



UPPSALA
UNIVERSITET

Det var en gång en spor

- *Bacillus anthracis*, från mikroorganism till biologiskt vapen



Frida Wennerholm

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2012
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Arter av släktet *Bacillus* har förmågan att bilda specialiserade celler som kallas sporer. Sporen är en motståndskraftig struktur som bildas då bakteriens omgivning förändras. Processen då den encelliga prokaryoten går från vegetativ organism till latent spor kallas sporulering. Sporulering är en kraftigt reglerad multistegsprocess som tillåter organismen att överleva extrema förhållanden som den vegetativa organismen inte skulle klarat av. Människan har i decennier använt sporulerande organismer som agenter inom bioterrorism. *Bacillus anthracis* är en lättspredd och väldigt virulent bakterie. Virulens kräver dock inverkan från båda av bakteriens två virulensfaktorer, kapsel och toxiner. Dessutom är mekanismerna bakom uttryck av virulensfaktorer, liksom sporulering och differentiering strikt reglerade. Jag har med denna uppsats försökt ge en översiktlig bild av *Bacillus anthracis* samt undersöka om denna bakterie, som kan orsaka mjältbrand, skulle kunna användas som effektivt biologiskt vapen. Min slutsats är att denna organism inte är särskilt lämpad för biovapenindustrin.

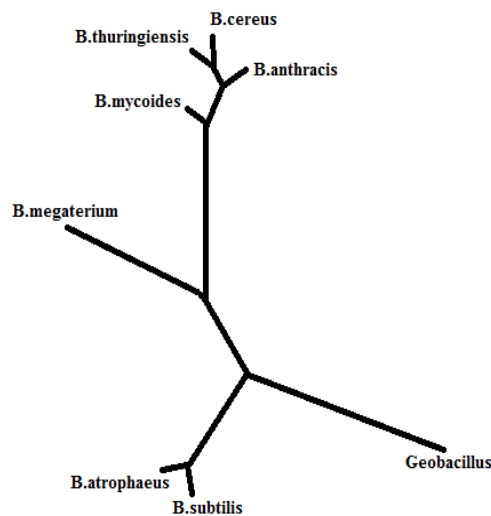
Inledning

Bacillus anthracis (*B. anthracis*) är en bakterie i familjen Bacillaceae som tillhör gruppen grampositiva bakterier i fylat Firmicutes. Det alla arter inom detta fylum har gemensamt är att de kan sporulera och bilda endosporer (Murray *et al.*, 2009). Med sporulering menas att bakterien kan gå från att vara en vegetativ organism till att bli en spor. En spor är en otroligt motståndskraftig struktur som bakterien kan anta vid påverkan av yttre stressfaktorer. Sporer har både värmeresistenta egenskaper och förmåga att överleva i >65°C (Bergman *et al.*, 2006) såväl som resistens mot toxiska kemikalier, strålning samt högt tryck (Nicholson *et al.*, 2000). Sporulering är för bakterien ett mycket effektivt sätt att temporärt gå i dvala i väntan på en mer främjande omgivning och när bakterien väl blivit en spor kan den stanna i sporstadiet i decennier. Tecken tyder på att bacillussporer återfunna i bärnstensbevarade bin från Dominikanska republiken fortfarande är livsdugliga efter mellan 25 och 40 miljoner år (Cano & Borucki, 1995). Det är även till fördel för bakterien att sporulera för att underlätta den luftburna spridningsprocessen då det är förmånligt att väga mindre. En bacillusspor är c:a 0,8-1,2 µm lång jämfört med en vegetativ bakterie på 3-8 µm (Ricca & Cutting, 2003; Murray *et al.*, 2009).

Människan har tagit väl till vara på det faktum att bakterier sporulerar och med ny kunskap och nya tekniker kan denna process appliceras på användningsområden som krigsföring, insektsbekämpning och näringsliv. Som bekämpningsmedel kan bacillussporer användas genom att spridas ut i våtmarker där insektslarvskoncentrationen vanligtvis är hög. Väl i vatten tas sporererna upp av de filtrerande larverna. När miljöombyte sker inuti larven kommer sporen utsöndra toxin som bryter ned larvens tarmepitel och dödar larven. Denna förebyggande insektsbekämpningsprocess har använts bland annat vid nedbrytning av mygglarver i nedre dalälven (Länsstyrelsen Västmanlands län, 2003). Inom industrin används *Bacillus* bland annat aktivt inom enzymproduktion, då främst inom produktion av proteolytiska enzym (Spudich & Kornberg, 1969; Rao *et al.*, 1998). *Bacillus* har även använts som biologiskt vapen. Ett mindre antal sporer i krigsföring kan ge förödande effekter, både ekonomiskt och hälsomässigt då sporererna är svåra att avlägsna och kan ge upphov till mjältbrand (anthrax). I Amerika 2001 upptäcktes sporer av *B. anthracis* som skickats med brev till olika destinationer runt om i landet. Dessa brev resulterade i fem dödsfall och katastrofala ekonomiska effekter (Joshi *et al.*, 2004). Med terrorattackerna 2001 i åtanke tänker jag i denna uppsats fokusera på *Bacillus* strikt reglerade sporuleringsprocess: Hur sporererna verkar i kontakt med människan samt, med avseende på spridningsförmåga och virulens, om *Bacillus* skulle kunna användas som ett effektivt biovapen.

Bacillus anthracis

Bacillus anthracis är en stavformad jordlevande bakterie av släktet *Bacillus*. Bakterien är en ickemotil fakultativt anaerob organism vilket innebär att den kan leva både med och utan syre samt saknar förmåga att röra sig (Murray *et al.*, 2009). Det finns över 200 arter inom släktet *Bacillus* och över 100 olika stammar av arten *B. anthracis*. De mest studerade är de icke-virulenta Sterne- och Pasteurstammarna och den virulenta Amesstammen (Murray *et al.*, 2009; CDC, 2012). Denna uppsats kommer ställa *B. anthracis* i centrum men då bakterien är en högriskspatogen som enbart kan behandlas i speciella isolerade anläggningar under särskilda omständigheter kan det dock vara svårt att bedriva forskning inom dess område (Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, 2012). I vissa fall kan istället ickepatogena närbesläktade *Bacillus* arter användas som substitutorganismer då de, fylogenetiskt sett, inte är speciellt olika (fig.1) (Greenberg *et al.*, 2012). I andra fall kan även icke-virulenta stammar av *B. anthracis* användas (Tamplin *et al.*, 2007).

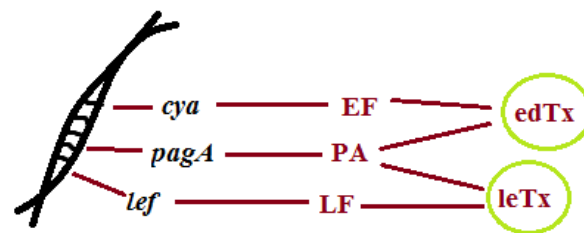


Figur 1. Fylogenetiskt träd som visar släktskapet mellan olika arter av *Bacillus*, baserat på 16s rRNA sekvensering. Modifierad version utifrån original av Greenberg *et al.* (2010)

Två plasmider har isolerats från *B. anthracis*. En plasmid är ett cirkulärt extrakromosomalt genetiskt element som är separerat från cellens eget genomiska DNA. Plasmiderna i *B. anthracis* kallas pXO1 och pXO2 (Kaspar & Robertson, 1987). För att *B. anthracis* ska vara virulent måste båda plasmiderna finnas i genomet. Som tidigare nämns finns många olika stammar av *B. anthracis*. Den ickevirulenta Sternestammen är ickevirulent eftersom den enbart bär på pXO1-plasmiden, likaså Pasteurstammen som enbart bär på pXO2 plasmiden. Medan bakterier i Amesstammen bär på både pXO1 och pXO2 (Tamplin *et al.*, 2007). *In vitro* går det att avlägsna plasmider antingen genom att odla stammarna i 43°C eller genom antibiotikabehandling (Mikesell *et al.*, 1983). Förutom plasmider har *B. anthracis* en kromosom på c:a 5227 kbp med 5508 kodande sekvenser, många vars protein är inblandade i virulens (Read *et al.*, 2003).

pXO1

pXO1-plasmiden är 174 kbp lång och innehåller bland andra de toxinproteinkodande generna *pagA*, *lef* och *cya* samt regulator genen *atxA*. Genen *cya* kodar för proteinet EF (edema factor), *lef* för LF (anthrax toxin lethal factor) och *pagA* för PA (anthrax toxin protective antigen)(Mikesell *et al.*, 1983; Okinaka *et al.*, 1999). Dessa tre proteiner utgör ensamma ingen skada men i olika kombinationer bildar de två toxiner. PA i kombination med EF bildar edTx, ett toxin som inducerar ödem (svullnad på grund av vätskeansamling) medan PA i kombination med LF bildar LeTx, ett dödligt toxin (fig.2) (Stanley *et al.*, 1961). PA måste närvara för att toxiner ska ha någon effekt då PA binder till målceller runt bakterien och fungerar som en ”inkörsport” för övriga toxiner.



