

# Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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