

Aus dem Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung
im Forschungsverbund Berlin e.V.

eingereicht über den
Lehrstuhl für Interdisziplinäre Zoo- und Wildtierkunde (IZW)
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen an mutmaßlichen Virulenzfaktoren von
Trueperella bonasi und *Trueperella bialowiezensis***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Julia Carola Kelemen

Tierärztin aus Lahn-Wieseck

Berlin 2013

Journal-Nr: 3627

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Heribert Hofer
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Christoph Lämmler
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Bison bonasus, balanitis, posthitis, *Arcanobacterium bonasi*, *Arcanobacterium bialowiezense*, virulence factors, sialidase

Tag der Promotion: 24.01.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-435-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für
Marcell, Noemi
und den Wald

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einführung.....	- 1 -
2. Literatur.....	- 3 -
2.1. Wisent.....	- 3 -
2.1.1. Die Geschichte des Wisents	- 3 -
2.1.2. Wisente im Nationalpark Białowieża, Polen.....	- 4 -
2.1.3. Biologie und Verhalten der Wisente im Nationalpark Białowieża	- 4 -
2.1.4. Balanoposthitis beim Wisent.....	- 5 -
2.1.5. Mögliche Ätiologie der Balanoposthitis beim Wisent und Bedeutung von <i>T. bonasi</i> und <i>T. bialowiezensis</i> für das Krankheitsgeschehen.....	- 7 -
2.2. <i>Trueperella bonasi</i> , <i>Trueperella bialowiezensis</i> , <i>Trueperella pyogenes</i> und <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	- 10 -
2.2.1. Taxonomie und phylogenetische Einordnung.....	- 10 -
2.2.2. Erscheinungsbild der bakteriellen Kulturen	- 13 -
2.2.3. Methoden zur Artbestimmung von <i>Arcanobacterium</i> und <i>Trueperella</i>	- 14 -
2.2.4. Durch <i>Trueperella</i> und <i>Arcanobacterium</i> verursachte Krankheiten.....	- 15 -
2.3. Bakterielle Virulenzfaktoren	- 20 -
2.3.1. Überblick	- 20 -
2.3.2. Cholesterol-abhängige Zytolysine (CDCs)	- 23 -
2.3.3. Phospholipasen.....	- 26 -
2.3.4. DNAsen.....	- 29 -
2.3.5. Neuraminidasen.....	- 30 -
2.3.6. UPF0027/RtcB-Proteine.....	- 33 -
2.3.7. Übersicht über die Virulenzfaktoren von <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> und <i>Trueperella pyogenes</i>	- 34 -
3. Problemstellung und Ziele	- 35 -
4. Material und Methoden	- 36 -
4.1. Material	- 36 -

4.1.1. Referenz-Bakterienstämme	- 36 -
4.1.2. Nährmedien	- 36 -
4.1.3. Chemikalien und Reagenzien.....	- 37 -
4.1.4. Testkits	- 38 -
4.1.5. Restriktionsendonukleasen und deren Puffer.....	- 39 -
4.1.6. Verbrauchsmaterialien	- 39 -
4.1.7. Geräte	- 40 -
4.1.8. Computerprogramme	- 42 -
4.2. Methoden.....	- 42 -
4.2.1. Nährmedien für Bakterien.....	- 42 -
4.2.2. DNA-Extraktion aus Bakterien	- 45 -
4.2.3. Agarose-Gelelektrophorese.....	- 48 -
4.2.4. Filterpapier-Test zum Nachweis von Neuraminidase-/ Sialidase-Aktivität.....	- 50 -
4.2.5. Herstellung von <i>T. bonasi</i> - und <i>T. bialowiezensis</i> -Cosmid-Bibliotheken.....	- 50 -
4.2.6. Cosmidextraktion/Plasmidextraktion.....	- 59 -
4.2.7. Subklonierungen von geschnittenen Cosmid-Inserts in den Plasmid-Vektor pJET 1.2.....	- 60 -
4.2.8. Auswerten ermittelter Sequenzen.....	- 63 -
4.2.9. Hämolyseaktivität-Assay	- 63 -
4.2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 65 -
4.2.11. DNA-Blotting (DotBlot-Hybridisierung, Southern Blotting)	- 73 -
4.2.12. DNase-Test.....	- 80 -
4.2.13. Erstellung phylogenetischer Stammbäume	- 80 -
4.2.14. Erstellung räumlicher Proteinstruktur-Modelle	- 82 -
5. Ergebnisse	- 83 -
5.1.1. MUAN-Test der Bakterien auf Filterpapier	- 86 -
5.1.2. Screening der Cosmid-Bibliotheken auf Neuraminidase-Aktivität	- 86 -
5.1.3. Subklonierung des Cosmid-Klones bon/cos6A in den Plasmidvektor pJET 1.2. und Identifizierung zweier Neuraminidase-positiver Plasmid- Klone.....	- 87 -
5.1.4. Sequenzierung des Neuraminidase-positiven Plasmid-Klons bon/cos6A/pJET4A.....	- 89 -
5.1.5. Die <i>Trueperella bonasi</i> -Neuraminidase	- 89 -
5.1.6. Das <i>Trueperella bonasi</i> „UPF-ähnliche Protein“.....	- 96 -