Figur 2. Schematisk bild över hur olika kombinationer av genprodukterna EF, PA och LF kodade från generna *cya*, *pagA* och *lef* ger upphov till toxinerna edTx och leTx.

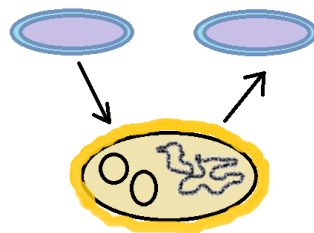
En studie av Koehler *et al.* (1994) tyder på att uttryck av *pagA* ökar betydligt vid högre CO₂-halt. Experimenten visar att transkription av *pagA* och syntes av PA ökar med fem gånger vid 5% CO₂ och nästan 20 gånger vid 20% CO₂. Vidare visar forskning att uttrycket av toxiner ökar vid temperatur >37° C samt vid ökad bikarbonatkoncentration (Sirard *et al.* 1994). Genen *atxA* kodar för atxA-protein som aktiverar och reglerar transkription av de toxinkodande generna *pagA*, *lef* och *cya* men forskning visar att *atxA* även reglerar vissa gener på pXO2 (Guignot *et al.*, 1997).

pXO2

pXO2-plasmiden är 95 kbp lång och bär på bland annat generna *cap A*, *cap B* och *cap C* som kodar för protein CapA, CapB, CapB' och CapC som tillsammans utgör bakteriens kapsel (Kaspar & Robertson, 1987; Makino *et al.*, 1989). En kapsel är en struktur som omger bakterien (i dess vegetativa form) och gör höljet slemmigt så att den lättare kan undvika fagocytos av värdens immunförsvar. Den primära kapseln (H-kapsel) består av D-glutaminsyra (Hanby & Rydon, 1946; Makino *et al.*, 1989). Vidare bär plasmiden på generna, *acpA* och *acpB* vars protein, på olika sätt, reglerar *capABC* generna. Data tyder på att *acpA* och *acpB* är reglerade av *atxA* från pXO1 och styr CapB vars genuttryck ökar 100-tals gånger då bakterien odlas i medium med hög CO₂-halt. Detta innebär att bakterien känner av då CO₂ halten stiger var på uttryck av *acpA* och *acpB* ökar vilket i sin tur leder till induktion av CapB och kapselbildning (Drysdale *et al.*, 2005). Den sista kända virulensgenen lokaliserad på pXO2 är *dep* vars genprodukt agerar genom att bryta ned den initiala kapseln (H-kapsel) och avsöndra dess beståndsdelar ut ur värdcellen. Detta leder till att H-kapseln blir till den tunnare L-kapseln. Denna strategi används av bakterien för att vilseleda värdens immunförsvar som då får svårare att identifiera bakterien. Makino *et al.* (2002) har visat att nedbrytningen av H-kapseln verkar vara en viktig mekanism i *B. anthracis* patogenesis. De har visat att mutanter som saknar *dep* inte är virulenta på grund av att de direkt blir igenkända och fagocyterade av immunceller.

Livscykel

Experiment utförda av Bergman *et al.* (2006) visar att det tar c:a åtta timmar för *B. anthracis* att slutföra en livscykel *in vitro*. Med en livscykel menas den tid det tar för sporer, odlade på medium, att differentiera från endospor till vegetativ cell och tillbaka till endospor igen (fig.3). Detta sker genom att initiala sporer exponeras för germinanter. Germinanter är specifika näringsämnen eller aminosyror i omgivningen som binder till specifika receptorer i spormembranet (Bergman *et al.*, 2006). Den enda germinanten som ensam kan binda till *B. anthracis*-receptorer och leder till kraftfull (>50%) och snabb (inom 30 min) differentiering är L-alanin. Liknande men mindre kraftfull effekt kan observeras genom tillsättning av kombinationen L-alanin och L-histidin, L-tyrosin och L-tryptofan eller L-alanin och L-prolin. Dessa olika effekter kallas AEA-respons (aromatic-enhanced alaninerespons)(Ireland & Hanna, 2002). Efter germinantbindning börjar sporer differentiera och bli vegetativa bakterier. Denna bakteriepopulation ökar i densitet tills näringsämnena (huvudsakligen alanine) tar slut, då bakterierna åter påbörjar sporuleringsprocessen (Bergman *et al.*, 2006).



Figur 3. Livscykel *in vitro* av *Bacillus anthracis*. Process som tar c:a åtta timmar.

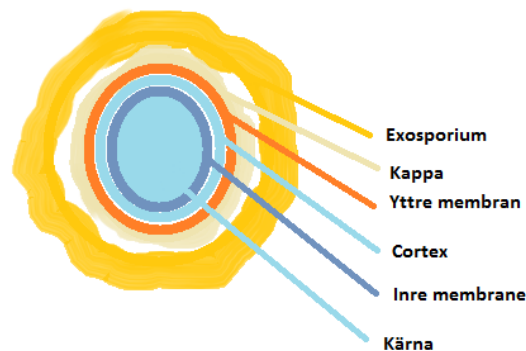
I naturlig miljö ser denna livscykel annorlunda ut. Det är ännu oklart om *B. anthracis* är en bakterie som, i naturen, på egen hand kan komplettera en livscykel eller om en värdorganism behövs. Sporer återfinns oftast i jordarter som inte har vad som krävs för att differentiering ska påbörjas och intas oavsiktligt av herbivorer. Bakterierna börjar sedan differentiera i den lämpliga (hög temperatur, mycket näring) omgivningen inne i djuret. De vegetativa cellerna uttrycker sedan virulensfaktorer som gör att de kan fly undan värdens immunförsvar, öka populationsdensiteten och utsöndra toxin som dödar värden. När djuret dött och ruttnat eller ätits upp av karnivorer och bakterierna återigen kommer i kontakt med syre startar sporuleringen på nytt och livscykeln är slutet (Roth *et al.*, 1955; Hugh-Jones & Blackburn, 2009). Det är ännu osäkert om sporer kan differentiera till vegetativa bakterier i jorden då undersökningar visar att bakterierna är väldigt känsliga och har svårt att överleva i sitt vegetativa tillstånd utan värd. Dock finns data, från undersökningar i reglerad miljö, som tyder på att bakterien kan differentiera i rhizosfären (rotzonen) hos vissa växter (Saile & Koehler, 2006; Hugh-Jones & Blackburn, 2009). Andra experiment *in vitro* gjorda av Lee *et al.* (2007) visar att *B. anthracis* kan överleva bättre i sitt vegetativa tillstånd om den bildar biofilm. Biofilmbildning kan skydda bakterien mot antibiotika samt ogynnsamma förhållanden i den naturliga miljön. Vidare visar experimenten att sporer bildas i biofilmen vid låg CO₂ koncentration.

Bergman *et al.* (2006) har granskat vilka gener som uttrycks under *B. anthracis* livscykel. Deras forskning visar att det är närmare 5000 stycken uppdelade i fem olika stadier. De två första stadierna infinner sig då bakterien är inuti en värdorganism. Det första börjar bara några minuter in i differentieringsprocessen från spor till vegetativ cell. De gener som uttrycks då är till mesta dels inblandade i proteinsyntes, transportproteiner samt DNA-reparationsproteiner, det som behövs för bakterien att "börja sitt liv". Nästa stadium börjar redan efter 30 minuter in i differentieringen då gener uttrycks som är inblandade i tillväxtprocessen. Dessa proteiner är bland andra enzymer inblandade i ATP-syntes som

genererar den energi som bakterien behöver för att växa och föröka sig. Efter c:a två timmars tillväxt infaller det tredje stadiet då gener inblandade i fortsatt tillväxt, som metabolism, men även gener inblandade i respons av yttre stimuli, uttrycks. I samband med uttryck av gener i tredje stadiet börjar tillväxten stanna upp. Två timmar senare startar uttryck av gener i fjärde stadiet. Dessa gener kodar för proteiner nödvändiga i sporuleringsprocessen. Enbart 30 minuter in i fjärde stadiet börjar gener i sista och femte stadiet uttryckas. Dessa proteiner, inblandade i transport och proteinsyntes, liknar de som uttrycks i första stadiet och förbereder bakterien för sporfasen.

