt werden kann. In manchen Sequenzabschnitten, auf die für die Amplifikationsreaktion am günstigsten Primer oder Sonde gelegt werden müssten, liegen bei den unterschiedlichen Spezies der Vertreter der *B. cereus*-Gruppe Punktmutationen. Diese könnten zu einer unterschiedlich starken Bindungsaffinität der Oligonukleotide an die jeweiligen Sequenzabschnitte führen, was den Assay unterschiedlich effektiv für die verschiedenen Spezies machen könnte. Aus diesem Grund wurden nur die Gene *rpoB*, *gyrB*, *capB*, *acpA*, *pagA*, *cya*, *plcA* und *sfp* in die quantitativen Expressionsanalysen einbezogen. Für diese Gene wurden Plasmidstandards hergestellt, mit deren Hilfe auch die Amplifikationseffizienz der einzelnen Assays überprüft wurde. Läge die Effizienz der Amplifikationsreaktion bei 100 %, so würde sich mit jedem Zyklus die DNA-Menge im Ansatz und damit das Fluoreszenzsignal verdoppeln (157). Ermittelt wird die Effizienz hierbei durch den sog. Ct-Wert (Threshold Cycle) der Reaktion, der den Schwellenwert angibt, bei dem zum ersten Mal ein Anstieg des Fluoreszenzsignals über die unspezifische Hintergrundstrahlung hinaus erfasst wird (72). Je höher dabei die Kopienzahl im Reaktionsansatz bei Beginn der Real-

Time PCR ist, desto niedriger ist der Ct-Wert. Bei einer maximalen Reaktionseffizienz von 100 % sinkt der Ct-Wert um 3,3 bei Erhöhung der Kopienzahl eines Zielgens um eine Zehnerpotenz. Mittels der seriellen Plasmidverdünnungsreihe kann somit die Effizienz der jeweiligen Assays und der PCR-Läufe bestimmt werden. Die Ergebnisse der Quantifizierung eines Real-Time RT-PCR-Laufes wurden nur dann in die Auswertung mit einbezogen, wenn die Effizienz der Amplifikationsreaktion eines Laufes bei mindestens 95 % lag, was einer Ct-Wert-Differenz von 3,14 bis 3,47 entsprach, da vergleichbare Effizienzen die Voraussetzung für die absolute Quantifizierung der Genexpression sind (221).

In Tabelle 17 (S. 61) sind die Ergebnisse der Kopiezahlbestimmung der cDNA der Gene *rpoB*, *gyrB*, *capB*, *acpA* und *pagA* in der Real-Time RT-PCR mittels Standardkurve zusammengefasst. Untersucht wurden die *B. anthracis*-Stämme UDIII-7 und Vollum und *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA nach Anzucht unter nicht-induzierenden und induzierenden Bedingungen. Die angegebenen Expressionssteigerungen zeigen deutlich eine stark unterschiedliche Ausprägung, bei *capB* ist bei allen vier untersuchten Stämmen dabei die stärkste Steigerung zu beobachten, wenn Bikarbonat und CO<sub>2</sub> vorhanden sind. Bei den beiden nicht-regulierten Kontrollgenen *rpoB* und *gyrB* sind die Unterschiede im cDNA-Gehalt der beiden Vergleichsproben aus unterschiedlichen Anzuchten geringer, sie liegen hier zwischen 1,9- und 5,2-fach (*gyrB*) und 0,3- und 2,9-fach (*rpoB*).

Diese Versuchsergebnisse lassen zunächst die Aussage zu, dass die Regulation der Expression der ausgewählten Zielgene bei *B. anthracis* und *B. cereus* bv *anthracis* vergleichbar ist. Die bei *B. anthracis* unter induzierenden Wachstumsbedingungen stärker exprimierten Gene für die Polyglutaminsäurekapsel, PA und den Kapselbiosynthese-Regulator AcpA werden auch bei den beiden afrikanischen *Bacillus*-Isolaten in Gegenwart von Bikarbonat und CO<sub>2</sub> verstärkt transkribiert. Allerdings zeigen die für *gyrB* und *rpoB* ermittelten Kopiezahlen pro Reaktion, dass die absolute Quantifizierung für die in der vorliegenden Arbeit zu beantwortende Fragestellung des Vergleichs der Expression unter verschiedenen Anzuchtbedingungen und zwischen mehreren Bakterienstämmen nicht unproblematisch ist. So werden bei dieser Auswertungsmethode die in die RNA-Extraktion eingesetzte Bakterienzahl oder die unterschiedlich hohe Konzentration an Ausgangs-RNA nach Anzucht in unterschiedlichen Medien nicht berücksichtigt. Der Gehalt an gesamt-RNA wird zwar für die Behandlung mit DNase auf eine einheitliche Konzentration eingestellt, da jedoch die Menge an mRNA im Ansatz nicht exakt bestimmt werden kann, bleibt hierbei stets ein Fehlerfaktor bestehen. Außerdem kann auch eine unterschiedliche Effizienz bei der RT-Reaktion einen Einfluss auf die Herstellung der cDNA haben, die bei der absoluten Quantifizierung nicht berücksichtigt wird (27). Im Idealfall sollte die ermittelte Kopiezahl von *rpoB* und *gyrB* im Reaktionsansatz unter beiden Anzuchtbedingungen annähernd gleich sein, jedoch schwankt sie bei fast allen Stämmen.



### 6.3.3 Relative Quantifizierung der Genexpression

Die exakte Analyse der Expression variabel regulierter Gene unterliegt verschiedenen Einflüssen, die bei der Auswertung der Versuchsergebnisse berücksichtigt werden müssen. Zuerst ist zu erwähnen, dass bei Expressionsanalysen die Qualität und Quantität des Ausgangsmaterials, also der gesamt-RNA-Präparation, von entscheidender Wichtigkeit für die nachfolgenden Ergebnisse ist. Mit RNA von hoher Qualität lassen sich deutlich niedrigere Ct-Werte in der Real-Time PCR erreichen als mit degradiert oder kontaminierter RNA (216). Somit kann bereits der erste Schritt der Untersuchung der Genexpression die Ergebnisse, ihre Reproduzierbarkeit und die daraus resultierenden Schlussfolgerungen stark beeinflussen (28).

In die Interpretation der Ergebnisse mit einzubeziehen ist auch die Tatsache, dass die Umschreibung von mRNA in cDNA einen limitierender Faktor bei Genexpressionsanalysen darstellt (27). So ist die Effizienz der Reaktion von der Verfügbarkeit des mRNA-Templates abhängig und deutlich verringert, wenn nur wenige Kopien der umzuschreibenden mRNA im Reaktionsansatz vorliegen (47,119). Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression eines Gens gemessen und entweder auf einen externen Standard oder eine Referenzprobe bezogen (250), die auch als Kalibrator bezeichnet wird (149). In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzprobe das in der *B. cereus*-Gruppe ubiquitär und homogen exprimierte Haushaltsgen *rpoB* ausgewählt. In Vorversuchen konnte hierfür eine vergleichbare Expression von *rpoB* bei allen verwendeten Bakterienstämmen unter nicht-induzierenden und induzierenden Anzuchtbedingungen bestätigt werden, ebenso wie für das homogen exprimierte *gyrB* (56). Zahlreiche Publikationen der letzten Jahre beschäftigen sich mit dem Umstand, dass eben diese Bestätigung der fehlenden Regulation von größter Wichtigkeit ist, da auch lange als nicht-reguliert betrachtete Haushaltsgene wie  $\beta$ -Actin, GAPDH oder 18S rRNA unter definierten Bedingungen einer Regulation unterliegen können (81,108,208,227,252).

Durch die Normalisierung gegen das Referenzgen wird in der auf die reverse Transkription folgenden Real-Time PCR nicht die eigentliche Kopienzahl des Zielgens im Reaktionsansatz bestimmt, sondern die nachgewiesenen Produkte werden relativ auf das Referenzgen bezogen. Somit wird letztlich eine Expressionsrate bestimmt. Diese Normalisierung bewirkt die Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da die bereits beschriebenen Einflussgrößen wie unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen oder Fehler bei der RT-Reaktion innerhalb einer Probe nicht nur das Zielgen, sondern auch das Kontrollgen betreffen (157). Voraussetzung für die Anwendung der relativen Quantifizierung der Genexpression und die Bestimmung der Expressionsraten ist eine vergleichbare Amplifikationseffizienz (149), die bei jedem Real-Time PCR-Lauf kontrolliert wurde. Die Analyse der Daten der Quantifizierung der cDNA mittels ABI 7500 nach der sog.  $\Delta\Delta$ Ct-

Methode ergaben, dass die Regulation der Expression der bei *B. anthracis* und *B. cereus* *bv anthracis* auf pXO2 lokalisierten Gene *capB* und *acpA* vergleichbar ist (vgl. Abb. 14, S. 63). Beide Gene werden bei allen sechs untersuchten Stämmen mit Kapselplasmid unter induzierenden Anzuchtbedingungen deutlich stärker exprimiert, wobei dieser Effekt sowohl bei den beiden *B. anthracis*-Vertretern als auch bei den afrikanischen *Bacillus*-Isolaten und den Subklonen CI-1 und CI-12 bei *capB* deutlich stärker ausgeprägt ist als bei *acpA* (56). Möglicherweise ist diese Tatsache darauf zurückzuführen, dass *capB* im Gegensatz zu *acpA* zwei Promotorregionen besitzt, die in Gegenwart von CO<sub>2</sub> und Bikarbonat aktiviert werden (151). Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse decken sich somit mit den Ergebnissen des qualitativen Expressionsnachweises im Agarosegel (vgl. Tab. 16, S. 59) und der absoluten Quantifizierung der Expression mittels Standardkurve (vgl. Tab. 17, S. 61), wobei hier die Expressionssteigerungen nach Normierung gegen *rpoB* bei allen getesteten Stämmen geringer ausfallen. Die Ergebnisse der Expressionanalysen der Toxingene *pagA* und *cya*, die beide auf pXO1 lokalisiert sind, zeigen ein weniger einheitliches Bild. *B. anthracis* UDIII-7 und Vollum exprimieren *pagA* in Gegenwart von CO<sub>2</sub> und Bikarbonat 7-, bzw. 14-fach stärker als unter nicht-induzierenden Bedingungen und damit etwa auf dem gleichen Niveau wie *acpA*, was bereits zuvor für *B. anthracis* Sterne beschrieben wurde (177). Bei den Primärisolaten *B. cereus* *bv anthracis* CI und CA, sowie den Subklonen CI-12 und CI-18 ist dagegen kaum ein Unterschied in der Expression unter beiden Anzuchtbedingungen nachweisbar. Demgegenüber ist *pagA* bei CI-1 24-fach und bei CA-5 sogar deutlich über 100-fach stärker exprimiert, wenn mittels Anzuchtmedium wirtsähnliche Bedingungen simuliert werden. Die Gründe hierfür bleiben unklar, allerdings könnte eine mögliche Erklärung in den zwei unterschiedlichen Transkriptionsstartstellen von *pagA* liegen, von denen eine CO<sub>2</sub>-induziert ist, während die zweite für eine konstitutive Expression des Gens verantwortlich ist (56,132). Transkriptionsanalysen der beiden Startstellen könnten Hinweise darauf liefern, ob sie möglicherweise bei den verschiedenen Stämmen unterschiedlich stark abgelesen werden.

Ein interessante Beobachtung ist außerdem, dass sich die Expressionsraten von *pagA* bei CI-1 und vor allem CA-5 so stark von den Ergebnissen des qualitativen Expressionsnachweises abheben, bei dem kein klarer Unterschied zwischen beiden Versuchsbedingungen gezeigt werden konnte. Auch die Ermittlung der Expressionsraten von *cya* erbrachten überraschende Ergebnisse. Bei keinem der untersuchten Vertreter von *B. anthracis* oder *B. cereus* *bv anthracis* konnte eine erhöhte Expression des EF-kodierenden Gens unter induzierenden Anzuchtbedingungen nachgewiesen werden. Damit werden die Ergebnisse des Expressionsnachweises mittels RT-PCR und Agarosegel bestätigt, wo ebenfalls keine unterschiedlich stark ausgeprägten Amplifikationsprodukte detektierbar waren. Stattdessen ergab die relative Quantifizierung bei fünf von acht getesteten *Bacillus*-

Stämmen eine gering höhere Expression unter nicht-induzierenden Bedingungen nach Anzucht in LB-Flüssigmedium in Gegenwart von atmosphärischem Sauerstoff, darunter auch *B. anthracis* UDIII-7. In der Fachliteratur sind kaum Details der Regulationsmechanismen der Toxingene bei *B. anthracis* zu finden. Generell bekannt ist, dass der größte Teil der Regulation auf Transkriptionsebene stattfindet und in Gegenwart von CO<sub>2</sub> und Bikarbonat um bis zu 60-fach erhöht ist (8,33,217), jedoch sind bis heute keine exakten Details über die molekularen Abläufe aufgedeckt worden (186). Dass der globale Regulator AtxA, der nur bei *B. anthracis*, *B. cereus* bv *anthracis* und einigen wenigen *B. cereus*-Stämmen mit einem pXO1-ähnlichem Plasmid vorhanden ist (66), eine zentrale Rolle in der Regulation der Toxin- und Kapselgene spielt, konnte bereits vor vielen Jahren bestätigt werden. Dennoch bleiben bis heute die meisten Fragen zur CO<sub>2</sub>- und Bikarbonat-induzierten Regulation der Anthrax-Toxingene offen.

Zusätzlich zu den durch CO<sub>2</sub> und Bikarbonat induzierbaren Genen wurde die Expression der *plcR*-regulierten Gene *sfp* und *plcA* untersucht. Bei diesen beiden Zielgenen sollte aber nicht die Transkription nach Wachstum unter verschiedenen Bedingungen näher betrachtet werden. Stattdessen war hierbei der Vergleich der Expression der Gene bei den *Bacillus*-Stämmen mit einer Mutation im *plcR*-Gen mit der Genexpression bei *B. thuringiensis* sv konkukian von Interesse. Da die beiden ausgewählten Gene bei *B. anthracis* am stärksten unter aeroben Bedingungen exprimiert werden (130), wurden in der vorliegenden Arbeit nur die Anzuchten unter nicht-induzierenden Bedingungen vergleichend analysiert.

Abbildung 15 (S. 64) kann man entnehmen, dass die Expression des Serin-Protease-kodierenden Gens *sfp* und des PI-PLC kodierenden *plcA* bei allen Stämmen bis auf CI-12 und CA-5 mindestens 200-fach, bzw. bis zu über 400-fach geringer ist als beim Kalibratorstamm *B. thuringiensis*. Die Expressionsraten beider Gene bestätigen somit die Inaktivität des Regulators *plcR*, der bei *B. thuringiensis* sv konkukian aktiv ist. Allerdings sind beide Gene bei *B. cereus* bv *anthracis* CI-12 und CA-5 im Gegensatz zu allen anderen gestesteten Stämmen lediglich 16- bis 32-fach geringer exprimiert als bei *B. thuringiensis*. Die stärkere Expression der beiden abbauenden Enzyme könnte bei Subklon CI-12 die auf Blutagar auftretende Hämolyse erklären, allerdings bliebe hierbei die Frage offen, weshalb Subklon CA-5 nicht auch hämolytisch ist. Die verstärkte Expression von *plcA* stellt ein überraschendes Ergebnis dar, da Anzuchten der beiden Subklone auf Cereus Ident-Agar keinerlei Aktivität der PI-PLC zeigen, was auch durch Western Blot-Analyse von Kulturüberständen bestätigt werden konnte (siehe 6.7). Somit scheint auch die im Gegensatz zu den Primärisolaten verstärkte Expression von *plcA* bei den Subklonen CI-12 und CA-5 nicht zu einem funktionsfähigen Protein zu führen.

Bei der kritischen Bewertung der quantitativen Genexpressionsanalyse durch Normierung gegen ein Haushaltsgen sollte nicht unerwähnt bleiben, dass auch diese Methode nicht

uneingeschränkt geeignet ist, um die Expressionsraten von bakteriellen Kulturen zu bestimmen. Durch verschiedene Anzuchtbedingungen und damit verbundene unterschiedliche Wachstumsphasen werden bei Anwendung dieser Methode die Expressionsraten von verschiedenen Stämmen miteinander verglichen. Um die Wirkung all dieser Einflussgrößen auf die Ergebnisse möglichst gering zu halten, sollte im Idealfall stets mehr als ein Referenzgen für die Normalisierung der Expressionsdaten eines Zielgens verwendet werden (81). Anhand eines aus mindestens drei Genen ermittelten Referenzindex kann so eine noch exaktere Normalisierung erfolgen (vgl. Abb. 29, S. 90) (157). Aus zeitlichen Gründen musste aber in der vorliegenden Arbeit auf diese Auswertungsmethode verzichtet werden und es wurde nur das Referenzgen *rpoB* für die Normalisierung ausgewählt. Zur Absicherung der erhaltenen Expressionsraten wurde allerdings die Expression aller Zielgene auch gegen *gyrB* normalisiert, was jedoch zu vergleichbaren Ergebnissen führte (Daten nicht gezeigt).

