

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literatur.....	3
2.1	Der Milzbrand.....	3
2.1.1	Geschichte und Gegenwart.....	3
2.1.2	Eigenschaften von <i>B. anthracis</i>	6
2.1.3	Pathogenese und Klinik.....	8
2.1.4	Eng verwandte <i>Bacillus</i> -Spezies.....	12
2.2	Identifizierung von <i>Bacillus anthracis</i>	14
2.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	14
2.2.2	Serologische Methoden.....	16
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	16
2.2.4	Sonstige Methoden.....	17
2.2.5	Zusammenfassung der Diagnostikmethoden.....	18
2.3	Therapie und Prophylaxe des Milzbrands.....	20
2.4	Bakteriophagen.....	21
2.4.1	Die Entdeckung der Phagen.....	21
2.4.2	Lysewirkung der Phagen.....	21
2.4.3	Bekannte Phagen und ihre Anwendung.....	22
2.4.4	Phagen von <i>B. anthracis</i>	23
2.5	Phagenlysine.....	26
2.5.1	Definition und Eigenschaften von Lysinen.....	26
2.5.2	Bekannte Phagenlysine in der Anwendung.....	28
2.5.3	<i>B. anthracis</i> -spezifische Phagenlysine.....	29
3	Material und Methoden.....	31
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	Proteanalytische 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 γ -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 ₆₀₀ -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 γ -Phagentest	98
4.6.1	Ergebnisse der <i>B. anthracis</i> -Isolate im γ -Phagentest	98
4.6.2	Ergebnisse der anderen <i>Bacillus</i> spp.-Isolate im γ -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 γ -Phagentest	99
4.7.2	Vergleich der Ergebnisse der anderen <i>Bacillus</i> spp.-Isolate in den einzelnen rPlyG-Lysetests und im γ -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 γ -Phagen	121
5.3	Vergleiche in der Anwendung von γ -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

7	Summary.....	141
8	Literaturverzeichnis	143
9	Anhang.....	156
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
10	Danksagung	178
11	Erklärung	180