Spor

En spor från *B. anthracis* består av c:a 750 olika proteiner och hur bakterien levt före sporfasen verkar avspegla stabiliteten i proteinerna. Experiment visar att beroende på bakteriens biokemiska omgivning, det vill säga vilket medium den odlas i, kan olikheter i proteinstrukturer observeras. Dock är dessa sporbildande proteiner i regel mer stabila än övriga proteiner (Bergman *et al.*, 2006).



Figur 4. Sporstruktur lager för lager. Inifrån och ut: kärna, inre membran, cortex, yttre membran, kappa och ytterst exosporium.

Sporens innersta kärna innehåller en kopia av *B. anthracis* kromosom samt en hög koncentration av DPA (dipikolinsyra) inneslutet av Ca^{2+} (CaDPA) i en ratio 1:1. CaDPA bildar en solid massa i kärnan (Kong *et al.*, 2012). I många *Bacillus*-arter finns även ASSP (acid-soluble-spore-proteins) α , β och γ i kärnan som fungerar som lagringsproteiner vid sporulering och bryts ned vid differentiering (Johnson & Tipper, 1981). Det inre membranet, runt kärnan, är det som från början var det cytoplasmiska membran som omfattade hela bakterien. Inbäddat i det inre membranet finns näringsgerminantreceptorer (nGR's). Dessa receptorer är uppbyggda av tre olika proteintyper, typ A, typ B och typ C, speciellt uttryckta under sporuleringen (Wilson *et al.*, 2011). Runt det inre membranet finns cortex uppbyggt av peptidoglykan (Dowd *et al.*, 2008). Cortex omringas av ett yttre membran som omges av kappan (fig.4) (Giorno *et al.*, 2007).

Kappan består av flera olika proteiner. SpoIVA-protein ansamlas till en början på utsidan av det som i detta stadium kallas förspor. I nästa steg binder proteinet CotE (spore coat protein E) och CotH (spore coat protein H) tillsammans med andra "försporsproteiner" till SpoIVA. CotE proteiner hamnar ytterst i denna struktur. Alla dessa proteiner bildar tillsammans ett tunt, kompakt lager som blir kappan. CotE verkar vara ansvarig för sammanhållningen mellan kappan och yttre exosporium då CotE mutanter bildar sporer som verkar ha tappat sin elastiska förmåga och har en större icke-kompakt kappa samt saknar exosporium. CotH verkar vara det protein som kontrollerar de utvecklingsbromsande proteinerna då experiment visar att

CotH mutanter mer frekvent differentierar till vegetativa celler från sporstadiet (Giorno *et al.*, 2007).

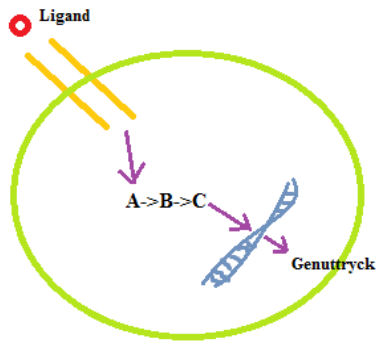
Exosporium är den yttersta filamentstrukturen av sporen och den struktur som är i kontakt med omgivningen. Den består av fem olika protein, BclA, BxpA, BxpB, alaninracemas och superoxiddismutas. BclA är ett immunodominant glykoprotein vilket innebär att det är ett antigen som till stor del ansvarar för immunoresponsen framkallad av patogenen. Detta kan bevisas då de flesta antikroppar mot sporer har BclA som mål (Steichen *et al.*, 2003).

Hur startar sporuleringen?

Signaler från omgivningen triggat eller hämmar sporuleringsprocessen och detta sker via ett tvåkomponentssystem. Tvåkomponentssystemet är ett välstuderat system som ofta förekommer i mikroorganismer. Via detta system känner organismen av förändringar i miljön och inducerar på grund av det transkription som leder till förändrat genuttryck (Varughese, 2002). Aktivering av detta system innebär att en sensor med ”signaligenkänningsdomän” på cellens utsida och ”aktiveringsdomän” på cellens insida känner av signaler från omgivningen som påverkar sporuleringen. Sensorerna är uppbyggda av histidinkinaset. (Brunsing *et al.*, 2005). När histidinkinaset aktiveras av yttre stimuli kan detta i sin tur katalysera reaktioner på insidan av cellen via fosforylering av sensorns inre domän. Den fosforylerade domänen av histidin på kinasetts insida agerar sedan som transportör och skickar vidare fosfatgruppen till en transkriptionsfaktor som i sin tur inducerar eller hämmar genuttryck. Stimulering av vissa specifika histidinkinaser hämmar sporulering medan det verkar vara aktivitet av multipla sensorer som triggat processen (Brunsing *et al.*, 2005). Även det faktum att olika kinassensorer tar upp olika mycket plats i membranet kan spegla hur nödvändigt det är för bakterien att sporulera vid en specifik signal. Samma bakterieart har ofta många olika kinassensorer vilket kan tyda på att sensorerna är viktiga för bakterien eftersom den är relativt känslig i sitt vegetativa tillstånd och snabbt måste kunna känna av olika förändringar i miljön (Stephenson & Hoch, 2002).

Två-komponentssystemet + fosfatöverföring

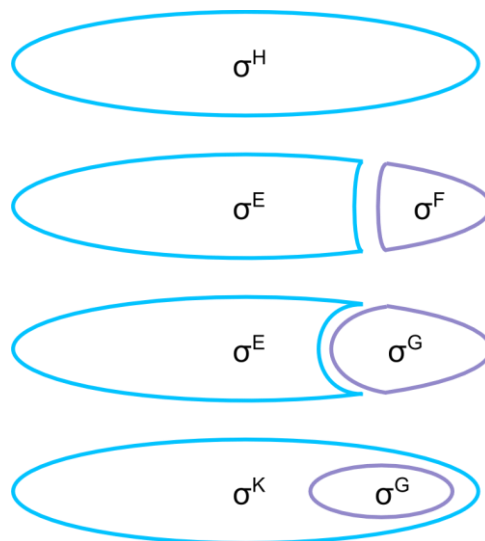
I *Bacillus* är mekanismen lite mer komplicerad än det vanliga tvåkomponentssystemet. Det börjar på liknande sätt då signaleringen sker via bindningen av en yttre ligand som aktiverar inre domänen av sensorkinaset. Denna domän katalyserar regulatort Spo0F, som saknar DNA-bindningsdomän, genom överföring av en fosfatgrupp. Denna fosfatgrupp överförs sedan till en reglerande transkriptionsfaktor Spo0A, med DNA-bindningsdomän. Denna överföring sker via ett fosfat-transferas, Spo0B. Spo0A kan sedan aktivera eller inaktivera gener som gynnar eller hämmar sporulering (fig.5). Ett exempel är inaktivering av *abrB*-genen vars AbrB-protein hämmar sporuleringsprocessen (Varughese, 2002). Homologer till Spo0F, Spo0B och Spo0A i *B. subtilis* har identifierats i *B. anthracis* (Brunsing *et al.*, 2005). Som en extra regleringsmekanism har ytterligare ett protein identifierats i *B. anthracis*, nämligen Spo0E. Spo0E fungerar som en negativ regulator och defosforylerar Spo0A när det inte är passande att sporulera, trots yttre signaler (Bongiorni *et al.*, 2007).



Figur 5. Schematisk bild över tvåkomponentsystemet + fosfatöverföring. 1) Ligand binder till histidinkinassensorreceptor. 2) Receptorn katalyserar aktivering av Spo0F (A) via fosforylering. 3) Spo0F aktiverar Spo0B (B). 4) Spo0B aktiverar Spo0A (C) som sedan binder till DNA och inducerar genuttryck.