Ebenfalls als kritisch zu bewerten sind die unterschiedlichen Zeitpunkte der Probennahme der bakteriellen Kulturen im Hinblick auf die Wachstumsphasen der einzelnen Kulturen. Zwar wurde zu Beginn der Kultivierung der Stämme eine einheitliche Kultur-OD eingestellt, jedoch zeigten einzelne Kulturen zum Zeitpunkt der Probennahme für die RNA-Extraktion nach 4,5 Stunden ein deutlich verzögertes Wachstum, insbesondere in Rich-Medium mit Bikarbonat und CO<sub>2</sub> (vgl. Tab. 22, S. 132-133). Aus labororganisatorischen Gründen war es nicht möglich, die einzelnen Kulturen je nach Erreichen der verschiedenen Wachstumsphasen einzeln zu bearbeiten. Dies hat jedoch zur Folge, dass Wachstumsphasen-abhängige Regulationsmechanismen wie die Repression der Toxingene durch den Regulator *abrB* (200) bei der Expressionsanalyse nicht berücksichtigt wurden.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Genexpression die Aussage zu, dass *B. cereus* bv *anthracis* grundsätzlich mit *B. anthracis* vergleichbare Regulationsmechanismen der Virulenzfaktoren besitzt, auch wenn einzelne Subklone leichte Unterschiede aufzeigen.

## 6.4 Toxine

Die von *B. anthracis* gebildeten Toxinkomponenten PA, EF und LF bilden in Kombination neben der Polyglutaminsäurekapsel die essentiellen Virulenzfaktoren, die für die hochgradige Letalität der Anthrax-Infektion verantwortlich sind. Neben *B. anthracis* besitzen außer den afrikanischen *Bacillus*-Isolaten lediglich drei weitere *B. cereus*-Stämme das pXO1-Plasmid inklusive der Toxingene und ihrer Regulatoren (134). Auch diese drei Stämme verursachen beim Menschen schwere Lungenerkrankungen mit Anthrax-ähnlichem Krankheitsbild (102,104). In der vorliegenden Arbeit wurde genauer untersucht, ob und in welchem Umfang *B. cereus* bv *anthracis* CI, CA und ihre Subklone die durch *pagA*, *cya* und

lef kodierten Toxinkomponenten produzieren, nachdem ein PA-Nachweis bei *B. cereus* bv *anthracis* CI im Western Blot bereits erfolgen konnte (128). Zu diesem Zweck wurden zunächst Kulturüberstände hergestellt, indem LB-Flüssigmedium und Rich-Medium mit Natriumbikarbonat mit Bakterien inokuliert wurden. Nach 20 bis 24 Stunden Wachstum der Kulturen bei atmosphärischem Sauerstoff, bzw. 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Kulturüberstände durch Zentrifugation und anschließender Sterilfiltration geerntet. Der qualitative Nachweis der Toxinkomponenten fand mittels Coomassie-Blau und im Immunoblot statt, zusätzlich wurde im capture-ELISA die Konzentration von PA, EF und LF ermittelt.

Im Coomassie-Gel wurden die in den Kulturüberständen enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend unspezifisch angefärbt. Abbildung 16 (S. 66) zeigt die Aufnahmen der beiden Gele mit Überständen nach Anzucht in LB-Flüssigmedium (links) und Rich-Medium (rechts). In keinem der aufgetragenen Überstände, die nach Anzucht unter nicht-induzierenden Bedingungen gewonnen wurden, ließ sich Proteinmaterial nachweisen. Im Gegensatz dazu ließen sich bei der Analyse von Bakterienpellets, die ebenfalls im Coomassie-Gel untersucht wurden, zwar Proteine nachweisen, diese laufen bei der Gelelektrophorese allerdings nur als undefinierte, hochmolekulare Fraktion über 150 kDa (Daten nicht gezeigt). Nach Anzucht unter induzierenden Wachstumsbedingungen lassen sich nur beim Primärisolat *B. cereus* bv *anthracis* CI und den Subklonen CI-1, CI-18 und CA-5 Proteinbanden von ca. 90 kDa finden, in denen die gesuchten Toxinkomponenten enthalten sein können. Eine Untersuchung der der Kultur entstammenden Bakterienpellets zeigte hierbei bei allen Proben ebenfalls die hochmolekulare Proteinfraction (Daten nicht gezeigt). Das Ausschleusen von Proteinen aus der bakteriellen Zelle ins umgebende Medium findet über den Transport durch die Zellmembran statt. Das daran beteiligte Sekretionssystem SecA2 ist bei *B. anthracis* und anderen Gram-positiven Erregern für den Export spezifischer Teilmengen an Proteinen verantwortlich, die mit der Pathogenität der Erreger assoziiert sind (95,193). Bei *B. cereus* bv *anthracis* CI ist der *secA2*-Lokus im Genom identisch zu dem von *B. anthracis* organisiert und die Proteinsequenzen zeigen eine rund 99 %-ige Übereinstimmung (126). Es ist daher anzunehmen, dass ein vergleichbares sekretorisches System bei allen untersuchten Stämmen vorhanden ist, was durch die Ergebnisse des Proteinnachweises im Kulturüberstand und vegetativen Bakterienzellen unterstützt wird (siehe auch 6.4.1).

Abschließend lässt sich aus den Coomassie-gefärbten Proteingelen generell schließen, dass bei *B. anthracis* und *B. cereus* bv *anthracis* auch unter Toxin-induzierenden Anzuchtbedingungen nur geringe Mengen der gesuchten Komponenten PA, EF und LF im Kulturüberstand vorhanden sind.

### 6.4.1 Qualitativer Nachweis im Western Blot

Für den spezifischen Nachweis der einzelnen Toxinkomponenten mit monoklonalen Antikörpern im Western Blot wurden die bakteriellen Kulturüberstände der einzelnen Stämme zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von PA, EF und LF erfolgte im Anschluss durch Sichtbarmachung auf Röntgenfilm und kann den Abbildungen 17 bis 19 (S. 66 – 68) entnommen werden.

*B. cereus* bv *anthracis* sezerniert ebenso wie *B. anthracis* alle drei Toxinkomponenten aus der Zelle in den Kulturüberstand, jedoch in unterschiedlichen Mengen. *B. anthracis* UDIII-7 und Vollum produzieren unter induzierenden Bedingungen deutlich mehr PA als die afrikanischen Stämme. Hier sind auch deutliche Abbauprodukte als Banden unterschiedlichen Molekulargewichts in den Laufspuren 6 und 7 (Abb. 17, S. 66) zu erkennen. Die von den verschiedenen *B. cereus* bv *anthracis*-Stämmen produzierten PA-Mengen sind etwas geringer, innerhalb der Primärisolate und Subklone aber vergleichbar. Auffällig ist das vollständige Fehlen von PA im Kulturüberstand nach Anzucht in LB-Flüssigmedium und atmosphärischem Sauerstoff. Im Gegensatz dazu lassen sich bei beiden *B. anthracis*-Stämmen geringe Mengen PA auch nach Anzucht unter nicht-induzierenden Wachstumsbedingungen nachweisen. Um auszuschließen, dass diese Banden durch Kontamination nach Überlaufen der großen Proteinmengen der Nachbartaschen beim Beladen des SDS-Gels entstanden sind, wurden die PA-Immunoblots noch zwei weitere Male wiederholt. Dabei wurde nur jede zweite Geltasche mit zu testendem Kulturüberstand befüllt, die anderen Taschen blieben leer. Das Ergebnis beider Wiederholungen entsprach dem des dargestellten PA-Blots, wodurch die Produktion geringer Mengen an PA auch bei nicht-induzierenden Bedingungen durch *B. anthracis* gezeigt werden konnte.

Prinzipiell bestätigen die Ergebnisse des Western Blots die Genexpressionsanalysen, allerdings scheint die bei *B. cereus* bv *anthracis* CI, CA, CI-12 und CI-18 nur maximal 2- bis 3-fach höhere Expression von *pagA* zu gering für die im Immunoblot sichtbare Bandenstärke zu sein. Auch die immens höhere Expression von *pagA* bei CA-5 unter induzierenden Bedingungen würde eine deutlich intensivere PA-Bande im Western Blot erwarten lassen.

Die im Kulturüberstand der untersuchten Stämme vorhandenen Mengen an LF sind deutlich geringer als die PA-Mengen. Lediglich bei beiden *B. anthracis*-Vertretern ist ein vergleichbar starkes Bandensignal im Western Blot zu erkennen. Dennoch sekretieren alle getesteten Stämme bis auf *B. cereus* bv *anthracis* CI-1 unter induzierenden Wachstumsbedingungen im Immunoblot detektierbare Mengen an LF. Interessanterweise ist auch in Laufspur 11 (Abb. 18, S. 67), dem Überstand von Subklon CI-12 nach Anzucht in LB-Flüssigmedium, ein deutliches Signal sichtbar, demnach scheint dieser Stamm auch unter nicht-induzierenden Wachstumsbedingungen geringe Mengen an LF zu bilden.

Der mit dem polyklonalen Primärantikörper H45-EF durchgeführte Immunoblot gegen EF zeigt für alle Probenproben mehrere unspezifische Signalbanden, bei denen es sich auch um Abbauprodukte von EF handeln könnte (vgl. Abb. 19, S. 68). Um das spezifische Proteinsignal von 89 kDa von diesen unspezifischen Signalen unterscheiden zu können, wurde auf dem dargestellten Blot eine Positivkontrolle in Form von rekombinatem EF mitgeführt. Bei genauem Abgleich der Fragmentgröße wird deutlich, dass lediglich in drei der untersuchten Kulturüberstände geringe Mengen an EF nachgewiesen werden konnten. *B. cereus* bv *anthracis* CI, CI-12 und *B. anthracis* UDIII-7 sezernieren EF unter induzierenden Bedingungen ins umgebende Medium, bei *B. cereus* bv *anthracis* CA und CI-18 ist nur ein als grenzwertig positiv zu beurteilendes Bandensignal in der richtigen Größe zu erkennen. Die für alle Toxinkomponenten durchgeführten Western Blots von Bakterienpellets, die zuvor bei der Präparation der Kulturüberstände entnommen wurden, ergaben auch im Fall von EF keine abweichenden Ergebnisse. Daher kann für alle Toxinkomponenten ausgeschlossen werden, dass diese zwar synthetisiert werden, eine Ausschleusung aus der Bakterienzelle jedoch vermindert ist oder vollständig unterbleibt.

Zusammenfassend lässt sich eine verstärkte Produktion der plasmidkodierte Toxinkomponenten bei *B. cereus* bv *anthracis* unter induzierenden Wachstumsbedingungen durch Nachweis im Immunoblot bestätigen. Ebenso wie bei *B. anthracis* erfolgt hier unter wirtsähnlichen Bedingungen eine erhöhte Toxinproduktion der vegetativen Zellen, was den Ablauf der Milzbrand-Pathogenese nach Infektion des Wirtsorganismus widerspiegelt. Allerdings ist die synthetisierte Toxinmenge bei den afrikanischen Stämmen im Allgemeinen etwas geringer.

#### **6.4.2 Quantifizierung der Toxine**

Die Konzentrationsbestimmung der von den untersuchten *Bacillus*-Stämmen in den Kulturüberstand abgegebenen Toxinkomponenten PA und LF bestätigt die bereits zuvor beobachtete Aktivierung der Virulenzfaktoren in Gegenwart von CO<sub>2</sub> und Bikarbonat (siehe Tab. 18 und 19, S. 70). Die in Rich-Medium mittels capture-ELISA nachgewiesenen Mengen an PA waren bei allen Stämmen deutlich größer als in LB-Medium. *B. anthracis* Vollum produziert unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Versuchsbedingungen mit 0,7 bis 1,4 µg/ml am meisten PA, gefolgt von *B. anthracis* UDIII-7 mit rund 0,3 bis 0,4 µg/ml. Die sekretierten PA-Mengen der Primärisolate *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA liegen noch leicht unter diesem Niveau, ebenso wie die der Subklone. Einzig CA-5 produziert in Rich-Medium mit etwa 0,2 µg/ml mit *B. anthracis* UDIII-7 vergleichbare Mengen an PA, was sich in diesem Fall mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen von *pagA* deckt. Auch die Menge an ins umgebende Medium sekretierten LF ist bei *B. anthracis* Vollum am größten, hier konnte etwa dreimal mehr LF als bei *B. anthracis* UDIII-7 oder den Primärisolaten CI und CA nachgewiesen werden. Überraschenderweise konnte bei keinem der Subklone eine

verstärkte LF-Produktion unter induzierenden Anzuchtbedingungen gezeigt werden, was im Hinblick auf die Ergebnisse des LF-Western Blots nicht nachvollziehbar ist.

EF konnte in keinem der getesteten Überstände mittels capture-ELISA nachgewiesen werden. Die im 1:2 verdünnten Anzuchtmedium enthaltene Proteinmenge muss somit unter dem Detektionslimit des angewendeten ELISA von 5 ng/µl liegen.

Die Produktion von Toxinen durch *B. anthracis* ist stark abhängig von den Kulturbedingungen, daher sind vergleichende Analysen immer nur unter identischen Konditionen durchführbar. PA-Konzentrationen von bis zu 20 µg/ml (145) wurden ebenso beschrieben wie 2 bis 4 µg/ml, abhängig vom getesteten Stamm (104). Zusammenfassend lässt sich jedoch bestätigen, dass die Regulationsmechanismen der Toxinsynthese bei *B. cereus* bv *anthracis* und *B. anthracis* vergleichbar sind. Demnach scheint auch bei den afrikanischen *Bacillus*-Isolaten ein Regulationsnetzwerk zwischen chromosomalen Regionen und den Virulenzplasmiden pXO1 und pXO2 vorhanden zu sein.

## 6.5 Funktionalität der Toxine im Makrophagen-Assay

Die von *B. anthracis* produzierten Virulenzfaktoren Letal- und Ödemtoxin wirken zytotoxisch, was im Zellkulturmodell durch Messung der Zellviabilität untersucht werden kann (35,89). Die hierbei am häufigsten verwendeten Zellen sind die murinen Makrophagenlinien RAW 264.7 und J774.1 (9,121,164,170,192,226,245), die auch in der vorliegenden Arbeit im Makrophagen-Assay zum Einsatz kamen. Nach Zugabe der Kulturüberstände auf die Testzellen konnte nach einer Einwirkzeit von insgesamt acht Stunden bei keinem der untersuchten Bakterienstämme eine verminderte Zellviabilität gemessen werden. Dies galt auch für die Probenansätze, bei denen entweder 500 ng rPA oder 50 ng rLF zu den Testüberständen zugefügt wurden. Bei diesen Ansätzen sollte untersucht werden, ob eventuell nur eine der beiden Toxinkomponenten in unzureichender Menge vorhanden ist. Diese hätte dann mit dem jeweiligen rekombinanten Protein komplementiert werden können, was jedoch bei keinem der Überstände der Fall war. Lediglich die Makrophagen der Kontrollansätze, zu denen beide Komponenten hinzugegeben wurden, zeigten keinerlei metabolische Aktivität mehr, was einer Zytotoxizität von 100 % entspricht.

Die fehlenden Proteinbanden im Coomassie-Gel bestätigen die Ergebnisse des Viabilitäts-Tests, hier wurde bereits eine sehr geringe Menge an ins Medium sekretierten Proteinen deutlich. Die Konzentration an biologisch aktiven Toxinen scheint demnach nicht ausreichend zu sein, um einen toxischen Effekt auf die Kulturzellen auszuüben. Eine Aufkonzentration der Überstände könnte zytotoxische Wirkung haben, dies müsste über Säulenzentrifugation in weiterführenden Versuchen getestet werden. Eine absolute Menge von 100 ng rPA und 50 ng rLF pro Reaktionsansatz waren in der vorliegenden Arbeit ausreichend, um eine 100 %-ige Toxizität auf RAW 264.1- und J774.1-Zellen zu bewirken.



Diese verwendeten Mengen wurden bereits zuvor in der Literatur beschrieben, wobei teilweise auch geringere Mengen an LF in Kombination mit 100 ng PA eine toxische Wirkung auf Makrophagen ausüben können (39,184,226). Dennoch wurden in allen Kontrollansätzen jeweils 500 ng rPA verwendet, um einen sicheren PA-Überschuss für eine potentielle Reaktion mit dem möglicherweise ebenfalls im Kulturüberstand vorhandenen EF zu gewährleisten.

Interessanterweise konnte keine toxische Wirkung der Kombination von rPA und rLF in oben beschriebenen Dosen auf die humane Makrophagenlinie THP-1 beobachtet werden, diese Zellen scheinen unempfindlich gegenüber Letaltoxinen zu sein. Dieses Phänomen wurde bereits zuvor beschrieben (20,164), und trifft auch auf andere Zelllinien zu (91,120), jedoch ist die Ursache hierfür unbekannt.

## 6.6 *plcR*-regulierte Virulenzfaktoren

Zu klären, aus welchem Grund *B. cereus* bv *anthracis* CI-1 und CI-12 im Gegensatz zu den Elternstämmen hämolytisch sind, war eines der Ziele der vorliegenden Arbeit. Eine naheliegende Hypothese war zunächst das Vorhandensein eines intakten *plcR*-Gens, das den pleiotropen Regulator PlcR kodiert. Bei den Primärisolaten CI und CA verhindert eine Mutation die Funktionsfähigkeit des Regulators, was dazu führt, dass durch PlcR regulierte Gene kaum exprimiert werden (126). Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Adeninbasen-Insertion, die eine Verschiebung des Leserasters bedingt und die Produktion eines Proteins mit verändertem C-Terminus zur Folge hat. Dieser ist so nicht mehr in der Lage, mit dem PapR-Signalpeptid zu interagieren, das gemeinsam mit PlcR den Regulationsmechanismus in Gang setzt (218,219). Auch bei *B. anthracis* ist *plcR* durch eine nonsense-Mutation inaktiv, sie ist jedoch spezifisch und ausschließlich bei Vertretern dieses monophyletischen Klons vorhanden (134). Sie führt aber auch zur Inaktivität der durch *plcR* regulierten Proteine, wie beispielsweise Phospholipasen oder anderen abbauenden Enzymen.