5.1.7. Überprüfung der Ergebnisse.....	- 98 -
5.2. Hämolyse	- 101 -
5.2.1. Hämolyse von <i>Trueperella bonasi</i> DSM 17163 und <i>Trueperella bialowiezensis</i> DSM 17162 auf Tierblut-Agarplatten	- 101 -
5.2.2. Hämolyseaktivität-Assay	- 103 -
5.2.3. DotBlot und Southern Blot-Hybridisierungen	- 104 -
5.2.4. PCR	- 108 -
5.2.5. Screening der Cosmid-Bibliotheken auf Selektivplatten, Subklonierung in Plasmidvektor pJET 1.2. und Sequenzierung	- 113 -
5.3. Phospholipase D.....	- 117 -
5.3.1. DotBlot Hybridisierung.....	- 117 -
5.3.2. Spezifische PCR.....	- 118 -
5.3.3. Screening der Cosmid-Bibliotheken auf PLD-Aktivität	- 118 -
5.4. Desoxyribonuklease	- 119 -
5.4.1. Untersuchung der Cosmid-Bibliotheken auf DNase-Aktivität	- 119 -
6. Diskussion	- 120 -
6.1. Relevanz der Untersuchungen.....	- 120 -
6.2. Studiendesign: Auswahl der Vergleichsorganismen und prinzipielle Vorgehensweise	- 121 -
6.3. Neuraminidase-Aktivität	- 123 -
6.4. Hämolyse.....	- 126 -
6.5. Phospholipase-Aktivität	- 130 -
6.6. DNase-Aktivität	- 131 -
6.7. Schlussfolgerungen und Ausblick	- 132 -
7. Zusammenfassung.....	- 134 -
8. Summary	- 136 -
9. Literaturverzeichnis.....	- 138 -
ANHANG A:.....	- 166 -
Vektorkarte des Cosmid-Vektors SuperCos 1 (Agilent Technologies)	- 166 -
ANHANG B:.....	- 167 -
Vektorkarte des Plasmid-Vektors pJET1.2/blunt (Fermentas).....	- 167 -
ANHANG C:.....	- 168 -
Nukleotidsequenz des Inserts des Neuraminidase-positiven <i>T. bonasi</i> -Klons bon/cos6A/pJET4A.....	- 168 -

ANHANG D:.....	- 170 -
Alignment Neuraminidasen.....	- 170 -
Danksagung.....	- 177 -
Selbständigkeitserklärung	- 179 -