Sigmafaktorer

Vid transkription binder RNA-polymeras till en promotorregion i DNA. För att känna igen promotorsekvensen har RNA-polymeraset olika extra proteiner bundet till sig; dessa proteiner kallas sigmafaktorer. Det finns c:a 25 sigmafaktorer i *B. anthracis*, var och en ansvarig för en specificerad samling genuttryck under livscykeln (Bergman *et al.*, 2006). Dessa sigmafaktorer har jämförts med check-points i cellcykeln av eukaryotiska celler. De mest studerade, sporulationsspecifika, sigmafaktorerna är σ^E , σ^F , σ^G , σ^H och σ^K . Där σ^H induceras precis innan sporuleringsprocessen börjar, direkt följt av σ^F och σ^E . Dessa två syntetiseras i det som kommer att kallas modersporen. σ^G syntetiseras c:a en timme senare i det som kallas försporen, följt av σ^K -syntes i modersporen (fig.6). Uttryck av sigmafaktorer i *B. anthracis* verkar följa samma mönster som i den välstuderade *B. subtilis*. Det verkar även rimligt att dessa har samma funktion i de båda arterna (Liu *et al.*, 2004).



Figur 6. Sigmafaktorer uttryckta under sporuleringsprocessen i *B. anthracis*. Varje sigmafaktor ansvarar för en specifik grupp genuttryck under sporuleringen. Sigmafaktorerna syntetiseras antingen i modercellen eller i försporen.

Korsreglering av σ^F , σ^E , σ^G , σ^K

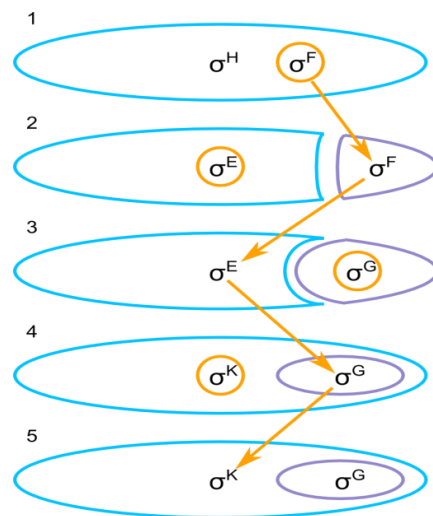
σ^F syntetiseras i modersporen men aktiveras först i försporen efter separation av de båda cellerna. Detta kan ske genom att ett annat protein, SpoIIAB, fungerar som en anti- σ -faktor och hämmar σ^F . Ett ytterligare protein, SpoIIAA fungerar som en anti-anti- σ -faktor och hämmar SpoIIAB (Schmidt *et al.*, 1990) enligt följande.



Detta fungerar genom att SpoIIAB och SpoIIAA till en början återfinns som komplex i modercellen. Vid hög nivå av ATP inaktiveras SpoIIAA och ”släpper taget” om SpoIIAB som då kan binda till σ^F och hämma aktivitet. I försporen är ATP-nivån låg vilket gör att det inte finns energi nog att splittra komplexet SpoIIAB/SpoIIAA som fortsätter att sitta ihop så att det inte kan ske någon hämning av σ^F . På så sätt kan σ^F syntetiseras i modersporen före celledelning men förbli inaktiv tills aktivering kan ske i försporen (Diederich *et al.*, 1994). En annan mekanism som hjälper till att aktivera σ^F är aktiviteten av fosfataset SpoIIE som i sin tur kan aktivera SpoIIAA. När SpoIIAA är aktiv kan den åter binda upp SpoIIAB så denne inte längre kan hämma σ^F (Arigoni *et al.*, 1996).

Efter aktivering av σ^F kan denna sigmafaktor aktivera SpoIIR som i sin tur aktiverar det membranbundna proteinet SpoIIGA. SpoIIGA är ett proteas som klyver och aktiverar nästa sigmafaktor σ^E , i modersporen (Imamura *et al.*, 2008). σ^F i försporen ersätts sedan av σ^G . Detta sker genom att σ^F aktiverar genen som kodar för σ^G (Sun *et al.*, 1989). σ^G inleder även i sin tur genuttryck av samma gen vilket leder till inducerad positiv feedback och ökad mängd av σ^G (Sun *et al.*, 1991). σ^F och σ^G aktiverar även proteinet Fin som hämmar σ^F och tvingar därigenom aktivering av σ^G (Camp *et al.*, 2010).

En transkriptionsfaktor som binder till DNA och inducerar genuttryck behöver både RNA-polymeras att binda till och byggmaterial till de proteiner som generna kodar för. Med både σ^F och σ^G uttryckta samtidigt i försporen (en kortare period innan komplett byte skett) minskar tillgängligt RNA-polymeras. Detta stärker teorin om att σ^F och σ^G måste tävla om RNA-polymeras (Camp *et al.*, 2010). Parallellt med att den aktiverade σ^F i försporen aktiverar σ^E i modersporen och sedan triggas byte från σ^F till σ^G (fig.7) kommer byggmaterialet ta slut och förmågan att syntetisera mer material i försporen gå förlorad. Detta problem löses genom att en försörjningskanal syntetiseras mellan förspor och moderspor. σ^F reglerar uttryck av protein spoIIQ som tillsammans med åtta membranproteiner bygger upp denna kanal (Londoño-Vallejo *et al.*, 1997; Eichenberger *et al.*, 2003). Denna kanal kan sedan förse försporen med material så de nya σ^G -aktiverade proteinerna kan börja uttryckas. Om denna kanal enbart överför byggmaterial till försporen eller om den även överför ett regleringsprotein som aktiverar σ^G är ännu omdiskuterat (Meisner *et al.*, 2008; Camp & Losick, 2009). Väl aktiverad reglerar σ^G proteaset spoIVB (Gomez *et al.*, 1995). SpoIVB



Figur 7. Korsreglering av sigmafaktorer. 1) σ^H syntetiseras precis innan sporuleringsprocessen börjar. σ^F syntetiseras innan celledelning men hämmas tills omlokalisering till en av polerna sker. 2) Väl vid en pol aktiveras σ^F och 3) inducerar aktivering av σ^E i modersporen via membranbundna protein. 4) σ^E aktiverar σ^G via en kanal som byggs upp mellan moderspor och förspor. 5) σ^G i försporen aktiverar till sist σ^K i modersporen.

är ett serinendopeptidas som syntetiseras i försporen men som utsöndras genom membranet till modersporen där det klyver sig självt till tre olika proteiner (Wakeley *et al.*, 2000). Dessa proteiner aktiverar bland annat ett metalloproteas som inducerar klyvning av σ^K . Avlägsnandet av dessa aminosyror leder till aktivering av σ^K (Rudner *et al.*, 1999).

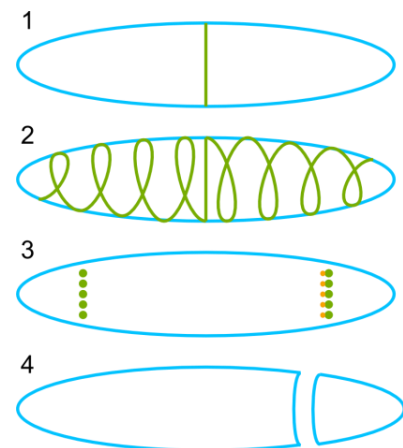
Vilka sigmafaktorer reglerar vilka genuttryck under sporuleringen?

Då *B. anthracis* och *B. subtilis* har relativt homologa genom kommer denna sektion beskrivas med avseende på *B. subtilis*.

Själva sporuleringsprocessen är uppdelad i fem olika faser. Den första fasen infaller då yttre signaler triggar sporulering av den vegetativa bakterien via bindning av ligand till histidinkinassensorer i bakteriens membran. Målet med denna fas är att inducera assymetrisk celledelning så slutprodukten blir en större modercell och en mindre förspor. Celledelningen startar då en ansamling protein, FtsZ-protein, bildar en ring (Z-ring) runt mitten av cellen. FtsZ-filament polymeriseras sedan som en utgående spiral från Z-ringen mot cellens poler. När filamenten väl når polerna lossnar dessa från mitten och bildar två separata Z-ringar runt cellens båda poler (Ben-Yehuda & Losick, 2002). En av dessa Z-ringar binder sedan till SpoIIE fosfatas. SpoIIE fosfatas bildar då en egen ring parallellt med Z-ringen som stabiliserar strukturen. Detta komplex inducerar sedan membranfission (Lucet, 2000). Formationen av Z-ringar regleras av transkriptionsfaktorn Spo0A, genom att den aktiverar SpoIIE och σ^H som inducerar transkription av FtsZ (Ben-Yehuda & Losick, 2002). Z-ringarna kommer att inducera membranfission vid en av ringarna och bilda en avgränsande struktur, även kallad septum (fig.8).