Sequenzanalysen ergaben, dass alle Subklone der afrikanischen *Bacillus*-Isolate ebenso wie die Elternstämme dieselbe Mutation im *plcR*-Gen besitzen (S. Klee, pers. Mitteilungen). Die Ergebnisse eines qualitativen Expressionsnachweises mittels RT-PCR von zwei *plcR*-regulierten Zielgenen *plcA* und *sfp* bei *B. cereus* bv *anthracis* bestätigten die Inaktivität von *plcR*. Hier konnten lediglich grenzwertig negative bis sehr schwach positive Signale von PCR-Produkten im Agarosegel nachgewiesen werden (vgl. Tab. 16, S. 59), da beide Gene bei Inaktivität des Regulators nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert werden (158,206). Im Gegensatz dazu zeigten parallele Untersuchungen mit den *B. cereus*-Stämmen ATCC 10987 und DSM 31, sowie *B. thuringiensis* sv konkukian erwartungsgemäß sehr starke Signale der PCR-Produkte beider Zielgene.

Nachdem eine fehlende, bzw. kaum feststellbare Expression der beiden untersuchten *plcR*-regulierten Gene gezeigt werden konnte, sollte dieses Ergebnis auch auf Proteinebene bestätigt werden. Für die Untersuchung wurde der Nachweis von PI-PLC gewählt, da die fehlende Enzym-Aktivität auf *Cereus* Ident-Agar möglicherweise auf ein vorhandenes, aber nicht funktionelles Protein zurückzuführen wäre. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch das Protein direkt mittels Antikörper nachgewiesen.

Die Bestätigung der Ergebnisse der Expressionsanalyse von *plcA* und *sfp* war hierbei auch notwendig, um sicher zu gehen, dass ein fehlendes Signal in der RT-PCR auch wirklich ein fehlendes Protein bedeutet. Die RNA-Extraktion erfolgte nach viereinhalb Stunden Anzucht der untersuchten Stämme, da die bakteriellen Kulturen zu diesem Zeitpunkt von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase übertreten und die Expression der plasmidkodierten Virulenzfaktoren bei *B. anthracis* maximal ist. Die Transkription von *plcR* beginnt allerdings erst kurz vor dem Eintreten der Kultur in die stationäre Phase und erreicht erst zwei Stunden später das höchste Niveau (78,146). Aus versuchsorganisatorischen Gründen wurde jedoch ein RNA-Extraktionszeitpunkt für alle nachfolgenden Anwendungen gewählt. Es wäre also bei dieser Versuchsanordnung möglich gewesen, dass die Expression von *plcA* und *sfp* erst später in der stationären Phase zur Bildung von Proteinen geführt hätte. Bei der äußerst kurzen Halbwertszeit eines bakteriellen mRNA-Moleküls von wenigen Minuten kann aber bereits ein um eine halbe Stunde verschobener Zeitpunkt der RNA-Extraktion aus der Zelle zu abweichenden Ergebnissen in der RT-PCR führen. Deshalb wurde auch der Kulturüberstand der über Nacht für 16 bis 20 Stunden gewachsenen Bakterienkulturen auf PI-PLC untersucht.

Die unter 5.4.4 aufgeführten Ergebnisse bestätigen, dass im Kulturüberstand der angezogenen Bakterien keine PI-PLC vorhanden war. *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA sind ebenso wie *B. anthracis* Vollum und UDIII-7, sowie die hämolytischen Subklone CI-1 und CI-12 nicht in der Lage, Phospholipase C zu synthetisieren. Lediglich die als Positivkontrollen mitgeführten Überstände von *B. cereus* DSM 31, ATCC 10987 und *B. thuringiensis* sv konkukian offenbaren ein positives PI-PLC-Signal im Western Blot. Eine weitere offene Frage konnte durch die parallele Untersuchung der aus der Kultur gewonnenen Bakterienpellets geklärt werden. Auch hier zeigte sich nur bei den drei *Bacillus*-Vertretern mit intaktem *plcR*-Gen ein Signal bei der Behandlung von bakteriellem Material mit dem spezifischen Antikörper A72-24 (Daten nicht gezeigt). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die Zellen von *B. cereus* bv *anthracis* zwar in der Lage sind, PI-PLC zu bilden, aber nicht ins umgebende Medium zu sekretieren. In diesem Fall hätte es zu einem Signal im Immunoblot mit bakteriellem Material kommen müssen. Somit bestätigen die Ergebnisse der RT-PCR für *plcA* und die Proteinuntersuchungen im Western Blot die bei den

mikrobiologischen Tests auf Selektivagar beobachtete fehlende Phospholipase-Aktivität bei *B. cereus* bv *anthracis* und die damit korrelierende Inaktivität des Regulators PlcR.

Aus welchen Gründen jedoch die Subklone CI-1 und CI-12 mit ausgeprägter  $\beta$ -Hämolyse wachsen, bleibt unklar. Möglicherweise spielt das sekretierte Protein Hämolysin II eine Rolle, das eine breite hämolytische Wirkung auf verschiedene Erythrozyten besitzt (3,159,230). Der qualitative Expressionsnachweis des kodierenden Gens *hlyII* zeigt zwar keinerlei Unterschiede zwischen *B. cereus*, *B. cereus* bv *anthracis* und *B. anthracis*, jedoch könnte der Nachweis des Proteins eventuell mehr Aufschluss geben. Auch die von *B. cereus* gebildete Sphingomyelinase (SMase) zeigt enzymatische und hämolytische Aktivität (110). Schaferythrozyten, die im in der vorliegenden Arbeit verwendeten Columbia-Blutagar vorhanden sind, werden spezifisch durch dieses Enzym lysiert, da sie über einen hohen Anteil an Sphingomyelin verfügen (173). Durch die Inaktivität von PlcR bei *B. anthracis* ist keine Aktivität der SMase zu beobachten (182), jedoch könnten genauere Untersuchungen der Expression der kodierenden Gene bei *B. cereus* bv *anthracis* möglicherweise Unterschiede bei den Subklonen aufzeigen, wie es auch bei *sfp* und *plcA* der Fall ist.

Für die Beantwortung dieser Frage wären mRNA-Microarray- und Proteom-Analysen von allen Isolaten hilfreich, um herauszufinden, inwieweit andere abbauende Enzyme und nicht-plasmidkodierte Regulatoren eine Rolle im Netzwerk der Genregulation der Virulenzfaktoren bei *B. cereus* und *B. anthracis* spielen. Eventuell könnten andere Regulatoren im Laufe der evolutiven Entwicklung der Bakterien eine Rolle bei der Aktivierung oder Hemmung von verschiedenen Proteinen übernommen haben. Bei *B. cereus* DSM 31 existieren beispielsweise drei *plcR*-Paraloge im Genom, die zwar nicht direkt durch *plcR* selbst kontrolliert werden, jedoch möglicherweise ebenfalls durch das Signalpeptid PapR aktiviert werden (113). Auch ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, welche Proteine in welchem Umfang eine Rolle bei der bakteriellen Hämolyse spielen.

Die generelle Inaktivität von *plcR* durch eine Mutation bei *B. cereus* bv *anthracis* könnte allerdings mit der schon zuvor publizierten wahrscheinlichen Inkompatibilität von *plcR* und *atxA* zusammenhängen (69). Durch das Vorhandensein von pCI-XO1 bei den afrikanischen *Bacillus*-Isolaten wären die Stämme mit intaktem *plcR*-Gen möglicherweise ebenfalls nicht in der Lage zu sporulieren, wie schon bei *B. anthracis* gezeigt werden konnte (158). Durch den Selektionsdruck könnte auch in diesem Fall wie bei *B. anthracis* das Ausschalten von *plcR* einen evolutiven Vorteil gebracht haben, da die vegetativen Zellen dann zur Sporulation fähig geworden wären. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass eine funktionelles *plcR*-Gen keinerlei Einfluss auf die Sporulationsfähigkeit von *B. cereus* bv *anthracis* ausübt, wie es bei *B. cereus* G9241 der Fall ist (siehe 3.4.5.2, S. 17). Um dies nachvollziehen zu können, müsste ein intaktes *plcR*, beispielsweise von *B. thuringiensis* sv konkukian, ins Chromosom von *B. cereus* bv *anthracis* integriert werden. Dann könnten die Sporulationsfähigkeit und die

Sekretion von *plcR*-regulierten Proteinen untersucht werden. Allerdings ist eine solche gentechnische Arbeit ethisch nicht unstrittig, da möglicherweise ein ohnehin schon hochvirulentes Bakterium mit zusätzlichen pathogenen Eigenschaften versehen werden könnte.

Letztlich lässt sich die Inaktivität des Regulators PlcR bei *B. cereus* bv *anthracis* bestätigen, auch wenn hier im kodierenden Gen eine andere Mutation vorliegt als bei *B. anthracis*. Die durch *plcR* regulierten Gene werden bei den afrikanischen Isolaten nicht aktiviert, was am Beispiel der fehlenden PI-PLC-Synthese gezeigt werden konnte.

## 6.7 Kapsel

Die afrikanischen *Bacillus*-Stämme und ihre pXO2-tragenden Subklone bilden wie *B. anthracis* die Poly-D-Glutaminsäurekapsel, die durch das *cap*-Operon kodiert ist. Immunfluoreszenztests, Tuschefärbung und Untersuchungen im Immunoblot zeigen eine mit *B. anthracis* vergleichbare Kapselproduktion unter induzierenden Wachstumsbedingungen in Flüssigmedium und auf Agar. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen, bei denen ebenfalls eine vergleichbare Expressionssteigerung von *capB* in Gegenwart von CO<sub>2</sub> und Bikarbonat nachgewiesen werden konnte. Nach Anzucht unter nicht-induzierenden Bedingungen konnte aber bei Färbung der Bakterien mit Tusche keine Kapselstruktur gezeigt werden. Dass eine geringe Expression von *capB* unter nicht-induzierenden Bedingungen nachweisbar ist, obwohl morphologisch keine Kapsel sichtbar ist, wurde bereits von Drysdale et al. beschrieben (56). Es scheint hier ein bestimmtes Niveau an *cap*-Transkript in der bakteriellen Zelle vorhanden sein zu müssen, bevor Kapselstruktur auf der Zelloberfläche nachweisbar ist.

Bei *B. anthracis* UDIII-7, Vollum und *B. cereus* bv *anthracis* CA ist im Western Blot auch unter nicht induzierenden Anzuchtbedingungen im Kulturüberstand eine hochmolekulare Kapsel fraktion sichtbar. Demgegenüber ruft das dazugehörige bakterielle Zellmaterial kein Signal mit dem spezifischen Antikörper F26G3 hervor (vgl. Abb. 25 A und B1, S. 75). Diese Diskrepanz ist schwer zu erklären, jedoch könnte hierbei die Präparation des gewonnenen bakteriellen Zellmaterials eine Rolle spielen. In Anzuchten von Wildtyp-Stämmen von *B. anthracis* kommt die Polyglutaminsäurekapsel in drei verschiedenen Formen vor, frei im Kulturmedium, nicht-kovalent mit der Zelloberfläche verbunden und kovalent an das zelluläre Peptidoglykan gebunden (30). Bei der Präparation der Bakterien mit Fixierung und Inaktivierung durch pFA und FA kann bei den nachfolgenden Wasch- und Zentrifugationsschritten nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der Kapselstruktur vor allem bei nicht-kovalenter Bindung verloren geht. Hinzu kommt der Zeitpunkt der Probennahme des Bakterienmaterials. Die im Western Blot analysierten Kulturüberstände wurden nach 16 bis 20 Stunden Anzucht gewonnen, was zur Anreicherung von

Kapselmaterial im Kulturüberstand führt. Das bakterielle Material dagegen wurde bereits nach vier Stunden Anzucht entnommen. Hier war eine längere Wachstumsdauer nicht möglich, um Sporenbildung in den Ansätzen in LB-Flüssigmedium mit atmosphärischem Sauerstoff sicher auszuschließen.

### 6.7.1 Zweiter Kapseltyp

Um der phagozytotischen Aktivität von Immunzellen des Wirts zu entkommen, besitzen viele Bakterien Kapselstrukturen (15). Meist bestehen diese Strukturen aus Polysacchariden, wie bei Staphylokokken oder Streptokokken. Im Fall von *B. anthracis* besteht die Kapsel aus Glutaminsäure, deren Synthesegene auf einem Virulenzplasmid kodiert und so spezifisch sind, dass sie als genetischer Marker in der Diagnostik von *B. anthracis* eingesetzt werden (150).

Bei der Untersuchung von *B. cereus* bv *anthracis* wurden auch von den Subklonen CI-18 und CA-5 Tuschepräparate angefertigt, auf denen deutlich ein heller Hof um die vegetativen Zellen zu erkennen war, obwohl beide Stämme kein Kapselplasmid besitzen (siehe Abb. 23, S. 74). Die Abwesenheit der Poly-D-Glutaminsäurekapsel konnte im Immunfluoreszenztest und Western Blot bestätigt werden, ebenso wie ein fehlendes Amplifikationssignal für *capB* und *acpA* in der PCR. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit polykationischem Ferritin gefärbten Präparate von *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA zeigen deutlich zwei unterschiedlich geformte Hüllstrukturen um die vegetative Zelle herum (siehe Abb. 26 A – D, S. 77). Ferritin eignet sich vor allem für die Anfärbung von polysaccharidhaltigen Kapselstrukturen ((114) und E. Couture-Tosi, pers. Mitteilungen). Die eher fädige Formation findet sich auch bei *B. anthracis* RPG1 wieder und stellt die auf pXO2 kodierte spezifische Glutaminsäurekapsel dar (45,128). Die eher körnig-komprimierte Struktur, die zusätzlich bei CI, CA und dem pXO2-defizienten Subklon CARP zu erkennen ist, hebt sich davon deutlich ab. Sie fehlt *B. anthracis* RPG1 (vgl. Abb. 26 F) ebenso wie anderen untersuchten Vertretern von *B. anthracis* vollständig (Daten nicht gezeigt).

Bei *B. cereus* G9241 ist auf dem pXO1-ähnlichen Plasmid pBCXO1 ein Operon für die Ausbildung einer Hyaluronsäurekapsel vorhanden. Eine Behandlung von bekapselten vegetativen Zellen von *B. cereus* G9241 mit Hyaluronidase bestätigte das Vorhandensein einer solchen Kapselstruktur (174). Auch *B. anthracis* und *B. cereus* bv *anthracis* besitzen diese Gene auf pXO1, bzw. pCI-XO1. Das im Operon liegende Gen *hasA*, das die Hyaluron-Synthase kodiert, besitzt bei *B. anthracis* ein durch Deletion hervorgerufenen Stopcodon, so dass die Hyaluronsäurekapsel nicht exprimiert wird (174). Bei *B. cereus* bv *anthracis* hingegen ist keine Mutation in *hasA* vorhanden (S. Klee, pers. Mitteilungen), daher liegt die Ausbildung der Kapselstruktur nahe. Versuche, in denen die Kapselstruktur von *B. cereus* bv *anthracis* mit Hyaluronidase abgebaut werden kann, bestätigen diese Annahme (P. Goossens, pers. Mitteilungen).

## 6.8 Infektion von Makrophagen mit Sporen

Da Sporen von *B. anthracis* bei aerogener Übertragung, wie sie auch in einem möglichen bioterroristischen Szenario wahrscheinlich wäre, eine tödlich verlaufende Erkrankung hervorrufen, besteht eine große Notwendigkeit, die Infektionsmechanismen dieses Erregers zu verstehen. Unzählige Studien haben sich bisher mit der Frage befasst, aus welchen Gründen eine Infektion mit Sporen von *B. anthracis* im Vergleich zu anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe so viel fataler verläuft. Vor allem die Aufnahme von Sporen über die Atemwege führt zu einer fast immer tödlich verlaufenden Infektion. Der schnelle Transport der Sporen im Wirt spielt dabei eine wichtige Rolle. Nur wenige Stunden nach Aufnahme von Sporen über die Atemwege lassen diese sich bereits in den lokalen Lymphknoten wiederfinden, wohin sie über Alveolarmakrophagen, aber auch dendritische Zellen, transportiert werden (22,41,215,244). Als sicher gilt heute, dass die von *B. anthracis* gebildeten Toxine eine wichtige Rolle bei einer beginnenden Anthrax-Infektion spielen. Der Regulator *atxA*, sowie die Toxingene *pagA*, *lef* und *cya* werden bereits kurz nach begonnener Keimung im Makrophagen exprimiert (44,86). Die von den gekeimten Sporen produzierten Toxine ermöglichen so die Schädigung, bzw. Abtötung des Makrophagen (6). *B. anthracis* exprimiert zusätzlich Gene für die Bildung von Anthrolysin O, einem Cholesterin-abhängigen Zytolysin, das auf Makrophagen zytotoxisch wirkt (42). Gemeinsam mit dem früh gebildeten Letaltoxin kann *B. anthracis* so Apoptose von Wirtszellen induzieren (214).