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
≥	größer als oder gleich
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
A	Adenin
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ALN	Arcanolysin
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-Toluidinsalz
BHI	Brain-Heart-Infusion (Hirn-Herz-Glucose)
BHV	Bovines Herpesvirus
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BVD	Bovines Virus Diarrhoe
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	cirka
CAMP-Test	Christie-Atkins-Munch-Petersen-Test
CapHV	Caprines Herpesvirus
CDC	cholesterol-dependent cytolysins = Cholesterol-abhängige Zytolysine
CerHV	Cervides Herpesvirus
Da	Dalton, Einheit der molekularen Masse
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
et al.	und andere
F	forward
F.	Fusobacterium
Fe	Eisen
g	Gramm
G	Guanin
gen.nov.	genus novum = neue Gattung
h	hours = Stunde(n)
ISR	intergenic spacer region
IUCN	International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources
IZW	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung
kb	Kilobasen (= 1000 Basen)
kDa	Kilodalton (= 1000 Dalton)
kg	Kilogramm
km ²	Quadratkilometer
l	Liter
LB	Luria Bertani (Nährmedium)
LLO	Listeriolysin
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol, absolute Menge einer Substanz
MACPF	Membrane attack complex/ Perforin-Family
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
MUAN	2'-(4-methyl-umbelliferyl)- α -d-N-acetylneuraminsäure
n	Anzahl der Objekte in einer Stichprobe
NanA/ NanH/ P	Neuraminidase A/ H/ P
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NET	Neutrophil Extracellular Trap

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NTB	Nitroblau-tetrazoliumchlorid
o.g.	oben genannt(e)
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
P	Prolin
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PC-PLCs	Phosphatidylcholine Phospholipasen C
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFO	Perfringolysin
PLA, B, C, D	Phospholipase A, B, C, D
PLO	Pyolysin
PLY	Pneumolysin
PVP	Polyvinylpyrrolidone
R	reverse
rDNA	Ribosomal Desoxyribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomal Ribonucleic acid
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
s	Sekunde
sIgA	Schleimhaut-IgA (Sekretorisches Immunglobulin A)
SLO	Streptolysin
SOC	Super Optimal Broth
sp. nov.	Neue Spezies /Art
sp.	Spezies
spp.	Mehrere Spezies/Arten
spp. nov	Mehrere neue Spezies/Arten
SSC	Standard Saline Citrate = Natriumchloridnatriumcitrat
T	Thymidin
Tab.	Tabelle

Temp.	Temperatur
TMH	Transmembran- β -Haarnadel
u.a.	unter anderem
IU/ μ l	Internationale Einheiten pro Mikroliter
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
UV	ultraviolett
V	Volt
Verd.fakt.	Verdünnungsfaktor
W	Watt
Y.	<i>Yersinia</i>
z.B.	zum Beispiel

1. Einführung

Seit 1962 wird bei männlichen Flachlandwisenten (*Bison bonasus*) im Białowieża Nationalpark in Weißrussland und ab 1980 auch im polnischen Teil des Nationalparks eine nekrotisierende Entzündung des Genitaltrakts (Balanoposthitis) beobachtet (Bunevich, 2010; Krasieńska und Krasieński, 2010). Im fortgeschrittenen Stadium führt die Erkrankung zur Ödematisierung der Haut in der Präputialregion, Eiteransammlung in der Präputialhöhle, Paraphimose sowie Autoamputation der Penisspitze (Wolf et al., 2000). Von der Balanoposthitis sind jährlich etwa 6,4% der männlichen Tiere im Białowieża Nationalpark betroffen (Krasieńska und Krasieński, 2010). Die nekrotischen Veränderungen wurden bei Bullen im Alter von 3 Monaten bis 20 Jahren (Bunevich, 2010; Krasieńska und Krasieński, 2010) festgestellt. Die Ätiologie der Erkrankung ist unbekannt, jedoch wurden virale Erreger bisher ausgeschlossen (Borchers et al., 2002; Anusz et al., 2007). Es besteht der Verdacht, dass *Trueperella bonasi* comb. nov. (im Folgenden als *T. bonasi* abgekürzt) und *Trueperella bialowiezensis* comb. nov. (im Folgenden als *T. bialowiezensis* abgekürzt), die ausschließlich bei an Balanoposthitis erkrankten Bullen in allen Krankheitsstadien (I-III) nachgewiesen wurden, eine Rolle bei der Entstehung der Erkrankung spielen (Lehnen 2005, S.102). Als begünstigende Faktoren gelten Stoffwechselstörungen und Immunschwäche infolge geringer genetischer Variabilität durch Inzucht (Lünser et al., 2005; Bunevich, 2010).