Parallellt med att denna avgränsning görs måste en kopia av originalkromosomen pumpas in i försporen. Detta sker med hjälp av ett proteinet SpoIIIE DNA translocase. För att undvika att det hydrofoba DNA kommer i kontakt med den hydrofoba delen i membranet bildar SpoIIIE ett translocations-komplex som fungerar som en isolerande tunnel genom septum (Fleming *et al.*, 2010). Mandelstam och Higgs (1974) visade att c:a 15 minuter efter att replikationen har startat når *B. subtilis* en topp i sporulationskapacitet. De bakterier som flyttas till sporinducerande medium efter det att replikation är fullbordad bildar inga sporer medan de som har flyttats i början av replikation bildar sporer. Det är möjligt att denna topp infaller just efter att gener inblandade i sporulationsprocessen har replikerats. Parallellt med denna process aktiveras σ^G som uttrycker nGR proteiner som integreras i det inre membranet på den blivande sporen (Wilson *et al.*, 2011).

Fas två infaller då förspor och moderspor är åtskilda och båda har en kopia av kromosomen. I denna fas sker omslutningen när modersporens cellmembran migrerar runt försporen vilket resulterar i en mindre cell inuti en större cell. Morlot *et al.* (2010) har med sin forskning visat att proteinerna inblandade i denna process är SpoIID, SpoIIP och SpoIIM. Data tyder på att SpoIID och SpoIIP tillsammans degraderar peptidoglykanet runt försporen så att migration av modersporens membran kan ske. Både fas ett och fas två regleras tillsammans av σ^E och σ^F om vart annat (Illing & Errington, 1991).



Figur 8. Assymetrisk celledelning av *B. anthracis*. 1) FtsZ-protein bildar en Z-ring runt cellern. 2) polymerisering av FtsZ-filament i spiralliknande struktur från mitten mot polerna. 3) Två Z-ringar runt var pol. Den högra binder och stabiliseras av SpoIIE. 4) Membran fission induceras och septum bildas.

I fas tre och fyra byggs cortex och sporkappan upp runt försporen. Syntesen av dessa strukturer är reglerad av σ^E vilken kan aktivera proteiner i modercellen som hämmar cortexformation och startar kappbildning (Ebmeier *et al.*, 2012). I den sista fasen byggs exosporium runt sporen och BclA uttrycks i hög koncentration. Denna fas är troligtvis reglerad av σ^K då *bclA* ligger nära en promotorsekvens som känns igen och regleras av σ^K (Steichen *et al.*, 2003).

Inverkan på människan

Mjältbrand orsakas av *B. anthracis* och är en infektionssjukdom som kan förekomma på huden, i lungorna eller i mag- och tarmkanalen. Mjältbrandsinfektion på huden är den vanligaste (95% av alla rapporterade fall) och infaller när bakterien kommer i kontakt med huden via skador såsom skrubbsår och blåsor eller via myggbett. En sådan infektion är relativt ofarlig och leder sällan till dödsfall (CDC, 2012). Kontakten mellan bakterie och hud resulterar i att bakterien uttrycker toxinet edtX, som är en kombination av EF och PA. PA utsöndras från bakterien och binder till speciella PA-receptorer på värdens hudceller. EF binder sedan till PA och tas in i cellen genom endocytos. LF kan även binda denna receptor. EF är ett adenylatcyklas som konverterar ATP till cAMP vid kontakt med calmodulin i cellens cytoplasma. Forskning visar att cAMP-produktion då kan öka upp till 200 gånger det normala och orsaka ödem (Leppä, 1982). Svullnaden är svartfärgad vilket är karaktäristiskt för mjältbrand då ordet anthrax kommer från grekiskans *anthracos* som betyder kol. En mjältbrandsinfektion i mag- och tarmkanalen kan uppkomma efter intag av infekterat kött. Detta leder till en akut infektion av tarmen och orsakar dödsfall i 25-60% av fallen (CDC, 2012).

Infektionen som kommer från inandning av sporer är den farligaste formen och leder ofta till döden. Denna infektion är väldigt svår att upptäcka då infektionssymptomen liknar vanliga förkylningssymptom (CDC, 2012). Sporer av *B. anthracis* tas upp av makrofager via fagocytos i alveolerna. Efter detta differentierar sporer snabbt till vegetativa bakterier. Kort tid efter differentiering flyr bakterierna ut i cytoplasman på fagocyten, förökar sig och uttrycker toxiner som bryter ned värdcellen (Guidi-Rontani *et al.*, 1999; Dixon *et al.*, 2000; Ruthel *et al.*, 2004). Det är omdiskuterat vilken sorts fagocyter som tar upp sporer men forskning tyder på att det kan vara både makrofager och dendritiska celler. Shetron-Rama *et al.* (2010) menar på att det är mest troligt att de dendritiska cellerna bär huvudansvaret för fagocytos av sporer följt av transport till lymfnoder. Väl i lymfnoden dödar bakterien sin värdcell och sprids ut i blodet. Där kan bakterien föröka sig och framkalla en storm av cytokiner (små signalmolekyler som immunförsvarets celler använder för att kommunicera med varandra). I små mängder är dessa naturligt förekommande molekyler ofarliga men i stora mängder kan dessa leda till en stark överreaktion av immunförsvaret. Detta kan leda till blodförgiftning (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2006). Dock är det inte fastslaget om detta är den absoluta dödsorsaken hos mjältbrandsoffer.

Nu för tiden finns det en del olika tillvägagångssätt för att identifiera sporer av *B. anthracis* och utvecklingskurvan går stadigt uppåt sedan 2001. Den vanligaste metoden innebär odling av bakterien på plattor men denna metod kan ta lång tid så nya mindre tidskrävande metoder är under utveckling. De mest aktuella är detektion av antikroppar riktade mot BclA i sporens exosporium med hjälp av immunanalys som ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) eller ECL (electrochemiluminescence). Denna metod kan dock vara knepig då även andra arter inom bacillussläktet kan ha BclA-protein (Morel *et al.*, 2012). En annan metod som kan användas till identifiering av bakteriesporer är RV-PCR (rapid-viability polymerase chain reaction) som är en form av real-time-PCR och den mest effektiva metoden. Denna metod tar högst 24h och kan identifiera 100-tals prover om dagen (Létant *et al.*, 2011).

Vaccin, antibiotika och annan behandling

Antibiotikabehandling ska startas så snart som möjligt efter påbörjad infektion. Preparat som används idag är bland andra doxycycline och ciprofloxacin med flera. Problemet med antibiotikaresistenta *B. anthracis*-bakterier växer dock och alternativ behandling är under utveckling. Antikroppar som binder upp toxin och antitoxin som blockerar inträdet av toxin in i cellerna är några exempel (CDC, 2012).

Det finns för närvarande två vacciner att ta i förebyggande syfte. Dessa delas främst ut till individer som anses löpa förhöjd risk för smitta via sitt yrke, som exempelvis postjämsmän eller personer inom det militära. Vaccinerna kallas AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed) och AVP (Anthrax Vaccine Precipitated). Båda vaccinerna är baserade på kroppens egen förmåga att bilda antikroppar när den utsätts för antigen. Ett filtrat med antigenproteinet PA isolerat ur ickevirulenta *B. anthracis*-stammar introduceras i liten mängd i individen som sedan börjar producera antikroppar mot bakterien (World health organization, 2012). Detta kommer även leda till att specifika mjältbrandantikropsproducerande minnesceller (B-celler) bildas och sparas. Dessa kan sedan snabbt leda immunförsvaret på rätt väg vid framtida *B. anthracis*-infektioner.

Biologiska vapen – vad är bioterrorism?