Um herauszufinden, was bei Aufnahme von *Bacillus*-Sporen durch Makrophagen geschieht, können Infektionsversuche mit Kulturzellen durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher drei verschiedene Zelllinien mit Sporen von *B. anthracis*, *B. cereus* bv *anthracis* und *B. cereus* infiziert, nach definierten Zeitpunkten auf Deckgläsern fixiert und anschließend für Immunfluoreszenzaufnahmen präpariert. Im Fokus stand bei allen Versuchen die Frage, ob die afrikanischen *Bacillus*-Isolate ebenso wie *B. anthracis* im Makrophagen auskeimen und zu vegetativen Zellen heranwachsen können. In Vorversuchen mit Sporen von *B. cereus* DSM 31, ATCC 10987 und *B. thuringiensis* sv konkukian konnten keine vegetativen Zellen innerhalb der Makrophagen nachgewiesen werden. Lediglich die schon zu Beginn der Versuche vorhandene Anzahl an phagozytierten Sporen, die nach der Phagozytosezeit von einer Stunde innerhalb der Kulturzellen vorhanden war, konnte nach sechs Stunden dargestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit fand die Inkubation der Sporen in Anwesenheit von Makrophagen in RPMI-Medium in Gegenwart von 10 % FBS statt, da dabei die Keimung der extrazellulär im Medium vorliegenden Sporen induziert wird (90,105,246). In Vorversuchen konnte bestätigt werden, dass die Sporen aller in den Infektionsversuchen verwendeten *Bacillus*-Stämme nach spätestens 45 Minuten in diesem Medium keimen. Somit kann das nach der Phagozytosezeit zugegebene Gentamycin auf die gekeimten Sporen im Kulturmedium

wirken, während es auf metabolisch inaktive Sporen keinen Effekt hätte. Es wurde darauf verzichtet, während des gesamten Versuchszeitraumes von mehreren Stunden Gentamycin zur Inaktivierung potentiell im Kulturmedium verbliebener extrazellulärer Bakterien wirken zu lassen, da dieses Protokoll nicht unumstritten ist. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass im Kulturmedium vorhandenes Gentamycin über Pinozytose vom Makrophagen aufgenommen wird und sich in intrazellulären Kompartimenten anreichern kann (53,58,92). Dort kann das Antibiotikum auf phagozytierte keimende oder bereits gekeimte Sporen wirken (6,50). Vorversuche, in denen statt einer dreißigminütigen Einwirkzeit von 30 µg/ml Gentamycin mit anschließenden Waschschritten eine permanente Konzentration von 5 µg/ml Gentamycin im Versuchsansatz vorhanden war, bestätigten diese Annahmen. In keinem der mit den drei unterschiedlichen Zelllinien durchgeführten Versuche konnten vegetative Zellen von *B. anthracis* UDIII-7 oder Vollum in den Makrophagen nachgewiesen werden. Lediglich Sporen waren nach sechs Stunden Inkubationszeit mittels Immunfluoreszenztest zu detektieren. Wurde dagegen die höhere Gentamycin-Konzentration für 30 Minuten eingesetzt und die Kulturansätze anschließend mit Medium gewaschen, waren in beiden Versuchsansätzen mit *B. anthracis*-Sporen vegetative Zellen innerhalb der Makrophagen nachweisbar (siehe Abb. 27, S. 79).

Im Gegensatz dazu konnten bei keinem der Versuchsansätze mit Sporen der Primärisolate von *B. cereus* bv *anthracis* oder ihrer Subklone vegetative Bakterien innerhalb der Makrophagen nachgewiesen werden, und das unabhängig von der eingesetzten Zelllinie (siehe Abb. 28, S. 80). Die mittels Phasenkontrastaufnahme und Immunfluoreszenz erhaltenen Bilder glichen in allen Fällen denen, die bei Versuchen mit *B. cereus*- oder *B. thuringiensis*-Sporen angefertigt werden konnten.

Aus welchen Gründen *B. anthracis*-Sporen innerhalb von Makrophagen oder auch dendritischen Zellen auskeimen und überleben können, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch immer nicht geklärt. Verschiedene Studien haben sich mit dieser Fragestellung beschäftigt, und zahlreiche Versuchsanordnungen sollten in der Vergangenheit Aufschluss darüber geben. Die chromosomal kodierten Keimungsoperons *gerS* und *gerH*, sowie das auf pXO1 lokalisierte *gerX*-Operon scheinen bei *B. anthracis* für die Sporenkeimung innerhalb des Makrophagen essentiell zu sein (105,112,243). *GerS* und *gerH* sind möglicherweise die Ursache für die in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbaren vegetativen Zellen der afrikanischen *Bacillus*-Isolate in Makrophagen. Stämme von *B. cereus* bv *anthracis* besitzen zwar wie *B. anthracis* alle drei Operons, jedoch ist in der Promotorregion von *gerS* eine Insertion vorhanden und *gerHA* besitzt zwei Deletionen (S. Klee, pers. Mitteilungen). Um herauszufinden, ob diese Mutationen die Ursache für die fehlende Keimung der afrikanischen *Bacillus*-Stämme darstellen, könnten in weiterführenden Arbeiten intakte Operons von *B. anthracis* ins Genom von *B. cereus* bv *anthracis* eingebaut werden.

Anschließend könnte das Keimungsverhalten der Sporen in den verschiedenen Zelllinien erneut untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbare Keimung der Sporen hat jedoch keine verringerte Virulenz der afrikanischen *Bacillus*-Stämme zur Folge. In Tierversuchen in Kooperation mit dem Institut Pasteur Paris mit Mäusen und Meerschweinchen ist die LD<sub>50</sub> einer Infektion mit Sporen von *B. cereus* bv *anthracis* mit der von *B. anthracis* vergleichbar (M. Mock, pers. Mitteilungen). Möglicherweise ist die fehlende Sporenkeimung im Zellkulturmodell daher eine Unterstützung der Beobachtung, dass Sporen von *B. anthracis* teilweise auch erst nach dem Transport durch Immunzellen im Lymphknoten auskeimen (75) oder eine Keimung schon vor Aufnahme der Sporen durch Immunzellen im Wirtsgewebe stattfindet (205).

Das Problem der Lokalisation der Sporen und vegetativen Bakterienzellen und die intra- und extrazelluläre Keimung von Sporen in den Versuchsansätzen mit Wirtszellen wird in der Literatur vielfach diskutiert. Verschiedene Methoden zur Unterscheidung von extra- und intrazellulär vorliegenden Sporen und vegetativen Zellen wurden bereits beschrieben (36,198,199,224), jedoch existiert bis heute kein Protokoll, das ohne Zweifel eindeutige Aussagen bezüglich der Lokalisation zulassen würde (244). Ebenso unklar ist bis jetzt das Schicksal der aufgenommenen Sporen in Makrophagen (251). Viele Studien belegen die Replikation der ausgekeimten Bakterien innerhalb des Makrophagen (50,83,84,96), andere weisen auf ein effektives Abtöten der gekeimten vegetativen Zellen durch die Wirtszellen hin (106,118,245), beschreiben das Überleben lediglich eines geringen Prozentsatzes an gekeimten Sporen (199) oder legen die Vermutung nahe, dass die Keimungsrate abhängig von der eingesetzten Sporenzahl ist (155). Hervorgerufen werden diese kontroversen Ergebnisse und Interpretationen durch Versuche mit unterschiedlichen Wirtszelllinien, Infektionsprotokollen und Phagozytosebedingungen, durch verschiedene untersuchte *B. anthracis*-Stämme und Sporenpräparationen, sowie unterschiedliche Nachweismethoden zur Unterscheidung von gekeimten und ungekeimten Sporen (205,244).

In der vorliegenden Arbeit wurden Hitzeinaktivierungsversuche mit der Maus-Makrophagenlinie RAW 264.7 durchgeführt, um die intrazelluläre Keimung, bzw. deren Fehlen nachzuweisen. Nach einer Phagozytosezeit von einer Stunde, einer anschließenden Gentamycin-Behandlung und dem Entfernen der extrazellulär vorhandenen Bakterien wurden die phagozytierten Sporen direkt im Anschluss und nach weiteren sechs Stunden Inkubationszeit rekultiviert. Dabei kam es gleich zu Beginn der Versuche zu überraschenden Ergebnissen, da die kultivierbaren KBE der einzelnen Versuchsansätze stark schwanken (vgl. Tab. 20, S. 81). Von den in den Versuch eingesetzten 10<sup>6</sup> Sporen/ml konnten bei *B. cereus* bv *anthracis* CI und *B. anthracis* UDIII-7 nur 10<sup>4</sup>, bzw. 10<sup>3</sup> Sporen/ml rekultiviert werden, und dies unabhängig davon, ob eine Hitzebehandlung der Proben stattfand. Somit



kann ausgeschlossen werden, dass Sporen dieser beiden Stämme schneller keimen und es somit zu einer geringeren Zahl kultivierbarer Bakterien kommt. Die durchgeführten Vorversuche zur Keimungszeit der verschiedenen Sporen im Kulturmedium lieferten diesbezüglich keine abweichenden Ergebnisse, sie liegt im Fall von *B. anthracis* UDIII-7 bei ca. 30 Minuten. Ein solches Ergebnis könnte bedeuten, dass die Sporen der unterschiedlichen *Bacillus*-Stämme unterschiedlich effektiv phagozytiert werden. Bei *B. cereus* bv *anthracis* CA wären somit annähernd alle eingesetzten Sporen von den Kulturmakrophagen aufgenommen worden, während dies bei *B. cereus* bv *anthracis* CI und *B. anthracis* UDIII-7 nur in geringerem Maße der Fall gewesen wäre. Auch die Bestimmung der Lebendzellzahl an rekultivierbaren Bakterien nach sechs Stunden lieferte widersprüchliche Ergebnisse. Bei CI und UDIII-7 ändert sich die KBE-Anzahl kaum, auch eine Inkubation der Probenansätze bei 65 °C für 30 Minuten ändert die Anzahl an kultivierbaren Bakterien nicht. In beiden Fällen scheint keine nachweisbare Keimung der eingesetzten Sporen stattgefunden zu haben. Bei *B. cereus* bv *anthracis* CA nimmt dagegen die nachweisbare KBE nach sechs Stunden um das Hundertfache ab. Prinzipiell könnte dies auf eine Keimung der Sporen im Makrophagen hindeuten, allerdings spricht dagegen, dass sich die Zahl der rekultivierbaren Bakterien auch nach Hitzebehandlung nicht ändert, auch hier wurden ca.  $10^4$  KBE/ml ermittelt. Bei stattgefundener Keimung hätte die Anzahl an KBE nach Hitzebehandlung in diesem Fall niedriger sein müssen als ohne Behandlung, da bei 65 °C die gekeimten Sporen und ausgewachsenen vegetativen Zellen abgetötet worden wären. Aus welchen Gründen die widersprüchlichen Ergebnisse bei den Infektionsversuchen zustande kommen, bleibt in der vorliegenden Arbeit ungeklärt, da Wiederholungsversuche mit den ebenfalls verwendeten Zelllinien J774.1 und THP-1 keine weiteren Aufschlüsse erbrachten. Die mit diesen Zellen ermittelten Ergebnisse der Hitzeinaktivierungen bewegen sich in den Größenordnungen innerhalb der in Tabelle 20 (vgl. Seite 81) aufgelisteten Zehnerpotenzen.

Bei Betrachtung der parallel durchgeführten mikroskopischen Aufnahmen fällt generell auf, dass die Viabilität der Makrophagen mit fortschreitendem Versuch immer mehr beeinträchtigt ist. Dies kann an den zahlreichen Waschsritten liegen, die nach Inkubation mit Gentamycin und vor Fixierung mit pFA notwendig sind oder auch an den protokollbedingten Handhabungsschritten, die eine eher instabile Temperatur mit sich bringen und eine permanente Versorgung der Zellen mit CO<sub>2</sub> stören. Diese Faktoren verursachen bei den Makrophagen Stress, was auch dazu führen könnte, dass es zum Ablösen der Zellen von den Deckgläschen kommt. Diese werden anschließend vor dem Fixieren bei den terminalen Waschsritten leichter abgespült. Mit den abgelösten Wirtszellen reduziert sich aber auch die Anzahl der rekultivierbaren Sporen im Hitzeinaktivierungsversuch, was zu verfälschten Ergebnissen bei der nachfolgenden KBE-Bestimmung führt.

Letztlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die zu Beginn des Infektionsversuchs im Medium gekeimten Sporen innerhalb der Phagozytosezeit beginnen, abbauende Enzyme wie Hämolyse oder Phospholipasen zu produzieren. Zwar werden diese später durch Mediumwechsel entfernt, haben aber dennoch zuvor Zeit, auf die Makrophagen zu wirken. Da *B. cereus* deutlich mehr extrazelluläre Proteine produziert als *B. anthracis* (79,158), könnte dies die sichtbar schlechtere Qualität der Wirtszellen erklären. Da bis jetzt noch keine vollständige Proteomanalyse von *B. cereus* bv *anthracis* durchgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch hier verschiedene abbauende Enzyme auf die Makrophagen wirken können, auch wenn der Regulator *plcR* inaktiv ist.

## **6.9 Einordnung von *B. cereus* bv *anthracis* in die *B. cereus*-Gruppe und seine Verwandtschaft zu *B. anthracis***

Der unter 3.5.2 aufgeführte phylogenetische Stammbaum zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse von *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA zu anderen, in der vorliegenden Arbeit teilweise behandelten Vertretern der *B. cereus*-Gruppe. Wie bereits von Klee et al. (128) zuvor beschrieben, besteht die engste Verwandtschaftsbeziehung der neuen *Bacillus*-Isolate zu den Stämmen *B. thuringiensis* sv konkukian und *B. cereus* E33L auf Basis von MLST (183) und der Anzahl orthologer Proteine (126).

Bei *B. cereus* bv *anthracis* liegt ein anderer Typ Mutation im *plcR*-Gen vor als bei Vertretern von *B. anthracis*. Jedoch legt das Vorhandensein einer von *B. anthracis* unabhängigen Mutation mit identischer Wirkung die Vermutung nahe, dass beide Vertreter der *B. cereus*-Gruppe einen gemeinsamen Vorfahren besitzen und sich aus dieser Vorform parallel in den unterschiedlichen Lebensräumen Steppe, bzw. Savanne und Regenwald entwickelt haben könnten (134). Dabei scheint sich bei beiden afrikanischen *Bacillus*-Stämmen und *B. anthracis* eine unabhängig voneinander durchlaufenen Koevolution von Plasmiden und Chromosom vollzogen zu haben, da sowohl bei *B. anthracis* als auch bei *B. cereus* bv *anthracis* komplexe regulatorische Netzwerke zwischen chromosomal und plasmidkodierten genetischen Loci vorhanden sind (134). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Produktion der Toxinkomponenten PA, EF und LF bei *B. cereus* bv *anthracis* CI und CA und klassischen Vertretern von *B. anthracis* vergleichbar reguliert und durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen beeinflusst wird. Anhand der vergleichenden Expressionsanalysen konnte das nicht nur auf Proteinebene gezeigt, sondern auch auf Nukleinsäure-Ebene bestätigt werden. Dies trifft auch auf die Synthese der *B. anthracis*-spezifischen Poly-D-Glutaminsäurekapsel zu, die von CI, CA und ihren pXO2-tragenden Subklonen gleichermaßen gebildet wird. Durch das Vorhandensein der beiden Plasmide pXO1 und pXO2 und der Ausbildung der darauf kodierten Virulenzfaktoren verursachen

beide Stämme eine Milzbrand-ähnliche Erkrankung, die sie von anderen Stämmen der *B. cereus*-Gruppe abgrenzt und zu äußerst potenten Pathogenen macht.