Bioterrorism kallas det när någon avsiktligt använder mikroorganismer (agenter) med avseende att orsaka skada eller dödsfall bland människor, djur eller växter (CDC, 2012). Dessa agenter blir då biologiska vapen vars spridning kan ske via mat, vatten, luft eller mellan individer. Biologiska vapen går att hitta i naturen där de lever som naturliga patogener, men de kan även framställas syntetiskt *in vitro*. Modifikation av agenter *in vitro* kan leda till att agenterna får förstärkta spridningsmekanismer eller förmåga att motstå antibiotika. Två måsten för en bra agent är effektiv spridningsförmåga och virulens. Agenterna kan enligt Centers for Disease Control and Prevention (2012) delas in i tre kategorier beroende på dessa förmågor där patogener inom kategori A är högrisksagenter som är lättspridda och väldigt virulenta. Inom kategori B finns något mindre virulenta patogener med lite sämre spridningsförmåga. I kategori C är agenterna lättspridda men enbart potentiella patogener vilket innebär att de, genom genetisk modifikation, skulle kunna bli virulenta och därmed komma att klassas under kategori A. Exempel på agenter som faller under kategori A är *B. Anthracis* och *Yersinia pestis* som kan orsaka pest, *Variola major* som kan ge smittkoppor och *Clostridia botulinum* som kan orsaka botulism (förgiftning). Exempel under kategori B är *Rickettsia prowazekii* som orsakar fläckfeber och *Coxiella burnetti* som orsakar Q-feber. Exempel på organismer under kategori C är olika fästingburna virus eller resistenta tuberkulosbakterier.

Den första attacken med *B. anthracis* som vapen registrerades 1995 i Japan. Attacken var riktad mot lokalbefolkningen i staden Kameido och syftet var att starta en epidemi som skulle leda till världskrig. Attentatet resulterade i 0 dödsfall på grund av att en stam som saknade förmåga att bilda kapsel användes. Samtidigt var koncentrationen sporer/ml vätska för låg för det som anses vara den optimala vid användning av vätskebaserade biovapen (Takahashi *et al.*, 2004).

I USA skickades 2001 fyra brev fyllda med sporer av *B. anthracis* ut från New Jersey till mottagare inom medievärlden och politiken runt om i landet. Av de tjugotvå smittade individerna hade elva stycken fått mjältbrandsinfektion på huden och lika många andats in sporer och fått infektion i lungorna, av vilka fem dog (Jernigan *et al.*, 2002). Prover som tagits från näsan från 625 arbetare i olika byggnader i Washington DC där breven mellanlandats

visade att 28 stycken bar på sporer (CDC 2012). De totala saneringskostnaderna låg på runt 320 miljoner dollar och tog flera år att slutföra (Schmitt & Zacchia, 2012).

BTWC (The biological and toxin weapons convention) trädde i kraft 1975 och detta innebar ett förbud mot utvecklande, produktion och lagring av biovapen inklusive toxiner. Trots detta finns olika högriskklassade patogener relativt lättillgängligt att beställa på Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository hemsida för personer med forskarsyfte.

Diskussion

Syftet med denna uppsats var att ge en översikt över *Bacillus anthracis* livscykel med fokus på sporuleringsprocessen. Med hänsyn till alla aspekter ska jag nu försöka väga in för och nackdelar och skapa min egen uppfattning om *B. anthracis* skulle kunna vara ett effektivt biologiskt vapen.

Ovan nämndes två exempel på attacker där *B. anthracis* används som biovapen. Trots att det i attackerna förbrukades miljarder sporer blev resultatet enbart fem dödsoffer. *B. anthracis* är rankad som en av de värsta biologiska agenterna inom kategori A. Men trots denna topprankning är det många aspekter som måste tas hänsyn till. Om man först ser till sporens spridningsförmåga så är den inte ultimata för en bioagent. Den kan utan problem spridas både via mat, vatten och luft men dock inte mellan individer. Detta leder till att nya individer kontinuerligt måste utsättas för nya sporer om smittan ska fortgå.

Ett problem är att bakterien kräver vissa förutsättningar för att vara virulent. Efter att sporen inhalerats eller fastnat på huden måste den börja differentiera. I samband med detta måste bakterien bilda kapsel och utsöndra toxin för att kunna fly undan immunförsvaret och starta infektion. PA måste finnas närvarande för att toxiner ska kunna tas upp av bakteriens målceller. *pagA*, som kodar för PA, uttrycks i 5% CO₂ men i betydligt högre grad vid förhöjd CO₂-halt vilket innebär att bakterien kan producera toxin i lite mindre utsträckning i lungan där koldioxidhalten är något lägre. Bakterien behöver vidare befinna sig i en miljö där temperaturen är runt 37°C och bikarbonat finns för att utsöndra toxin. Detta innebär i sin tur att så länge värden har temperatur runt 37°C och ett normalt gasutbyte kan bakterien starta infektion även om det inte är under optimala omständigheter. Forskning av Drysdale *et al.* (2005) visar att bakteriens förmåga att bilda kapsel ökar drastiskt vid 5% CO₂-halt. Våra alveoler har en omgivning med ca 4% CO₂. Detta kan kanske innebära problem för bakterien som då kan få svårare att effektivt bilda kapsel och lättare blir igenkänd av värdens immunförsvaret. Väl inne i blodbanan ökar koldioxidhalten och bakterien ökar uttrycket av de gener som kodar för kapselprotein. Ett måste för att bakterien ska kunna spridas är att den befinner sig i sporfasen och som nämnts tidigare är bakterien i sitt vegetativa tillstånd väldigt känslig. Detta kan vara ett problem om sporer skulle hamna i en omgivning fördelaktig för differentiering som inte är en fiendes lunga. Låt säga att en mängd sporer skulle landa på en 37° solpanel eller i en näringsrik varmvattenspool i närheten av ett kraftverk med höga utsläpp av CO₂ och börja differentiera. Om detta skulle ske skulle spridningen upphöra.

Om infektion inträffar måste antibiotikabehandling genast startas. Knepigt är dock att de primära symptomen liknar de som uppkommer vid en vanlig förkylning; detta gör det svårt att tidigt identifiera smittan och starta behandling. Några undersökningar visar att bakterien har förmåga att bilda biofilm. Detta är högst oroande då bakterierna i biofilmsformation är mer resistent mot både doxycycline och ciprofloxacin (Lee *et al.*, 2007). I biofilmen kan både sporer och vegetativa bakterier leva men som tur är finns ingen forskning i dagsläget som tyder på att *B. anthracis* kan bilda biofilm inuti sin värd. I ett bioterroristiskt perspektiv kan

dessa upptäckter dock vara viktiga då biofilmer skulle kunna planteras i vattenledningar och successivt släppa iväg sporer.

Exosporium är det yttersta lagret runt sporen och det är BclA-proteiner i detta lager som känns igen av antikroppar och immunförsvaret vid infektion. Forskning av Steichen *et al.* (2003) visar att även BclA-mutanter uppvisar virulens. Detta innebär att en modifierad version av bakterien som saknar BclA skulle kunna framställas vilket i sin tur skulle leda till minskad immunförsvarsreaktion av värden om den utsätts för bakterien. Den ickevirulenta *B. subtilis* saknar helt exosporium så det skulle inte vara helt lätt att skilja på den och en *B. anthracis*-mutant vid detektion av sporer via antikroppar som detekterar BclA. Vidare, om inte exosporium skulle behövas alls för virulens kanske denna struktur skulle kunna avlägsnas. *B. anthracis* skulle då likna *B. subtilis* även till utseendet. Exakt hur många sporer som behövs för infektion är ännu oklart, mellan 10 000 och 20 000 stycken finns som förslag men det kan vara betydligt färre/ fler än så.

Trots mina undersökningar är resultaten inte definitiva. Av 22 infekterade individer i USA dog fem och av övriga 625 individer testade bar enbart 28 stycken på sporer, ingen av dessa visade tecken på infektion. Det kan hända att den bakteriestam som användes i attackerna 2001 hade anpassat sig till miljön i våra lungor och effektivt kunde producera kapsel trots lägre CO₂-halt och på så sätt gjort det möjligt att infektera och döda fem människor. Det är även möjligt att alla infekterade individer bar på bakterier som kunde producera kapsel effektivt i blodbanan men trots det inte lyckades fly undan immunförsvaret då sex individer klarade sig. Det kan hända att majoriteten av de bakteriesporer som andades in av de inblandade i terrorattacken 2001 fastnade på vägen ned till lungorna och aldrig fick en chans att differentiera. Det är även möjligt att de få individer som dog hade andra åkommor som triggades igång med denna infektion. Detta går ej att utesluta då man inte säkert vet vad *B. anthracis* dödsstöt är. Alla de ovannämnda teorierna skulle förklara hur 28 individer med positiva testresultat av sporer inte fick infektion och det faktum att attacken enbart resulterade i fem dödsfall trots att 11 individer hade andats in sporer och fått den farligaste versionen av infektionen.