Denkbar ist allerdings auch eine Einordnung der neuen *Bacillus*-Isolate als Untergruppierung von *B. anthracis*, die endemisch in Regenwaldgebieten Afrikas vorkommt (126). Durch horizontalen Gentransfer der Plasmide, wie er innerhalb der *B. cereus*-Gruppe durchaus häufiger vorkommt (10,236), könnte es zur Aufnahme von pXO1 und pXO2 durch einen *B. cereus*- oder *B. thuringiensis*-Stamm von einer mit *B. anthracis* verwandten Form gekommen sein. Dies würde von der Tatsache unterstützt, dass *B. cereus* bv *anthracis* mehr orthologe Gene mit diesen beiden Stämmen teilt als mit *B. anthracis* (126). Die für den Gentransfer notwendige Voraussetzung, dass ausschließlich vegetative Zellen zu einem solchen Prozess in der Lage sind, könnte hierbei in einer Koinfektion von *B. anthracis* und *B. cereus* oder *B. thuringiensis* eines Wirtsorganismus oder im Keimen und Auswachsen der Sporen in der Rhizosphäre von Pflanzen (201) erfüllt sein.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Vorkommen von Milzbrand	9
Abb. 2:	Schematischer Sporenaufbau	11
Abb. 3:	Wirkungsweise der <i>B. anthracis</i> -Toxine	14
Abb. 4:	Signaleffekte der Genregulation zwischen Chromosom und Plasmiden	16
Abb. 5:	Phylogenetische Analyse von <i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i>	21
Abb. 6:	Technik des hängenden Tropfens	30
Abb. 7:	Funktionsprinzip der Real-Time PCR	36
Abb. 8:	Phospholipase C-Nachweis	52
Abb. 9:	Lecithinase-Nachweis	53
Abb. 10:	$\beta$ -Hämolyse	53
Abb. 11:	Rakette- und Gramfärbung	54
Abb. 12:	Insertion im <i>sigK</i> -Gen	55
Abb. 13:	Expressionsnachweis von <i>aloA</i> und <i>capB</i>	60
Abb. 14:	Relative Quantifizierung der induzierbaren Gene	63
Abb. 15:	Relative Quantifizierung der PlcR-regulierten Gene	64
Abb. 16:	Proteinnachweis aus Kulturüberständen mittels Coomassie-Blau	66
Abb. 17:	Nachweis von protektivem Antigen im Western Blot	66
Abb. 18:	Nachweis von Letalfaktor im Western Blot	67
Abb. 19:	Nachweis von Ödemfaktor im Western Blot	68
Abb. 20:	Standardkurven PA- und LF-capture-ELISA	69
Abb. 21:	Nachweis von Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C im Western Blot	72
Abb. 22:	Kapselbildung auf Agar mit Natriumbikarbonat	73
Abb. 23:	Kapselnachweis durch Tuschefärbung	74
Abb. 24:	Nachweis der Poly-D-Glutaminsäurekapsel mittels Immunfluoreszenz	74
Abb. 25:	Nachweis der Poly-D-Glutaminsäurekapsel im Western Blot	75
Abb. 26:	Kapselnachweis im Elektronenmikroskop	77
Abb. 27:	Nachweis von <i>B. anthracis</i> nach Infektion von Makrophagen	79
Abb. 28:	Nachweis von <i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i> nach Infektion von Makrophagen	80
Abb. 29:	Quantifizierungsstrategien in der Real-Time RT-PCR	90

## 8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Bakterienstämme	23
Tab. 2:	Verwendete Zelllinien	24
Tab. 3:	Verwendete Enzyme, kommerzielle Systemlösungen und Kits	24
Tab. 4:	Verwendete Größenstandards	24
Tab. 5:	Nährmedien	25
Tab. 6:	Untersuchte Gene und verwendete Oligonukleotide	31
Tab. 7:	Allgemeiner Ansatz für PCR-Reaktionen und Thermocycler-Bedingungen	34
Tab. 8:	PCR-Ansätze und Thermocycler-Bedingungen der Real-Time PCR	37
Tab. 9:	Allgemeiner Ansatz für DNase I-Behandlungen von RNA-Präparationen	39
Tab. 10:	Synthese-Mix für cDNA aus RNA-Präparationen	39
Tab. 11:	Verwendete Primärantikörper	45
Tab. 12:	Verwendete Sekundärantikörper	46
Tab. 13:	Verwendete Antigene	46
Tab. 14:	Verwendete Software und Datenbanken	50
Tab. 15:	Mikrobiologische Eigenschaften von <i>B. cereus</i> bv <i>anthracis</i>	52
Tab. 16:	Ergebnisse der RT-PCR	59
Tab. 17:	Ergebnisse der quantitativen Real-Time RT-PCR	61
Tab. 18:	PA-Konzentrationen in Kulturüberständen	70
Tab. 19:	LF-Konzentrationen in Kulturüberständen	70
Tab. 20:	Hitzeinaktivierungsversuche von mit Sporen infizierten Makrophagen	81
Tab. 21:	Herstellerangaben von Chemikalien und Mediumzusätzen	131
Tab. 22:	Optische Dichten und Keimzahlen der Bakterienkulturen	132
Tab. 23:	RNA-Konzentrationen	134
Tab. 24:	Oligonukleotidsequenzen der verwendeten Primer und Sonden	135
Tab. 25:	Primerkombinationen und Fragmentgrößen	137

## 9. Literaturverzeichnis

1. **Agaisse, H., M. Gominet, O. A. Økstad, N. Gilois, V. Sanchis, A. B. Kolstø, and D. Lereclus.** 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* **32**:1043-1053.
2. **Anaraki, S., S. Addiman, G. Nixon, D. Krahe, R. Ghosh, T. Brooks, G. Lloyd, R. Spencer, A. Walsh, B. McCloskey, and N. Lightfoot.** 2008. Investigations and control measures following a case of inhalation anthrax in East London in a drum maker and drummer, October 2008. *Euro. Surveill.* **13**:19076.
3. **Andreeva, Z. I., V. F. Nesterenko, I. S. Yurkov, Z. I. Budarina, E. V. Sineva, and A. S. Solonin.** 2006. Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expr. Purif.* **47**:186-193.
4. **Ash, C., J. A. Farrow, M. Dorsch, E. Stackebrandt, and M. D. Collins.** 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:343-346.
5. **Bach, H. J., A. Hartmann, J. T. Trevors, and J. C. Munch.** 1999. Magnetic capture-hybridization method for purification and probing of mRNA for neutral protease of *Bacillus cereus*. *J. Microbiol. Methods* **37**:187-192.
6. **Banks, D. J., M. Barnajian, F. J. Maldonado-Arocho, A. M. Sanchez, and K. A. Bradley.** 2005. Anthrax toxin receptor 2 mediates *Bacillus anthracis* killing of macrophages following spore challenge. *Cell Microbiol.* **7**:1173-1185.
7. **Banks, D. J., S. C. Ward, and K. A. Bradley.** 2006. New insights into the functions of anthrax toxin. *Expert. Rev. Mol. Med.* **8**:1-18.
8. **Bartkus, J. M. and S. H. Leppla.** 1989. Transcriptional regulation of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **57**:2295-2300.
9. **Barua, S., M. McKevitt, K. Degiusti, E. E. Hamm, J. Larabee, S. Shakir, K. Bryant, T. M. Koehler, S. R. Blanke, D. Dyer, A. Gillaspay, and J. D. Ballard.** 2009. The mechanism of *Bacillus anthracis* intracellular germination requires multiple and highly diverse genetic loci. *Infect. Immun.* **77**:23-31.
10. **Battisti, L., B. D. Green, and C. B. Thorne.** 1985. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **162**:543-550.
11. **Beecher, D. J. and A. C. Wong.** 2000. Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Microbiology* **146**:3033-3039.
12. **Bergman, N. H., E. C. Anderson, E. E. Swenson, B. K. Janes, N. Fisher, M. M. Niemeyer, A. D. Miyoshi, and P. C. Hanna.** 2007. Transcriptional profiling of *Bacillus anthracis* during infection of host macrophages. *Infect. Immun.* **75**:3434-3444.

13. **Bernard, H., M. Faber, R. Grunow, V. Bochat, and A. Görg.** 2010. *Bacillus anthracis* in Heroin? Deutsches Ärzteblatt, Jg. 107, Heft 17, A807.
14. **Bertin, M., A. Chateau, and A. Fouet.** 2010. 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.* **161**:249-259.
15. **Bhakdi, S., N. Mackman, J. M. Nicaud, and I. B. Holland.** 1986. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.* **52**:63-69.
16. **Bhalla, D. K. and D. B. Warheit.** 2004. Biological agents with potential for misuse: a historical perspective and defensive measures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **199**:71-84.
17. **Bongiorni, C., T. Fukushima, A. C. Wilson, C. Chiang, M. C. Mansilla, J. A. Hoch, and M. Perego.** 2008. Dual promoters control the expression of the *Bacillus anthracis* virulence factor *AtxA*. *J. Bacteriol.*
18. **Bottone, E. J.** 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**:382-398.
19. **Bourgogne, A., M. Drysdale, S. G. Hilsenbeck, S. N. Peterson, and T. M. Koehler.** 2003. Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids. *Infect. Immun.* **71**:2736-2743.
20. **Bradburne, C., M. C. Chung, Q. Zong, K. Schlauch, D. Liu, T. Popova, A. Popova, C. Bailey, D. Soppet, and S. Popov.** 2008. Transcriptional and apoptotic responses of THP-1 cells to challenge with toxigenic, and non-toxigenic *Bacillus anthracis*. *BMC. Immunol.* **9**:67.:67.
21. **Bravo, A., S. S. Gill, and M. Soberon.** 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* **49**:423-435.
22. **Brittingham, K. C., G. Ruthel, R. G. Panchal, C. L. Fuller, W. J. Ribot, T. A. Hoover, H. A. Young, A. O. Anderson, and S. Bavari.** 2005. Dendritic cells endocytose *Bacillus anthracis* spores: implications for anthrax pathogenesis. *J. Immunol.* **174**:5545-5552.
23. **Brossier, F., M. Weber-Levy, M. Mock, and J. C. Sirard.** 2000. Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect. Immun.* **68**:1781-1786.
24. **Brown, E. R. and W. B. Cherry.** 1955. Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J. Infect. Dis.* **96**:34-39.
25. **Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**:169-193.
26. **Bustin, S. A.** 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**:23-39.
27. **Bustin, S. A., V. Benes, T. Nolan, and M. W. Pfaffl.** 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* **34**:597-601.
28. **Bustin, S. A. and T. Nolan.** 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* **15**:155-166.

29. **Cabrera-Martinez, R. M., F. Tovar-Rojo, V. R. Vepachedu, and P. Setlow.** 2003. Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**:2457-2464.
30. **Candela, T. and A. Fouet.** 2005. Bacillus anthracis CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* **57**:717-726.
31. **Candela, T., M. Mock, and A. Fouet.** 2005. CapE, a 47-Amino-Acid Peptide, Is Necessary for Bacillus anthracis Polyglutamate Capsule Synthesis. *J. Bacteriol.* **187**:7765-7772.
32. **Carr, K. A., S. R. Lybarger, E. C. Anderson, B. K. Janes, and P. C. Hanna.** 2009. The role of Bacillus anthracis germinant receptors in germination and virulence. *Mol. Microbiol.*
33. **Cataldi, A., E. Labruyere, and M. Mock.** 1990. Construction and characterization of a protective antigen-deficient *Bacillus anthracis* strain. *Mol. Microbiol.* **4**:1111-1117.
34. **CDC.** 2010. CDC 2010. Centers for Disease Control and Prevention. Bioterrorism Agents/Diseases: By Category. web .
35. **Chang, H. H., M. F. Tsai, C. P. Chung, P. K. Chen, H. I. Hu, J. H. Kau, H. H. Huang, H. C. Lin, and D. S. Sun.** 2006. Single-step purification of recombinant anthrax lethal factor from periplasm of Escherichia coli. *J. Biotechnol.*
36. **Chen, L. M., S. Hobbie, and J. E. Galan.** 1996. Requirement of CDC42 for Salmonella-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* **274**:2115-2118.
37. **Chen, M. L. and H. Y. Tsen.** 2002. Discrimination of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J. Appl. Microbiol.* **92**:912-919.
38. **Cho, M. H., H. J. Ahn, H. J. Ha, J. Park, J. H. Chun, B. S. Kim, H. B. Oh, and G. E. Rhee.** 2010. Bacillus anthracis capsule activates caspase-1 and induces interleukin-1beta release from differentiated THP-1 and human monocyte-derived dendritic cells. *Infect. Immun.* **78**:387-392.
39. **Chou, P. J., C. A. Newton, I. Perkins, H. Friedman, and T. W. Klein.** 2008. Suppression of dendritic cell activation by anthrax lethal toxin and edema toxin depends on multiple factors including cell source, stimulus used, and function tested. *DNA Cell Biol.* **27**:637-648.
40. **Cieslak, T. J. and E. M. J. Eitzen.** 1999. Clinical and epidemiologic principles of anthrax. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:552-555.
41. **Cleret, A., A. Quesnel-Hellmann, A. Vallon-Eberhard, B. Verrier, S. Jung, D. Vidal, J. Mathieu, and J. N. Tournier.** 2007. Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route. *J. Immunol.* **178**:7994-8001.
42. **Cocklin, S., M. Jost, N. M. Robertson, S. D. Weeks, H. W. Weber, E. Young, S. Seal, C. Zhang, E. Mosser, P. J. Loll, A. J. Saunders, R. F. Rest, and I. M. Chaiken.** 2006. Real-time monitoring of the membrane-binding and insertion properties of the cholesterol-dependent cytolysin anthrolysin O from Bacillus anthracis. *J. Mol. Recognit.* **19**:354-362.



43. **Cote, C. K., K. M. Rea, S. L. Norris, N. Van Rooijen, and S. L. Welkos.** 2004. The use of a model of in vivo macrophage depletion to study the role of macrophages during infection with *Bacillus anthracis* spores. *Microb. Pathog.* **37**:169-175.
44. **Cote, C. K., C. A. Rossi, A. S. Kang, P. R. Morrow, J. S. Lee, and S. L. Welkos.** 2005. The detection of protective antigen (PA) associated with spores of *Bacillus anthracis* and the effects of anti-PA antibodies on spore germination and macrophage interactions. *Microb. Pathog.* **38**:209-225.
45. **Couture-Tosi, E., J. L. Ranck, G. Haustant, G. Pehau-Arnaudet, and M. Sachse.** 2010. CEMOVIS on a pathogen: analysis of *Bacillus anthracis* spores. *Biol. Cell.* **102**:609-619.
46. **Cunningham, K., D. B. Lacy, J. Mogridge, and R. J. Collier.** 2002. Mapping the lethal factor and edema factor binding sites on oligomeric anthrax protective antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:7049-7053.
47. **Curry, J., C. McHale, and M. T. Smith.** 2002. Low efficiency of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase during reverse transcription of rare t(8;21) fusion gene transcripts. *Biotechniques.* **32**:768, 770, 772, 754-768, 770, 772, 755.
48. **Dai, Z., J. C. Sirard, M. Mock, and T. M. Koehler.** 1995. The *atxA* gene product activates transcription of the anthrax toxin genes and is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* **16**:1171-1181.
49. **De Vos.** 1998. Anthrax in the Krueger National Park: an ecological approach to the question whether anthrax is indigenous to the Kruger National Park. Sigma Press, Pretoria 16-21.
50. **Dixon, T. C., A. A. Fadl, T. M. Koehler, J. A. Swanson, and P. C. Hanna.** 2000. Early *Bacillus anthracis*-macrophage interactions: intracellular survival and escape. *Cell Microbiol.* **2**:453-463.
51. **Dixon, T. C., M. Meselson, J. Guillemin, and P. C. Hanna.** 1999. Anthrax. *N. Engl. J. Med.* **341**:815-826.
52. **Dong, D. Y., J. J. Xu, X. H. Song, L. Fu, and W. Chen.** 2005. [Expression and analysis of biological activity of the recombination anthrax edema factor]. *Wei Sheng Wu Xue. Bao.* **45**:459-462.
53. **Drevets, D. A., B. P. Canono, P. J. Leenen, and P. A. Campbell.** 1994. Gentamicin kills intracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **62**:2222-2228.
54. **Drobniewski, F. A.** 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:324-338.
55. **Drysdale, M., A. Bourgoigne, S. G. Hilsenbeck, and T. M. Koehler.** 2004. *atxA* controls *Bacillus anthracis* capsule synthesis via *acpA* and a newly discovered regulator, *acpB*. *J. Bacteriol.* **186**:307-315.
56. **Drysdale, M., A. Bourgoigne, and T. M. Koehler.** 2005. Transcriptional analysis of the *Bacillus anthracis* capsule regulators. *J. Bacteriol.* **187**:5108-5114.
57. **Duesbery, N. S., C. P. Webb, S. H. Leppla, V. M. Gordon, K. R. Klimpel, T. D. Copeland, N. G. Ahn, M. K. Oskarsson, K. Fukasawa, K. D. Paull, and G. F. Vande Woude.** 1998. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science.* **280**:734-737.

58. **Edelson, P. J., R. Zwiebel, and Z. A. Cohn.** 1975. The pinocytic rate of activated macrophages. *J. Exp. Med.* **142**:1150-1164.
59. **Ehling-Schulz, M., M. Fricker, H. Grallert, P. Rieck, M. Wagner, and S. Scherer.** 2006. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC. Microbiol.* **6**:20.
60. **Ellerbrok, H., H. Nattermann, M. Ozel, L. Beutin, B. Appel, and G. Pauli.** 2002. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**:51-59.
61. **Ellner, P. D., C. J. Stoessel, E. Drakeford, and F. Vasi.** 1966. A new culture medium for medical bacteriology. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**:502-504.
62. **Escuyer, V. and R. J. Collier.** 1991. Anthrax protective antigen interacts with a specific receptor on the surface of CHO-K1 cells. *Infect. Immun.* **59**:3381-3386.
63. **Fasanella, A., M. Van Ert, S. A. Altamura, G. Garofolo, C. Buonavoglia, G. Leori, L. Huynh, S. Zanecki, and P. Keim.** 2005. Molecular diversity of *Bacillus anthracis* in Italy. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3398-3401.
64. **Fisher, N. and P. Hanna.** 2005. Characterization of *Bacillus anthracis* Germinant Receptors In Vitro. *J. Bacteriol.* **187**:8055-8062.
65. **Fouet, A.** 2009. The surface of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* **30**:374-385.
66. **Fouet, A.** 2010. AtxA, a *Bacillus anthracis* global virulence regulator. *Res. Microbiol.* **161**:735-742.
67. **Fouet, A. and S. Mesnage.** 2002. *Bacillus anthracis* cell envelope components. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **271**:87-113.
68. **Fouet, A. and M. Mock.** 1996. Differential influence of the two *Bacillus anthracis* plasmids on regulation of virulence gene expression. *Infect. Immun.* **64**:4928-4932.
69. **Fouet, A. and M. Mock.** 2006. Regulatory networks for virulence and persistence of *Bacillus anthracis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:160-166.
70. **Fouet, A., K. L. Smith, C. Keys, J. Vaissaire, C. Le Doujet, M. Levy, M. Mock, and P. Keim.** 2002. Diversity among French *Bacillus anthracis* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4732-4734.
71. **Ghelardi, E., F. Celandroni, S. Salvetti, E. Fiscarelli, and S. Senesi.** 2007. *Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils. *Microbes. Infect.* **9**:591-598.
72. **Gibson, U. E., C. A. Heid, and P. M. Williams.** 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**:995-1001.
73. **Gimenez, A. P., Y. Z. Wu, M. Paya, C. Delclaux, L. Touqui, and P. L. Goossens.** 2004. High bactericidal efficiency of type IIa phospholipase A2 against *Bacillus anthracis* and inhibition of its secretion by the lethal toxin. *J. Immunol.* **173**:521-530.
74. **GLADSTONE, G. P.** 1946. Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates. *Br. J. Exp. Pathol.* **27**:394-418.

75. **Glomski, I. J.** 2011. *Bacillus anthracis* Dissemination through hosts in: *Bacillus anthracis and Anthrax* (Editor Nickolas H. Bergmann) / Wiley-Blackwell-Verlag - 2011 by John Wiley & Sons, Inc Hoboken, New Jersey, USA.
76. **Glomski, I. J., F. Dumetz, G. Jouvion, M. R. Huerre, M. Mock, and P. L. Goossens.** 2008. Inhaled non-capsulated *Bacillus anthracis* in A/J mice: nasopharynx and alveolar space as dual portals of entry, delayed dissemination, and specific organ targeting. *Microbes. Infect.* **10**:1398-1404.
77. **Glomski, I. J., A. Piris-Gimenez, M. Huerre, M. Mock, and P. L. Goossens.** 2007. Primary Involvement of Pharynx and Peyer's Patch in Inhalational and Intestinal Anthrax. *PLoS. Pathog.* **3**:e76.
78. **Gohar, M., K. Faegri, S. Perchat, S. Ravnum, O. A. Okstad, M. Gominet, A. B. Kolsto, and D. Lereclus.** 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS. ONE.* **3**:e2793.
79. **Gohar, M., N. Gilois, R. Graveline, C. Garreau, V. Sanchis, and D. Lereclus.** 2005. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics.* **5**:3696-3711.
80. **Goodman, J. W. and D. E. Nitecki.** 1967. Studies on the relation of a prior immune response to immunogenicity. *Immunology.* **13**:577-583.
81. **Goossens, K., P. M. Van, S. A. Van, J. Vandesompele, Z. A. Van, and L. J. Peelman.** 2005. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC. Dev. Biol.* **5**:27.:27.
82. **Green, B. D., L. Battisti, T. M. Koehler, C. B. Thorne, and B. E. Ivins.** 1985. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **49**:291-297.
83. **Guidi-Rontani, C.** 2002. The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol.* **10**:405-409.
84. **Guidi-Rontani, C., M. Levy, H. Ohayon, and M. Mock.** 2001. Fate of germinated *Bacillus anthracis* spores in primary murine macrophages. *Mol. Microbiol.* **42**:931-938.
85. **Guidi-Rontani, C., Y. Pereira, S. Ruffie, J. C. Sirard, M. Weber-Levy, and M. Mock.** 1999. Identification and characterization of a germination operon on the virulence plasmid pXO1 of *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* **33**:407-414.
86. **Guidi-Rontani, C., M. Weber-Levy, E. Labruyere, and M. Mock.** 1999. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol. Microbiol.* **31**:9-17.
87. **Guidi-Rontani, C., M. Weber-Levy, M. Mock, and V. Cabiaux.** 2000. Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors across endosome membranes. *Cell Microbiol.* **2**:259-264.
88. **Guignot, J., M. Mock, and A. Fouet.** 1997. AtxA activates the transcription of genes harbored by both *Bacillus anthracis* virulence plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**:203-207.
89. **Gupta, P., S. M. Waheed, and R. Bhatnagar.** 1999. Expression and purification of the recombinant protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Protein Expr. Purif.* **16**:369-376.

90. **Gut, I. M., B. Tamilselvam, A. M. Prouty, B. Stojkovic, S. Czeschin, W. A. van der Donk, and S. R. Blanke.** 2011. Bacillus anthracis spore interactions with mammalian cells: Relationship between germination state and the outcome of in vitro. BMC Microbiol. **11:46**:46.
91. **Gutting, B. W., K. S. Gaske, A. S. Schilling, A. F. Slaterbeck, L. Sobota, R. S. Mackie, and T. L. Buhr.** 2005. Differential susceptibility of macrophage cell lines to Bacillus anthracis-Vollum 1B. Toxicol. In Vitro **19**:221-229.
92. **Hamrick, T. S., A. H. Diaz, E. A. Havell, J. R. Horton, and P. E. Orndorff.** 2003. Influence of extracellular bactericidal agents on bacteria within macrophages. Infect. Immun. **71**:1016-1019.
93. **Han, C. S., G. Xie, J. F. Challacombe, M. R. Altherr, S. S. Bhotika, D. Bruce, C. S. Campbell, M. L. Campbell, J. Chen, O. Chertkov, C. Cleland, M. Dimitrijevic, N. A. Doggett, J. J. Fawcett, T. Glavina, L. A. Goodwin, K. K. Hill, P. Hitchcock, P. J. Jackson, P. Keim, A. R. Kewalramani, J. Longmire, S. Lucas, S. Malfatti, K. McMurry, L. J. Meincke, M. Misra, B. L. Moseman, M. Mundt, A. C. Munk, R. T. Okinaka, B. Parson-Quintana, L. P. Reilly, P. Richardson, D. L. Robinson, E. Rubin, E. Saunders, R. Tapia, J. G. Tesmer, N. Thayer, L. S. Thompson, H. Tice, L. O. Ticknor, P. L. Wills, T. S. Brettin, and P. Gilna.** 2006. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. **188**:3382-3390.
94. **Haraldsen, J. D. and A. L. Sonenshein.** 2003. Efficient sporulation in *Clostridium difficile* requires disruption of the sigmaK gene. Mol. Microbiol. **48**:811-821.
95. **Harwood, C. R. and R. Cranenburgh.** 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. Trends Microbiol. **16**:73-79.
96. **Heffernan, B. J., B. Thomason, A. Herring-Palmer, L. Shaughnessy, R. McDonald, N. Fisher, G. B. Huffnagle, and P. Hanna.** 2006. Bacillus anthracis phospholipases C facilitate macrophage-associated growth and contribute to virulence in a murine model of inhalation anthrax. Infect. Immun. **74**:3756-3764.
97. **Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams.** 1996. Real time quantitative PCR. Genome Res. **6**:986-994.
98. **Helgason, E., O. A. Økstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna, and A. B. Kolstø.** 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. **66**:2627-2630.
99. **Helgason, E., N. J. Tourasse, R. Meisal, D. A. Caugant, and A. B. Kolstø.** 2004. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. Appl. Environ. Microbiol. **70**:191-201.
100. **Hernandez, E., F. Ramisse, J. P. Ducoureau, T. Cruel, and J. D. Cavallo.** 1998. *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. J. Clin. Microbiol. **36**:2138-2139.
101. **Hirsch-Kauffmann, M., M. Schweiger, and Michael-Ruth.** 2009. Biologie und molekulare Medizin - für Mediziner und Naturwissenschaftler - 7. Auflage - Stuttgart, New York: Georg Thieme Verl., 2009, 416 S., 570 Abb., 74 Tab.

102. **Hoffmaster, A. R., K. K. Hill, J. E. Gee, C. K. Marston, B. K. De, T. Popovic, D. Sue, P. P. Wilkins, S. B. Avashia, R. Drumgoole, C. H. Helma, L. O. Ticknor, R. T. Okinaka, and P. J. Jackson.** 2006. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3352-3360.
103. **Hoffmaster, A. R. and T. M. Koehler.** 1997. The anthrax toxin activator gene atxA is associated with CO<sub>2</sub>-enhanced non-toxin gene expression in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **65**:3091-3099.
104. **Hoffmaster, A. R., J. Ravel, D. A. Rasko, G. D. Chapman, M. D. Chute, C. K. Marston, B. K. De, C. T. Sacchi, C. Fitzgerald, L. W. Mayer, M. C. Maiden, F. G. Priest, M. Barker, L. Jiang, R. Z. Cer, J. Rilstone, S. N. Peterson, R. S. Weyant, D. R. Galloway, T. D. Read, T. Popovic, and C. M. Fraser.** 2004. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:8449-8454.
105. **Hu, H., J. Emerson, and A. I. Aronson.** 2007. Factors involved in the germination and inactivation of *Bacillus anthracis* spores in murine primary macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **272**:245-250.
106. **Hu, H., Q. Sa, T. M. Koehler, A. I. Aronson, and D. Zhou.** 2006. Inactivation of *Bacillus anthracis* spores in murine primary macrophages. *Cell Microbiol.* **8**:1634-1642.
107. **Hudson, M. J., W. Beyer, R. Bohm, A. Fasanella, G. Garofolo, R. Golinski, P. L. Goossens, U. Hahn, B. Hallis, A. King, M. Mock, C. Montecucco, A. Ozin, F. Tonello, and S. H. Kaufmann.** 2008. *Bacillus anthracis*: balancing innocent research with dual-use potential. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**:345-364.
108. **Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin, and A. Zumla.** 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* **6**:279-284.
109. **Hugh-Jones, M.** 1999. 1996-97 Global Anthrax Report. *J. Appl. Microbiol.* **87**:189-191.
110. **Ikezawa, H., M. Mori, and R. Taguchi.** 1980. Studies on sphingomyelinase of *Bacillus cereus*: hydrolytic and hemolytic actions on erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **199**:572-578.
111. **Inglesby, T. V., T. O'Toole, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. M. Friedlander, J. Gerberding, J. Hauer, J. Hughes, J. McDade, M. T. Osterholm, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, and K. Tonat.** Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA* 2002. May. 1. ;287. (17. ):2236. -52. **287**:2236-2252.
112. **Ireland, J. A. and P. C. Hanna.** 2002. Macrophage-enhanced germination of *Bacillus anthracis* endospores requires gerS. *Infect. Immun.* **70**:5870-5872.
113. **Ivanova, N., A. Sorokin, I. Anderson, N. Galleron, B. Candelon, V. Kapatral, A. Bhattacharyya, G. Reznik, N. Mikhailova, A. Lapidus, L. Chu, M. Mazur, E. Goltsman, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, Y. Grechkin, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, E. S. Dusko, R. Overbeek, and N. Kyrpides.** 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**:87-91.

114. **Jacques, M. and B. Foiry.** 1987. Electron microscopic visualization of capsular material of *Pasteurella multocida* types A and D labeled with polycationic ferritin. *J. Bacteriol.* **169**:3470-3472.
115. **Jahn, C. E., A. O. Charkowski, and D. K. Willis.** 2008. Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *J. Microbiol. Methods.* **75**:318-324.
116. **Jensen, G. B., B. M. Hansen, J. Eilenberg, and J. Mahillon.** 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* **5**:631-640.
117. **Kaczanowska, M. and M. Ryden-Aulin.** 2004. Temperature sensitivity caused by mutant release factor 1 is suppressed by mutations that affect 16S rRNA maturation. *J. Bacteriol.* **186**:3046-3055.
118. **Kang, T. J., M. J. Fenton, M. A. Weiner, S. Hibbs, S. Basu, L. Baillie, and A. S. Cross.** 2005. Murine macrophages kill the vegetative form of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **73**:7495-7501.
119. **Karrer, E. E., J. E. Lincoln, S. Hogenhout, A. B. Bennett, R. M. Bostock, B. Martineau, W. J. Lucas, D. G. Gilchrist, and D. Alexander.** 1995. In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:3814-3818.
120. **Kassam, A., S. D. Der, and J. Mogridge.** 2005. Differentiation of human monocytic cell lines confers susceptibility to *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Cell Microbiol.* **7**:281-292.
121. **Kau, J. H., D. S. Sun, H. S. Huang, T. S. Lien, H. H. Huang, H. C. Lin, and H. H. Chang.** 2010. Sublethal doses of anthrax lethal toxin on the suppression of macrophage phagocytosis. *PLoS. ONE.* **5**:e14289.
122. **Kazuhiko Yamada and Kazuo Komagata.** 1972. Taxonomic studies on Coryneform bacteria. IV. Morphological, cultural, biochemical, and physiological characteristics. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **18**:399-416.
123. **Keim, P., A. Kalif, J. Schupp, K. Hill, S. E. Travis, K. Richmond, D. M. Adair, M. Hugh-Jones, C. R. Kuske, and P. Jackson.** 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J. Bacteriol.* **179**:818-824.
124. **Keim, P. and K. L. Smith.** 2002. *Bacillus anthracis* evolution and epidemiology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **271:21-32**.:21-32.
125. **Kim, H. U. and J. M. Goepfert.** 1974. A sporulation medium for *Bacillus anthracis*. *J. Appl. Bacteriol.* **37**:265-267.
126. **Klee, S. R., E. B. Brzuszkiewicz, H. Nattermann, H. Bruggemann, S. Dupke, A. Wollherr, T. Franz, G. Pauli, B. Appel, W. Liebl, E. Couacy-Hymann, C. Boesch, F. D. Meyer, F. H. Leendertz, H. Ellerbrok, G. Gottschalk, R. Grunow, and H. Liesegang.** 2010. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS. ONE.* **5**:e10986.
127. **Klee, S. R., H. Nattermann, S. Becker, M. Urban-Schriefer, T. Franz, D. Jacob, and B. Appel.** 2006. Evaluation of different methods to discriminate *Bacillus*

- anthracis* from other bacteria of the *Bacillus cereus* group. J. Appl. Microbiol. **100**:673-681.
128. **Klee, S. R., M. Ozel, B. Appel, C. Boesch, H. Ellerbrok, D. Jacob, G. Holland, F. H. Leendertz, G. Pauli, R. Grunow, and H. Nattermann.** 2006. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. J. Bacteriol. **188**:5333-5344.
129. **KLEMM, D. M. and W. R. KLEMM.** 1959. A history of anthrax. J. Am. Vet. Med. Assoc. **135**:458-62.:458-462.
130. **Klichko, V. I., J. Miller, A. Wu, S. G. Popov, and K. Alibek.** 2003. Anaerobic induction of *Bacillus anthracis* hemolytic activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. Apr. 11. ;303. (3. ):855. -62. **303**:855-862.
131. **Koch, R.** 1876. Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. Beiträge zur Biologie der Pflanzen **2**:277-311.
132. **Koehler, T. M.** 2002. *Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **271**:143-164.
133. **Koehler, T. M., Z. Dai, and M. Kaufman-Yarbray.** 1994. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO<sub>2</sub> and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. J. Bacteriol. **176**:586-595.
134. **Kolsto, A. B., N. J. Tourasse, and O. A. Okstad.** 2009. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? Annu. Rev. Microbiol. **63**:451-476.
135. **Kozel, T. R., P. Thorkildson, S. Brandt, W. H. Welch, J. A. Lovchik, D. P. Aucoin, J. Vilai, and C. R. Lyons.** 2007. Protective and immunochemical activities of monoclonal antibodies reactive with the *Bacillus anthracis* polypeptide capsule. Infect. Immun. **75**:152-163.
136. **Kumar, P., N. Ahuja, and R. Bhatnagar.** 2001. Purification of anthrax edema factor from *Escherichia coli* and identification of residues required for binding to anthrax protective antigen. Infect. Immun. **69**:6532-6536.
137. **Kunkel, B., R. Losick, and P. Stragier.** 1990. 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. **4**:525-535.
138. **Kuppe, A., L. M. Evans, D. A. McMillen, and O. H. Griffith.** 1989. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus cereus*: cloning, sequencing, and relationship to other phospholipases. J. Bacteriol. **171**:6077-6083.
139. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**:680-685.
140. **Leendertz, F. H., H. Ellerbrok, C. Boesch, E. Couacy-Hymann, K. Matz-Rensing, R. Hakenbeck, C. Bergmann, P. Abaza, S. Junglen, Y. Moebius, L. Vigilant, P. Formenty, and G. Pauli.** 2004. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. Nature **430**:451-452.
141. **Leendertz, F. H., F. Lankester, P. Guislain, C. Néel, O. Drori, J. Dupain, S. Speede, P. Reed, N. Wolfe, S. Loul, E. Mpoudi-Ngole, M. Peeters, C. Boesch, G.**

- Pauli, H. Ellerbrok, and E. M. Leroy.** 2006. Anthrax in Western and Central African great apes. *Am. J. Primatol.* **68**:928-933.
142. **Leendertz, F. H., S. Yumlu, G. Pauli, C. Boesch, E. Couacy-Hymann, L. Vigilant, S. Junglen, S. Schenk, and H. Ellerbrok.** 2006. A new *Bacillus anthracis* found in wild chimpanzees and a gorilla from west and central Africa. *Plos Pathog.* **2**:e8.
143. **Lekanne Deprez, R. H., A. C. Fijnvandraat, J. M. Ruijter, and A. F. Moorman.** 2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal. Biochem.* **307**:63-69.
144. **Leppla, S. H.** 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**:3162-3166.
145. **Leppla, S. H.** 1988. Production and purification of anthrax toxin. *Methods Enzymol.* **165**:103-116.
146. **Lereclus, D., H. Agaisse, M. Gominet, S. Salamitou, and V. Sanchis.** 1996. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J. Bacteriol.* **178**:2749-2756.
147. **Lincoln, R. E., D. R. Hodges, F. Klein, B. G. Mahlandt, W. I. Jones, Jr., B. W. Haines, M. A. Rhian, and J. S. Walker.** 1965. Role of the lymphatics in the pathogenesis of anthrax. *J. Infect. Dis.* **115**:481-494.
148. **Little, S. F. and B. E. Ivins.** 1999. Molecular pathogenesis of *Bacillus anthracis* infection. *Microbes. Infect.* **1**:131-139.
149. **Livak, K. J. and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25**:402-408.
150. **Makino, S., I. Uchida, N. Terakado, C. Sasakawa, and M. Yoshikawa.** 1989. Molecular characterization and protein analysis of the *cap* region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **171**:722-730.
151. **Makino, S., M. Watarai, H. I. Cheun, T. Shirahata, and I. Uchida.** 2002. Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. *J. Infect. Dis.* **186**:227-233.
152. **Manchee, R. J., M. G. Broster, J. Melling, R. M. Henstridge, and A. J. Stagg.** 1981. *Bacillus anthracis* on Gruinard Island. *Nature.* **294**:254-255.
153. **Mauel, J. and V. Defendi.** 1971. Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by simian virus 40. *J. Exp. Med.* **134**:335-350.
154. **McIntyre, L., K. Bernard, D. Beniac, J. L. Isaac-Renton, and D. C. Naseby.** 2008. Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:7451-7453.
155. **McKevitt, M. T., K. M. Bryant, S. M. Shakir, J. L. Larabee, S. R. Blanke, J. Lovchik, C. R. Lyons, and J. D. Ballard.** 2007. Effects of endogenous D-alanine synthesis and autoinhibition of *Bacillus anthracis* germination on in vitro and in vivo infections. *Infect. Immun.* **75**:5726-5734.