Bacillus anthracis är en komplex organism och angående regleringsmekanismerna nödvändiga för sporulering och differentiering hoppas jag att det framgår hur otroligt viktigt det är att allt klaffar som det ska: att varje sigmafaktor påbörjar transkription av rätt gener vid rätt tidpunkt och stimulering av histidinsensorerna inte sker vid fel tillfälle. Dessa strikt reglerade processer är absolut nödvändiga för bakteriens överlevnad då den som encellig organism inte har råd att begå ett enda misstag. Sker miljöombyte, om så bara för en timme, kan de olika processerna starta och en kaskad av aktiveringar av olika proteiner påbörjas som inte är reversibla vilket kan leda till att bakterien dör. Min slutsatsen är att *B. anthracis* inte är ett effektivt biovapen om inte önskad effekt enbart är stor ekonomisk skada. Om önskad effekt är erövring av land verkar inte *B. anthracis* vara vidare effektivt då det är klurigt att slå ut fiender genom att orsaka dödsfall med bakterien. Dessutom skulle erövrade områden bli temporärt obrukbara eftersom saneringen av platser som har utsatta för sporer tar flera år.

Tack

Tack till Emmy Borgmästars, Irma De la Cruz och Anders Ödeen samt min seminariegrupp för återkoppling och kommentarer samt Sebastian George för hjälp med bilder.

Referenser

- Argioni F, Duncan L, Alper S, Losick R, Stragier P. 1996. SpoIIE governs the phosphorylation state of a protein regulating transcription factor σ F during sporulation in *Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America **93**: 3238-3242.
- Ben-Yehuda S, Losick R. 2002. Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. Cell **109**: 257-266.
- Bergman NH, Andersson EC, Swensson EE, Niemeyer MM, Miyoshi AD, Hanna PC. 2006. Transcriptional profiling of the *Bacillus anthracis* life cycle in vitro and an implied model for regulation of spore formation. Journal of Bacteriology **188**: 6092-6100.
- Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository 2012. Catalog: Anthracis. <http://www.beiresources.org/?Tabid=3058&q=Anthracis> / Hämtad 2012-11-28
- Bongiorni C, Stoessel R, Perego M. 2007. Negative regulation of *Bacillus anthracis* sporulation by the SpoOE family of phosphatases. Journal of Bacteriology **189**: 2637-2645.
- Brunsing RL, La Clair C, Tang S, Chiang C, Hancock LE, Perego M, Hoch JA. 2005. Characterization of sporulation histidine kinases of *Bacillus anthracis*. Journal of Bacteriology **187**: 6972-6981.
- Camp AH, Losick R. 2009. A feeding tube model for activation of a cell-specific transcription factor during sporulation in *Bacillus subtilis*. Genes & Development **23**: 1014-1024.
- Camp AH, Wang AF, Losick R. 2010. A small protein required for the switch from F to G during sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology **193**: 116-124.
- Cano RJ, Borucki MK. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. Science **268**: 1060-1064.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2012. Bioterrorism Agents / Disease. <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp> / Hämtad 2012-11-15
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2012. Opening a *Bacillus anthracis*-containing Envelope, Capitol Hill, Washington, D.C.: The Public Health Response. WWW-dokument wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/10/pdfs/02-0332.pdf / Hämtad 2012-12-05
- Centers for disease control and prevention 2012. Anthrax Q & A: Laboratory Testing <http://www.bt.cdc.gov/agent/anthrax/faq/labtesting.asp> / Hämtad 2012-12-01
- Diederich B, Wilkinson JF, Magnin T, Najafi M, Errington J, Yudkin MD. 1994. Role of interactions between SpoIIAA and SpoIIAB in regulating cell-specific transcription factor sigma F of *Bacillus subtilis*. Genes & Development **8**: 2653-2663.
- Dixon TC, Fadl AA, Koehler TM, Swanson JA, Hanna PC. 2000. Early *Bacillus anthracis*-macrophage interactions: intracellular survival and escape. Cellular Microbiology **2**: 453-463.
- Dowd MM, Orsburn B, Popham DL. 2008. Cortex peptidoglycan lytic activity in germinating *Bacillus anthracis* spores. Journal of Bacteriology **190**: 4541-4548.
- Drysdale M, Bourgogne A, Koehler TM. 2005. Transcriptional analysis of the *Bacillus anthracis* capsule regulators. Journal of Bacteriology **187**: 5108-5114.
- Ebmeier SE, Tan IS, Clapham KR, Ramamurthi KS. 2012. Small protein link coat and cortex assembly during sporulation in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology **84**: 682-696.
- Eichenberger P, Jensen ST, Conlon EM, Van Ooij C, Silvaggi J, González-Pastor JE, Fujita M, Ben-Yehuda S, Stragier P, Liu JS, Losick R. 2003. The sigma E regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. Journal of molecular biology **327**: 945-972.
- Errington J, Fort P, Mandelstam J. 1985. Duplicated sporulation genes in bacteria: implications for simple development systems. Federation of European Biochemical societies Letters **188**: 184-188

- Fleming TC, Shin JY, Lee S-H, Becker E, Huang KC, Bustamante C, Pogliano K. 2010. Dynamic SpoIIIE assembly mediates septal membrane fission during *Bacillus subtilis* sporulation. *Genes & Development* **24**: 1160-1172
- Giorno R, Bozue J, Cote C, Wenzel T, Moody K-S, Mallozzi M, Ryan M, Wang R, Zielke R, Maddock JR, Friedlander A, Welkos S, Dirks A. 2007. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. *Journal of Bacteriology* **189**: 691-705.
- Gomez M, Cutting S, Stragier P. 1995. Transcription of SpoIVB is the only role of sigma G that is essential for pro-sigma K processing during spore formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **177**: 4825-4827.
- Greenberg D, Busch J, Keim P, Wagner D. 2010. Identifying experimental surrogates for *Bacillus anthracis* spores: a review. *Investigative Genetics* **1**: 4.
- Guidi-Rontani C, Weber-Levy M, Mabruy re E, Mock M. 1999. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Molecular Microbiology* **31**: 9-17.
- Guignot J, Mock M, Fouet A. 1997. AtxA activates the transcription of genes harbored by both *Bacillus anthracis* virulence plasmids. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters* **147**: 203-207.
- Hanby WE, Rydon HN. 1946. The capsular substance of *Bacillus anthracis*: with an appendix by P. Bruce White. *Biochemical Journal* **40**: 297.
- Hugh-Jones M, Blackburn J. 2009. The ecology of *Bacillus anthracis*. *Molecular aspects of medicine* **30**: 356-367.
- Illing N, Errington J. 1991. Genetic regulation of morphogenesis in *Bacillus subtilis*: roles of sigma E and sigma F in prespore engulfment. *Journal of Bacteriology* **173**: 3159-3169.
- Imamura D, Zhou R, Feig M, Kroos L. 2008 Evidence that the *Bacillus subtilis* SpoIIIGA protein is a novel type of signal-transducing aspartic protease. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 15287-15299.
- Ireland JAW, Hanna PC. 2002. Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* Sterne endospores: gerS mediates response to aromatic ring structure. *Journal of Bacteriology* **184**: 1296-1303.
- Jernigan DB, Raghunathan PL, Bell BP, Brechner R, Bresnitz EA, Butler JC, Ceron M, Cohen M, Doyle T, Fischer M, Greene C, Griffith KS, Guarner J, Hadler JL, Hayslett JA, Meyer R, Petersen LR, Phillips M, Pinner R, Popovic T, Quinn CP, Reefhuis J, Reissman D, Rosenstein N, Schuchat A, Shieh W-J, Siegal L, Swerdlow DL, Tenover FC, Traeger M, Ward JW, Weisfuse I, Wiersma S, Yeskey K, Zaki S, Ashford DA, Perkins BA, Ostroff S, Hughes J, Fleming D, Koplan JP, Gerberding JL. The National Anthrax Epidemiologic Investigation Team, 2002. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United states, 2001: Epidemiologic findings. *Emerging infectious disease* **8**: 1019-1028.
- Johnsom WC, Tipper DJ. 1981. Acid-soluble spore proteins of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **146**: 972-982.
- Joshi SG, Cymet HB, Kerkvliet G, Cymet T. 2004. Anthrax in America 2001-2003. *Journal of the National Medical Association* **96**: 344.
- Kaspar RL, Robertson DL. 1987. Purification and physical analysis of *Bacillus anthracis* plasmids pXO1 and pXO2. *Biochemical and Biophysical research communications* **149**: 362-368.
- Koehler TM, Dai Z, Kaufman-Yarbray M. 1994. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO₂ and trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *Journal of Bacteriology* **176**: 586.
- Kong L, Setlow P, Li Y. 2012 Analysis of the Raman spectra of Ca²⁺-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments. *Analyst* **137**: 3683-3689.