156. **MEYNELL, E. and G. G. MEYNELL.** 1964. THE ROLES OF SERUM AND CARBON DIOXIDE IN CAPSULE FORMATION BY *BACILLUS ANTHRACIS*. *J. Gen. Microbiol.* **34:153-64.**:153-164.
157. **Michael Walter Pfaffl.** 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspectrum* .
158. **Mignot, T., M. Mock, D. Robichon, A. Landier, D. Lereclus, and A. Fouet.** 2001. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* **42:1189-1198.**
159. **Miles, G., H. Bayley, and S. Cheley.** 2002. Properties of *Bacillus cereus* hemolysin II: a heptameric transmembrane pore. *Protein Sci.* **11:1813-1824.**
160. **Moayeri, M. and S. H. Leppla.** 2004. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **7:19-24.**
161. **Mock, M. and A. Fouet.** 2001. Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* **55:647-671.**
162. **Mock, M. and T. Mignot.** 2003. Anthrax toxins and the host: a story of intimacy. *Cell Microbiol.* **5:15-23.**
163. **Mogridge, J., K. Cunningham, D. B. Lacy, M. Mourez, and R. J. Collier.** 2002. The lethal and edema factors of anthrax toxin bind only to oligomeric forms of the protective antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99:7045-7048.**
164. **Mohamed, N., J. Li, C. S. Ferreira, S. F. Little, A. M. Friedlander, G. L. Spitalny, and L. S. Casey.** 2004. Enhancement of anthrax lethal toxin cytotoxicity: a subset of monoclonal antibodies against protective antigen increases lethal toxin-mediated killing of murine macrophages. *Infect. Immun.* **72:3276-3283.**
165. **Moir, A., B. M. Corfe, and J. Behravan.** 2002. Spore germination. *Cell Mol. Life Sci.* **59:403-409.**
166. **Mossel, D. A., M. J. Koopman, and E. Jongerius.** 1967. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbiol.* **15:650-653.**
167. **Moyes, R. B., J. Reynolds, and D. P. Breakwell.** 2009. Differential staining of bacteria: gram stain. *Curr. Protoc. Microbiol.* **Appendix 3:Appendix 3C.**:Appendix.
168. **Ndyabahinduka, D. G., I. H. Chu, A. H. Abdou, and J. K. Gaifuba.** 1984. An outbreak of human gastrointestinal anthrax. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **20:205-208.**
169. **Neumeyer, T., F. Tonello, M. F. Dal, B. Schiffler, and R. Benz.** 2006. Anthrax edema factor, voltage-dependent binding to the protective antigen ion channel and comparison to LF binding. *J. Biol. Chem.* **281:32335-32343.**
170. **Ngundi, M. M., B. D. Meade, T. L. Lin, W. J. Tang, and D. L. Burns.** 2010. Comparison of three anthrax toxin neutralization assays. *Clin. Vaccine Immunol.* **17:895-903.**
171. **Nishihara, T., Y. Takubo, E. Kawamata, T. Koshikawa, J. Ogaki, and M. Kondo.** 1989. Role of outer coat in resistance of *Bacillus megaterium* spore. *J. Biochem.* **106:270-273.**
172. **Nolan, T., R. E. Hands, and S. A. Bustin.** 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* **1:1559-1582.**

173. **Oda, M., M. Takahashi, T. Matsuno, K. Uoo, M. Nagahama, and J. Sakurai.** 2010. Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1798**:1073-1080.
174. **Oh, S. Y., J. M. Budzik, G. Garufi, and O. Schneewind.** 2011. Two capsular polysaccharides enable *Bacillus cereus* G9241 to cause anthrax-like disease. *Mol. Microbiol.* **80**:455-470.
175. **Okinaka, R., T. Pearson, and P. Keim.** 2006. Anthrax, but not *Bacillus anthracis*? *PLoS. Pathog.* **2**:e122.
176. **Okstad, O. A., M. Gominet, B. Purnelle, M. Rose, D. Lereclus, and A. B. Kolsto.** 1999. Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin. *Microbiology.* **145**:3129-3138.
177. **Passalacqua, K. D., A. Varadarajan, B. Byrd, and N. H. Bergman.** 2009. Comparative transcriptional profiling of *Bacillus cereus* sensu lato strains during growth in CO<sub>2</sub>-bicarbonate and aerobic atmospheres. *PLoS. ONE.* **4**:e4904.
178. **Peralta, H., Y. Mora, E. Salazar, S. Encarnacion, R. Palacios, and J. Mora.** 2004. Engineering the nifH promoter region and abolishing poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Rhizobium etli* enhance nitrogen fixation in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3272-3281.
179. **Perez-Novo, C. A., C. Claeys, F. Speleman, C. P. Van, C. Bachert, and J. Vandesompele.** 2005. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques.* **39**:52, 54, 56.
180. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.
181. **PHILLIPS, H. J. and J. E. TERRYBERRY.** 1957. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp. Cell Res.* **13**:341-347.
182. **Pomerantsev, A. P., K. V. Kalnin, M. Osorio, and S. H. Leppla.** 2003. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infect. Immun.* **71**:6591-6606.
183. **Priest, F. G., M. Barker, L. W. Baillie, E. C. Holmes, and M. C. Maiden.** 2004. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* **186**:7959-7970.
184. **Quinn, C. P., Y. Singh, K. R. Klimpel, and S. H. Leppla.** 1991. Functional mapping of anthrax toxin lethal factor by in-frame insertion mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **266**:20124-20130.
185. **Radun, D., H. Bernard, M. Altmann, I. Schoneberg, V. Bochat, T. U. van, R. M. Rippe, R. Grunow, M. Elschner, W. Biederbick, and G. Krause.** 2010. Preliminary case report of fatal anthrax in an injecting drug user in North-Rhine-Westphalia, Germany, December 2009. *Euro. Surveill.* **15**:19464.
186. **Rall, J. M. and T. M. Koehler.** 2011. *Bacillus anthracis* Virulence Gene Regulation / Wiley-Blackwell Verlag / 2011 by John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA.
187. **Raschke, W. C., S. Baird, P. Ralph, and I. Nakoinz.** 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* **15**:261-267.

188. **Rasko, D. A., M. R. Altherr, C. S. Han, and J. Ravel.** 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:303-329.
189. **Rasko, D. A., J. Ravel, O. A. Økstad, E. Helgason, R. Z. Cer, L. Jiang, K. A. Shores, D. E. Fouts, N. J. Tourasse, S. V. Angiuoli, J. Kolonay, W. C. Nelson, A. B. Kolstø, C. M. Fraser, and T. D. Read.** 2004. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic. Acids. Res.* **32**:977-988.
190. **Raymond, B., P. R. Johnston, C. Nielsen-Leroux, D. Lereclus, and N. Crickmore.** 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* **18**:189-194.
191. **Read, T. D., S. N. Peterson, N. Tourasse, L. W. Baillie, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, H. Tettelin, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, E. K. Holtzapple, O. A. Økstad, E. Helgason, J. Rilstone, M. Wu, J. F. Kolonay, M. J. Beanan, R. J. Dodson, L. M. Brinkac, M. Gwinn, R. T. Deboy, R. Madpu, S. C. Daugherty, A. S. Durkin, D. H. Haft, W. C. Nelson, J. D. Peterson, M. Pop, H. M. Khouri, D. Radune, J. L. Benton, Y. Mahamoud, L. Jiang, I. R. Hance, J. F. Weidman, K. J. Berry, R. D. Plaut, A. M. Wolf, K. L. Watkins, W. C. Nierman, A. Hazen, R. Cline, C. Redmond, J. E. Thwaite, O. White, S. L. Salzberg, B. Thomason, A. M. Friedlander, T. M. Koehler, P. C. Hanna, A. B. Kolstø, and C. M. Fraser.** 2003. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* **423**:81-86.
192. **Rhie, G. E., Y. M. Park, J. S. Han, J. Y. Yu, W. K. Seong, and H. B. Oh.** 2005. Efficacy of non-toxic deletion mutants of protective antigen from *Bacillus anthracis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **45**:341-347.
193. **Rigel, N. W. and M. Braunstein.** 2008. A new twist on an old pathway - accessory secretion systems. *Mol. Microbiol.* **69**:291-302.
194. **Ristroph, J. D. and B. E. Ivins.** 1983. Elaboration of *Bacillus anthracis* antigens in a new, defined culture medium. *Infect. Immun.* **39**:483-486.
195. **Roh, J. Y., J. Y. Choi, M. S. Li, B. R. Jin, and Y. H. Je.** 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**:547-559.
196. **Rosenow, C., R. M. Saxena, M. Durst, and T. R. Gingeras.** 2001. Prokaryotic RNA preparation methods useful for high density array analysis: comparison of two approaches. *Nucleic Acids Res.* **29**:E112.
197. **Ross, J. M.** 1957. THE PATHOGENESIS OF ANTHRAX FOLLOWING THE ADMINISTRATION OF SPORES BY THE RESPIRATORY ROUTE. *J. PATH. BACT: LXXIII*:485-494.
198. **Russell, B. H., Q. Liu, S. A. Jenkins, M. J. Tuvim, B. F. Dickey, and Y. Xu.** 2008. In vivo demonstration and quantification of intracellular *Bacillus anthracis* in lung epithelial cells. *Infect. Immun.* **76**:3975-3983.
199. **Ruthel, G., W. J. Ribot, S. Bavari, and T. A. Hoover.** 2004. Time-lapse confocal imaging of development of *Bacillus anthracis* in macrophages. *J. Infect. Dis.*
200. **Saile, E. and T. M. Koehler.** 2002. Control of anthrax toxin gene expression by the transition state regulator *abrB*. *J. Bacteriol.* **184**:370-380.

201. **Saile, E. and T. M. Koehler.** 2006. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3168-3174.
202. **Salamitou, S., F. Ramisse, M. Brehelin, D. Bourguet, N. Gilois, M. Gominet, E. Hernandez, and D. Lereclus.** 2000. The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology* **146 ( Pt 11)**:2825-2832.
203. **Salter, S. J.** 2011. You cannot *B. cereus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**:83.
204. **Sambrook, J. and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
205. **Sanz, P., L. D. Teel, F. Alem, H. M. Carvalho, S. C. Darnell, and A. D. O'Brien.** 2008. Detection of *Bacillus anthracis* spore germination in vivo by bioluminescence imaging. *Infect. Immun.* **76**:1036-1047.
206. **Sastalla, I., L. M. Maltese, O. M. Pomerantseva, A. P. Pomerantsev, A. Keane-Myers, and S. H. Leppla.** 2010. Activation of the latent *PlcR* regulon in *Bacillus anthracis*. *Microbiology* **156**:2982-2993.
207. **Sato, T., Y. Samori, and Y. Kobayashi.** 1990. The *cisA* cistron of *Bacillus subtilis* sporulation gene *spoIVC* encodes a protein homologous to a site-specific recombinase. *J. Bacteriol.* **172**:1092-1098.
208. **Schmittgen, T. D. and B. A. Zakrajsek.** 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **46**:69-81.
209. **Schnepf, E., N. Crickmore, R. J. Van, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775-806.
210. **Schoor, O., T. Weinschenk, J. Hennenlotter, S. Corvin, A. Stenzi, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic.** 2003. Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA. *Biotechniques.* **35**:1192-1201.
211. **Scorpio, A., D. J. Chabot, W. A. Day, D. K. O'brien, N. J. Vietri, Y. Itoh, M. Mohamadzadeh, and A. M. Friedlander.** 2007. Poly- $\gamma$ -Glutamate Capsule-Degrading Enzyme Treatment Enhances Phagocytosis and Killing of Encapsulated *Bacillus anthracis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:215-222.
212. **Setlow, P.** 2003. Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:550-556.
213. **Shafa, F., B. J. Moberly, and P. Gerhardt.** 1966. Cytological features of anthrax spores phagocytized in vitro by rabbit alveolar macrophages. *J. Infect. Dis.* **116**:401-413.
214. **Shannon, J. G., C. L. Ross, T. M. Koehler, and R. F. Rest.** 2003. Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infect. Immun.* **71**:3183-3189.
215. **Shetron-Rama, L. M., A. C. Herring-Palmer, G. B. Huffnagle, and P. Hanna.** 2010. Transport of *Bacillus anthracis* from the lungs to the draining lymph nodes is a rapid process facilitated by CD11c+ cells. *Microb. Pathog.* **49**:38-46.

216. **Simone Fleige und Michael W Pfaffl.** 2007. Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR. *Laborwelt* **Nr.5**:4-8.
217. **Sirard, J. C., M. Mock, and A. Fouet.** 1994. The three *Bacillus anthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. *J. Bacteriol.* **176**:5188-5192.
218. **Slamti, L. and D. Lereclus.** 2002. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* **21**:4550-4559.
219. **Slamti, L. and D. Lereclus.** 2005. Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* Group. *J. Bacteriol.* **187**:1182-1187.
220. **Slamti, L., S. Perchat, M. Gominet, G. Vilas-Boas, A. Fouet, M. Mock, V. Sanchis, J. Chaufaux, M. Gohar, and D. Lereclus.** 2004. Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J. Bacteriol.* **186**:3531-3538.
221. **Souaze, F., A. Ntodou-Thome, C. Y. Tran, W. Rostene, and P. Forgez.** 1996. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques.* **21**:280-285.
222. **Spencer, R. C.** 2003. *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Pathol.* **56**:182-187.
223. **Stenfors Arnesen, L. P., A. Fagerlund, and P. E. Granum.** 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:579-606.
224. **Stojkovic, B., E. M. Torres, A. M. Prouty, H. K. Patel, L. Zhuang, T. M. Koehler, J. D. Ballard, and S. R. Blanke.** 2008. High-throughput, single-cell analysis of macrophage interactions with fluorescently labeled *Bacillus anthracis* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5201-5210.
225. **Stragier, P., B. Kunkel, L. Kroos, and R. Losick.** 1989. Chromosomal rearrangement generating a composite gene for a developmental transcription factor. *Science* **243**:507-512.
226. **Taft, S. C. and A. A. Weiss.** 2008. Neutralizing activity of vaccine-induced antibodies to two *Bacillus anthracis* toxin components, lethal factor and edema factor. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**:71-75.
227. **Thellin, O., W. Zorzi, B. Lakaye, B. B. De, B. Coumans, G. Hennen, T. Grisar, A. Igout, and E. Heinen.** 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* **75**:291-295.
228. **Tournier, J. N., A. Quesnel-Hellmann, A. Cleret, and D. R. Vidal.** 2007. Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax. *Cell Microbiol.* **9**:555-565.
229. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* **24**:145-9.:145-149.
230. **Tran, S. L., E. Guillemet, M. Ngo-Camus, C. Clybouw, A. Puhar, A. Moris, M. Gohar, D. Lereclus, and N. Ramarao.** 2011. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cell Microbiol.* **13**:92-108.