- Lee K, Costerton JW, Ravel J, Auerbach RK, Wagner DM, Keim P Leid JG. 2007. Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilm. *Microbiology* **153**: 1693-1701.
- Leppla SH. 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **79**: 3162-3166.
- Létant SE, Murphy GA, Alfaro TM, Avila JR, Kane SR, Raber E, Bunt TM, Shah SR. 2011. Rapid-Viability PCR method for detection of live, virulent *Bacillus anthracis* in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 6570-6578.
- Liu H, Bergman NH, Thomason B, Shallom S, Hazen A, Crossno J, Rasko DA, Ravel J, Read TD, Peterson SN, Yates J, Hanna PC. 2004. Formation and composition of the *Bacillus anthracis* endospore. *Journal of Bacteriology* **186**: 164-178.
- Londoño-Vallejo J-A, Fréhel C, Stragier P. 1997. SpoIIQ, a forespore-expressed gene required for engulfment in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **24**: 29-39.
- Lucet I. 2000. Direct interaction between the cell division protein FtsZ and the cell differentiation protein SpoIIE. *The European Molecular Biology Organization Journal* **19**: 1467-1475.
- Länsstyrelsen 2003. Uppdrag om utvärdering av biologisk myggkontroll vid nedre dalälven (M2002/2981/Na). Länsstyrelsen Västmanlands Län, 2003.
- Makino S, Uchida I, Terakado N, Sasakawa C, Yoshikawa M. 1989. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **171**: 722-730.
- Makino S, Watarai M, Cheun H, Shirahata T, Uchida I. 2002. Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of Anthrax. *The Journal of Infectious Disease* **186**: 227-233.
- Mandelstam J, Higgs SA. 1974. Induction of sporulation during synchronized chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **120**: 38-42
- Meisner J, Wang X, Serrano M, Henriques AO, Moran CP. 2008. A channel connecting the mother cell and forespore during bacterial endospore formation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **105**: 15100-15105.
- Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD, Dreier TM. 1983. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infection and Immunity* **39**: 371-371.
- Morel N, Volland H, Dano J, Lamourette P, Sylvestre P, Mock M, Creminon C. 2012. Fast and sensitive detection of *Bacillus anthracis* spores by immunoassay. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 6491-6498.
- Morlot C, Uehara T, Marquis KA, Bernhardt TG, Rudner DZ. 2010. A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development* **24**: 411-422.
- Murray, P. R., Roosenenthal K.S., Pfaller M.A., 2009. *Bacillus*. Schmitt W, DeFrancesco K (red.). *Medical Microbiology* 6ed. *Bacillus*, ss.247-253. Mosby Elsevier, Canada.
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospore to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 548.
- Okinaka RT, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster AR, Hill KK, Keim P, Koehler TM, Lamke G, Kumano S, Mahillon J, Manter D, Martinez Y, Ricke D, Svensson R, Jackson PJ. 1999. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *Journal of Bacteriology* **181**: 6509.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology reviews* **62**: 597.

- Read TD, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT. 2003. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* **423**: 81-86.
- Roth NG, Lively DH, Hodge HM. 1995. Influence of oxygen uptake and age of culture on sporulation of *Bacillus anthracis* and *Bacillus globigii*. *Journal of Bacteriology* **69**: 455.
- Rudner DZ, Fawcett P, Losick R. 1999. A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolyses of membrane-associated transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **96**: 14765-14770.
- Ruthel G, Ribot WJ, Bavari S, Hoover TA. 2004. Time-laps confocal imaging of development of *Bacillus anthracis* in macrophages. *Journal of infectious disease* **189**: 1313-1316.
- Saile E, Koehler TM. 2006. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3168-3174.
- Schmidt R, Margolis P, Duncan L, Coppolecchia R, Moran CP, Losick R. 1990. Control of developmental transcription factor sigma F by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **87**: 9221-9225.
- Schmitt K, Zacchia NA. 2012. Total decontamination cost of the Anthrax letter attacks. *Biosecurity and bioterrorism: biodefense strategy, practice and science* **10**: 98-107.
- Shetron-Rama LM, Herring-Palmer AC, Huffnagle GB, Hanna P. 2010. Transport of *Bacillus anthracis* from the lungs to the draining lymph nodes is a rapid process facilitated by CD11c+ cells. *Microbial Pathogenesis* **49**: 38-46.
- Sirard JC, Mock M, Fouet A. 1994. The three *Bacillus anthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. *Journal of Bacteriology* **176**: 5188-5192.
- Spudich JA, Kornberg A. 1996. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination XIII. Adenylate kinase of vegetative cells and spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **98**: 69.
- Stanley JL, Smith H, Sargeant K, Stanley JL. 1961. Purification of factor I and recognition of a third factor of the Anthrax toxin. *Journal of General Microbiology* **26**: 49-66.
- Stearns-Kurosawa DJ, Lupu F, Taylor jr FB, Kinasewitz G, Kurosawa S. 2006. Sepsis and pathophysiology of Anthrax in a nonhuman primate model. *The American Journal of Pathology* **169**: 433-444.
- Steichen C, Chen P, Kearney JF, Charles L, Turnbough J. 2003. Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of Bacteriology* **185**: 1903-1910.
- Stephenson K, Hoch JA. 2002. Evolution of signaling in the sporulation phosphorelay. *Molecular Microbiology* **46**: 297-304.
- Sun DX, Cabrera-Martinez RM, Setlow P. 1991. Control of transcription of the *Bacillus subtilis* SpoIIIG gene, which codes for the forespore-specific transcription factor sigma G. *Journal of Bacteriology* **173**: 2977-2984.
- Sun DX, Stragier P, Setlow P. 1989. Identification of a new sigma-factor involved in compartmentalized gene expression during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Genes & Development* **3**: 141-149.
- Takahashi H, Keim P, Kaufmann AF, Keys C, Smith KL, Taniguchi K, Inouye S, Kurata T. 2004. *Bacillus anthracis* bioterrorism incident, Kameido, Tokyo, 1993. *Emerging Infectious Diseases* **10**: 117-120.
- Tamplin ML, Phillips R, Stewart TA, Luchansky JB, Kelley LC. 2007. Behavior of *Bacillus anthracis* strains Sterne and Ames K0610 in sterile raw ground beef. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 1111-1116.

- The biological and toxin weapons convention 2012. Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons on Their Destruction. WWW-dokument <http://www.opbw.org/> / Hämtad 2012-11-29
- Uniprot 2002. Search in Protein Knowledgebase (UniProtKb). Size of histidine kinase protein. <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=BA2291&sort=score>
<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=BA1351&sort=score>
- Varughese KI. 2002. Molecular recognition of bacterial phosphorelay proteins. *Currant Opinion in Microbiology* **5**: 142-148.
- Wakeley PR, Dorazi R, Hoa NT, Bowyer JR, Cutting SM. 2000. Proteolysis of SpoIVB is a critical determinant in signalling of pro- σ K processing in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **36**: 1336-1348.
- Wilson MJ, Carlson PE, Janes BK, Hanna PC. 2011. Membrane topology of the *Bacillus anthracis* GerH germinant receptor proteins. *Journal of Bacteriology* **194**: 1369-1377.
- World health organization 2012. Information Sheet. Observed rate of vaccine reactions, anthrax vaccines to humans. WWW-dokument http://apps.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/Anthrax_Vaccine_rates_information_sheet.pdf / Hämtad 2012-11-26