231. **Tsuchiya, S., Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S. Nakae, T. Konno, and K. Tada.** 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* **42**:1530-1536.
232. **Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada.** 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer.* **26**:171-176.
233. **Tsvetanova, B., A. C. Wilson, C. Bongiorno, C. Chiang, J. A. Hoch, and M. Perego.** 2007. Opposing effects of histidine phosphorylation regulate the AtxA virulence transcription factor in *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* **63**:644-655.
234. **Uchida, I., J. M. Hornung, C. B. Thorne, K. R. Klimpel, and S. H. Leppla.** 1993. Cloning and characterization of a gene whose product is a trans-activator of anthrax toxin synthesis. *J. Bacteriol.* **175**:5329-5338.
235. **Uchida, I., S. Makino, T. Sekizaki, and N. Terakado.** 1997. Cross-talk to the genes for *Bacillus anthracis* capsule synthesis by atxA, the gene encoding the trans-activator of anthrax toxin synthesis. *Mol. Microbiol.* **23**:1229-1240.
236. **Van der Auwera, G. A., L. Andrup, and J. Mahillon.** 2005. Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO2 and of the *Bacillus thuringiensis* plasmid pBT9727. *BMC. Genomics* **6**:103.
237. **van, F. R.** 1980. The mononuclear phagocyte system. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **64**:1-11.:1-11.
238. **Vietri, N. J., R. Marrero, T. A. Hoover, and S. L. Welkos.** 1995. Identification and characterization of a trans-activator involved in the regulation of encapsulation by *Bacillus anthracis*. *Gene* **152**:1-9.
239. **Vitale, G., R. Pellizzari, C. Recchi, G. Napolitani, M. Mock, and C. Montecucco.** 1999. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKS and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKS in cultured macrophages. *J. Appl. Microbiol.* **87**:288.
240. **Waters, C. M. and B. L. Bassler.** 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**:319-46.:319-346.
241. **Weaver, J., T. J. Kang, K. W. Raines, G. L. Cao, S. Hibbs, P. Tsai, L. Baillie, G. M. Rosen, and A. S. Cross.** 2007. Protective Role of *Bacillus anthracis* Exosporium in Macrophage-Mediated Killing by Nitric Oxide. *Infect. Immun.* **75**:3894-3901.
242. **WEBLEY, D. M.** 1953. A simple method for producing microcultures in hanging drops with special reference to organisms utilizing oils. *J. Gen. Microbiol.* **8**:66-71.
243. **Weiner, M. A. and P. C. Hanna.** 2003. Macrophage-mediated germination of *Bacillus anthracis* endospores requires the *gerH* operon. *Infect. Immun.* **71**:3954-3959.
244. **Welkos, S., J. A. Bozue, and C. K. Cote.** 2011. The Interactions between *Bacillus anthracis* and macrophages in: *Bacillus anthracis* and Anthrax (Editor Nickolas H. Bergmann) / Wiley-Blackwell-Verlag - 2011 by John Wiley & Sons, Inc Hoboken, New.

245. **Welkos, S., A. Friedlander, S. Weeks, S. Little, and I. Mendelson.** 2002. In-vitro characterisation of the phagocytosis and fate of anthrax spores in macrophages and the effects of anti-PA antibody. *J. Med. Microbiol.* **51**:821-831.
246. **Welkos, S., S. Little, A. Friedlander, D. Fritz, and P. Fellows.** 2001. The role of antibodies to *Bacillus anthracis* and anthrax toxin components in inhibiting the early stages of infection by anthrax spores. *Microbiology* **147**:1677-1685.
247. **Welkos, S. L.** 1991. Plasmid-associated virulence factors of non-toxigenic (pX01-) *Bacillus anthracis*. *Microb. Pathog.* **10**:183-198.
248. **Wendisch, V. F., D. P. Zimmer, A. Khodursky, B. Peter, N. Cozzarelli, and S. Kustu.** 2001. Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. *Anal. Biochem.* **290**:205-213.
249. **Willis, E. A.** 2009. Landscape with dead sheep: what they did to Gruinard Island. 2002. *Med. Confl. Surviv.* **25**:320-331.
250. **Wong, M. L. and J. F. Medrano.** 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* **39**:75-85.
251. **Xue, Q., S. A. Jenkins, C. Gu, E. Smeds, Q. Liu, R. Vasan, B. H. Russel, and Y. Xu.** 2010. *Bacillus anthracis* Spore Entry into Epithelial Cells Is an Actin-Dependent Process Requiring c-Src and P13K. *PLoS. ONE.* **5**:e11665.
252. **Yin, R., F. Tian, B. Frankenberger, M. H. de Angelis, and T. Stoeger.** 2010. Selection and evaluation of stable housekeeping genes for gene expression normalization in carbon nanoparticle-induced acute pulmonary inflammation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**:531-536.
253. **Young, J. A. and R. J. Collier.** 2007. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**:243-65.:243-265.
254. **ZWARTOUW, H. T. and H. SMITH.** 1956. Polyglutamic acid from *Bacillus anthracis* grown in vivo; structure and aggressin activity. *Biochem. J.* **63**:437-442.

## 10. Anhang

**Tabelle 21: Herstellerangaben von Chemikalien und Mediumzusätzen**

Produkt	Hersteller
Acrylamidlösung	Carl Roth, Karlsruhe, D
Agar	Merck Chemicals, Darmstadt, D
Bacto™-Hefeextrakt	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Bacto™-Trypton	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Merck Chemicals, Darmstadt, D
CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D
Casamino Acids	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Columbia-Blutagar-Basis	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, D
CuSO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D
EDTA-Na <sub>2</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D
Eigelb-Emulsion	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, D
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
FeSO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D
Fleischextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, D
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Merck Chemicals, Darmstadt, D
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
KCl	Carl Roth, Karlsruhe, D
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D
Malzextrakt	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, D
Mannit	Carl Roth, Karlsruhe, D
Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
MgSO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D
MnSO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, D
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D



Produkt	Hersteller
NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
Pepton	Merck Chemicals, Darmstadt, D
Phenolrot	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Polymyxin B	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Schafblut	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, D
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, D
Stärke	Carl Roth, Karlsruhe, D
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tween-80	Carl Roth, Karlsruhe, D
Xylencyanol	Merck Chemicals, Darmstadt, D
ZnSO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, D

**Tabelle 22: Optische Dichte und Keimzahlen der Bakterienkulturen**

Ergebnisse der Messungen der OD<sub>600</sub> der für die RNA-Extraktionen angezogenen Kulturen von *B. anthracis*, *B. cereus* *bv anthracis*, *B. cereus* und *B. thuringiensis* nach 4,5 Stunden Wachstum.

Stamm	OD <sub>600</sub> - LB	KBE/ml - LB	OD <sub>600</sub> - RM	KBE/ml - RM
<b>1. Extraktion</b>				
UDIII-7	2,311	1,7 x 10 <sup>8</sup>	1,208	1,0 x 10 <sup>8</sup>
Vollum	2,356	1,2 x 10 <sup>8</sup>	1,189	1,0 x 10 <sup>8</sup>
CI	2,558	5,1 x 10 <sup>8</sup>	1,641	3,5 x 10 <sup>8</sup>
CA	2,417	3,4 x 10 <sup>8</sup>	1,403	2,5 x 10 <sup>8</sup>
CI-1	2,446	7,0 x 10 <sup>8</sup>	1,442	3,8 x 10 <sup>8</sup>
CI-12	1,194	4,3 x 10 <sup>6</sup>	0,457	3,1 x 10 <sup>6</sup>
CI-18	2,623	7,6 x 10 <sup>8</sup>	1,971	3,9 x 10 <sup>8</sup>
CA-5	2,048	4,2 x 10 <sup>8</sup>	1,361	1,1 x 10 <sup>8</sup>
ATCC 10987	1,408	4,1 x 10 <sup>8</sup>	n.g.	n.g.
<i>B. th.</i> konk.	1,441	5,1 x 10 <sup>8</sup>	n.g.	n.g.
DSM 31	1,470	6,7 x 10 <sup>8</sup>	n.g.	n.g.
<b>2. Extraktion</b>				
UDIII-7	2,011	1,2 x 10 <sup>8</sup>	1,369	1,9 x 10 <sup>8</sup>
Vollum	2,177	1,2 x 10 <sup>8</sup>	1,287	3,8 x 10 <sup>8</sup>

Stamm	OD <sub>600</sub> - LB	KBE/ml - LB	OD <sub>600</sub> - RM	KBE/ml - RM
CI	2,601	5,9 x 10 <sup>8</sup>	1,450	3,0 x 10 <sup>8</sup>
CA	2,344	3,4 x 10 <sup>8</sup>	1,497	2,6 x 10 <sup>8</sup>
CI-1	2,289	7,1 x 10 <sup>8</sup>	1,369	2,9 x 10 <sup>8</sup>
CI-12	1,259	6,2 x 10 <sup>6</sup>	0,687	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CI-18	2,487	6,6 x 10 <sup>8</sup>	1,802	2,9 x 10 <sup>8</sup>
CA-5	2,118	6,2 x 10 <sup>8</sup>	1,491	2,7 x 10 <sup>8</sup>
ATCC 10987	1,507	7,1 x 10 <sup>8</sup>	n.g.	n.g.
<i>B. th. konk.</i>	1,493	5,2 x 10 <sup>8</sup>	n.g.	n.g.
DSM 31	1,407	6,1 x 10 <sup>8</sup>	n.g.	n.g.
<b>3. Extraktion</b>				
UDIII-7	2,174	2,2 x 10 <sup>8</sup>	1,347	1,8 x 10 <sup>8</sup>
Vollum	2,226	1,9 x 10 <sup>8</sup>	0,751	6,5 x 10 <sup>8</sup>
CI	2,304	4,3 x 10 <sup>8</sup>	1,595	3,0 x 10 <sup>8</sup>
CA	1,977	1,6 x 10 <sup>8</sup>	0,923	7,8 x 10 <sup>8</sup>
CI-1	2,077	1,6 x 10 <sup>8</sup>	1,300	1,3 x 10 <sup>8</sup>
CI-12	1,991	1,0 x 10 <sup>7</sup>	0,656	2,6 x 10 <sup>7</sup>
CI-18	2,281	6,1 x 10 <sup>8</sup>	1,845	3,2 x 10 <sup>8</sup>
CA-5	1,884	3,3 x 10 <sup>8</sup>	1,491	1,9 x 10 <sup>8</sup>
ATCC 10987	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
<i>B. th. konk.</i>	1,523	7,0 x 10 <sup>8</sup>	n.g.	n.g.
DSM 31	1,541	6,6 x 10 <sup>8</sup>	n.g.	n.g.

n.g. = nicht getestet, LB = Anzucht unter nicht-induzierenden Bedingungen, RM = Anzucht unter induzierenden Bedingungen, *B. th. konk* = *B. thuringiensis* sv konkukian

**Tabelle 23: RNA-Konzentrationen**

Ergebnisse der RNA-Konzentrationsbestimmungen auf Grundlage der Messungen der Absorption A260/280 aus Kulturen von *B. anthracis*, *B. cereus* bv *anthracis*, *B. cereus* und *B. thuringiensis* nach 4,5 Stunden Wachstum. Angaben in ng/µl.

n.g. = nicht getestet, LB = Anzucht unter nicht-induzierenden Bedingungen, RM = Anzucht unter induzierenden Bedingungen, *B. th. konk.* = *B. thuringiensis* sv konkukian

Stamm	1. Extraktion		2. Extraktion		3. Extraktion	
	LB	RM	LB	RM	LB	RM
UDIII-7	689,2	374,9	708,9	466,5	971,0	818,4
Vollum	605,9	172,0	736,5	428,4	417,8	972,5
CI	1118,1	571,8	867,4	372,5	352,9	937,4
CA	1086,5	160,7	308,0	747,9	775,4	769,5
CI-1	207,6	216,6	1490,5	19,7	417,3	748,5
CI-12	192,4	153,9	1287,9	56,5	411,1	598,5
CI-18	206,0	205,9	898,7	1072,0	397,0	1038,0
CA-5	170,4	195,8	701,5	122,0	297,1	719,0
ATCC 10987	n.g.	n.g.	1291,8	n.g.	883,7	n.g.
<i>B. th. konk.</i>	682,6	n.g.	810,0	n.g.	1074,0	n.g.
DSM 31	163,8	n.g.	325,9	n.g.	499,3	n.g.

**Tabelle 24: Oligonukleotidsequenzen der verwendeten Primer und Sonden**

Oligonukleotid	Sequenz
acpA-cDNA	5'-ATATTTTTGCATGTCCTCCTAC-3'
acpA-R	5'-GTTGTTTCCCTATTGCTACAATGC-3'
acpA-S	5'-GGGGAGCAGAAATGAAATTAACAG-3'
acpA-TM	5'-Fam-AGTTACCTTTGCGATTTCCCTCATCGGGAAT-Tamra-3'
alo-for	5'-GTGATTTTTCTGAACATTAAGAAAA-3'
alo-rev2	5'-GGATGTTTAGGTAGTTCCGCAC-3'
alo-rev3	5'-GCAAGTTGTACAGCTCCTGG-3'
atxA-cDNA	5'-TAATTGGGTATAAAGCTCCTAC-3'
atxA-for	5'-CGATATCCATCGAAAAGGAAC-3'
atxA-rev	5'-TGAGCTAAGGATTGCATACTG-3'
cerA-cDNA	5'-CTTTATTTTTGTATGATTCACCC-3'
cerA-ex-for	5'-TGCTTTAGCAGCAGCTATTAC-3'
cerA-ex-rev	5'-TTTTGCCTGCTTTGCAAATGG-3'
capB-cDNA	5'-GATAATCGGGTTGAACTGCC-3'
capB-R	5'-AAGTGCTTCTGCTTCTAAATCAGC-3'
capB-S	5'-GGGAAAACAACCTGGTACATCTGC-3'
capB-TM	5'-Fam-CCTCTTTAACTACCCTGCGTTGCTCACCG-Tamra-3'
coll-cDNA	5'-CCCATGACCGACATGTTGATC-3'
coll-R	5'-ATAACCATCCATATTCCATATCAACAAAAG-3'
coll-S	5'-AAGTGTATCTCTTAGTCCTAATAACAATCC-3'
coll-TM	5'-Fam-ACCACTTCCTTTACCGCCTTGAACCTCCCA-Tamra-3'
cya-seq3	5'-TCCTTTCTCGACAGCTAATTG-3'
cya-R	5'-CCCAATCCGAACTCTTCCATG-3'
cya-S	5'-TTTAGTACCAGAACATGCAGATGC-3'
cya-TM	5'-Fam-ACATTCAATCCCTTTGTAGCCACACCACTT-Tamra-3'
gyrB-R	5'-CACCATGCAAACCACCAGAAAC-3'
gyrB-S	5'-CAGGGTACTGTGACGAAATTAACG-3'
gyrB-TM	5'-Fam-CCGCCGCCAACTTACCACCAGCAT-Tamra-3'
hlyII-cDNA	5'-TACTTGCATCGGCATTTGGC-3'
hlyII-for	5'-GCAGATTCTAAAGGAACTGTAG-3'
hlyII-rev	5'-TACCTCAGAAGTAACCTTTGC-3'
lef-seq2	5'-AGGGATATTTAAGTAAAATTAATC-3'
lef-seq3	5'-CTTCTTCAGATAAAGAATCACG-3'
lef-seq5	5'-CCCTAATGCTTTATTCCATTCC-3'
pagA-seq6	5'-ATGTTAGTTGCGTTTAATTCCGC-3'

Oligonukleotid	Sequenz
PA-R	5'-CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT-3'
PA-S	5'-CGGATCAAGTATATGGGAATATAGCAA-3'
PA-TM	5'-Fam-CTCGAACTGGAGTGAAGTGTTACCGCAAA-Tamra-3'
PLC-F1	5'-TGGATGCAACCTATACCTG-3'
PLC-R2	5'-CCTTTCATATCCTCATACTC-3'
PLC-S-CI	5'-CATGATAGTGGGACGTTCAAGTTG-3'
PLC-R-CI	5'-AGCTCCATGTTCCATTTGATAACG-3'
PLC-TM	5'-Fam- ATGTTCTTGCGTCATTCCCCATGCTTGCTT-Tamra-3'
plcR-S5	5'-TTATTCATTTTTATGAGGTAC-3'
plcR-S6	5'-CCAATCAATGCCATACTATTAATT-3'
rpoB-cDNA	5'-TTTACAGATTACTGCAGCACC-3'
rpoB-1856-for	5'-CGGCAGCGACAGCTTGTATT-3'
rpoB-1941-rev	5'-AACCGCCTGACGTTGCA-3'
rpoB-1898-TM	5'-Fam-CTAACCGCGCACTTATGGGAGCGAAC-Tamra-3'
sigK-for	5'-TTGAGTCTATTCGCCGCAATTGG-3'
sigK-rev	5'-TTATTCCTTTTGCTTTTTTCTCTTTCTCTGC-3'
sigK-1	5'-TCATCGTCTGATGATAATGGC-3'
sigK-2	5'-TAATCGATCTAATGTGAGCATG-3'
sigK-3	5'-AGAATTACAAGCATTCCAAGAC-3'
sigK-4	5'-TTCTAACTAATCGATAATGCCG-3'
sigK-5	5'-GTTTCACTTCATGATCCAATCG-3'
sigK-6	5'-TACATGCAGAAACTAAGTACG-3'

**Tabelle 25: Primerkombinationen und Fragmentgrößen**

Primerkombination	Fragmentgröße in bp
acpA-S + acpA-R	84
alo-for + alo-rev3	368
atxA-for + atxA-rev	322
cerA-ex-for + cerA-ex-rev	358
capB-S + capB-R	144
coll-S + coll-R	155
cya-S + cya-R	155
gyrB-S + gyrB-R	194
hlyII-for + hlyII-rev	333
lef-seq2 + lef-seq3	588
PA-S + PA-R	203
PLC-F1 + PCL-R2	332
PLC-S-CI + PLC-R-CI	96
plcR-S5 + plcR-S6	528
rpoB-1856 + rpoB-1941	86
sigK-for + sigK-rev	417
sigK-1 + sigK-2	307
sigK-3 + sigK-2	666
sigK-6 + sigK-5	516
sigK-6 + sigK-4	1103
sigK-3 + sigK-4	672 (CI), bzw. 671 (CA)