Der Wisent ist eine vom Aussterben bedrohte Tierart, die weltweit nur noch 4.032 Exemplare (Stand 2010) umfasst. Rund 20% (n = 820) dieser Tiere leben heute frei im Nationalpark Białowieża beiderseits der polnisch-weißrussischen Grenze (Bunevich, 2010). Als größte freilebende Population stellt sie ein wichtiges Reservoir für die Erhaltung der Art dar. Wisentbullen, die an Balanoposthitis leiden, können im späten Stadium der Erkrankung am Reproduktionsgeschehen nicht mehr teilnehmen, wodurch ihr genetisches Material für die Gesamtwisentpopulation verloren geht. Bevor die Ätiologie der Erkrankung nicht geklärt ist, können zudem keine Bullen zu Zuchtzwecken in andere Wisenthaltungen verbracht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* ursächlich oder sekundär an der Entstehung der Balanoposthitis beim Wisent beteiligt sind. Als Indikator für die Pathogenität der Bakterien wurden Virulenzfaktoren herangezogen. Virulenzfaktoren sind Faktoren, die es einem Bakterium oder Virus ermöglichen, mit Wirtszellen in Kontakt zu

treten, sich z.B. an die Wirtszellstrukturen anzuheften, diese zu zerstören und somit zur Schädigung oder zum Absterben der Zelle und des Wirts führen.

Die Auswahl der untersuchten Virulenzfaktoren orientierte sich an bedeutenden Virulenzfaktoren phylogenetisch nahe verwandter pathogener Bakterien, insbesondere *Trueperella pyogenes* comb. nov (im Folgenden als *T. pyogenes* abgekürzt) und *Arcanobacterium haemolyticum* (*A. haemolyticum*), die in der Lage sind, der Balanoposthitis ähnliche Entzündungen auf Haut und Schleimhäuten von Säugetieren einschließlich des Menschen hervorzurufen (Lämmler, 1990; Jost und Billington, 2005; Lucas, 2009).

2. Literatur

2.1. Wisent

2.1.1. Die Geschichte des Wisents

Der Wisent (*Bison bonasus bonasus* Linnaeus, 1758) ist der größte Landwiederkäuer Europas und war historisch über weite Teile West-, Mittel- und Südosteuropas verbreitet (Pucek et al., 2004). Infolge von Habitatsbeschränkung und Bejagung ging seine Zahl stetig zurück, was dazu führte, dass die Art um 1919 (Raczyński, 1981; Pucek, 1986; Krasinski et al., 1994) oder 1921 (Priemel, 1923; Wróblewski, 1925; Klös, 1968; Türcke, 1980) in der Wildbahn ausgestorben war. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich noch 54 (29 männliche und 25 weibliche) zur Zucht taugliche Wisente (Priemel, 1923) in Zoologischen Gärten, die von 12 Gründertieren abstammten (Slatis, 1960). Von den ursprünglich drei Subspezies *Bison bonasus bonasus* (Flachlandwisent), *Bison bonasus caucasicus* (Kaukasuswisent) und *Bison bonasus hungarorum* (Karpatenwisent) findet sich nur das genetische Material vom Flachlandwisent („Lowland“-Linie) und der Mischform zwischen Flachland- und Kaukasuswisent („Lowland-Caucasian“-Linie) in der heutigen Weltwisentpopulation wieder (Krasinska und Krasinski, 2007). Nach der Gründung der „Internationalen Gesellschaft zur Erhaltung des Wisents“ im Jahr 1923 (Türcke, 1980; Pucek, 1986) und der Einführung des Zuchtbuches 1924 wurden die Gründertiere, wovon nur sieben Tiere der reinen Flachlandlinie entstammten, gezielt gezüchtet. 1929 wurde mit dem Aufbau des Zuchtzentrums in Białowieża in Polen der Grundstein für die Wisentpopulation im Białowieża Nationalpark gelegt. 1938 belief sich die Weltwisentpopulation auf 160 Tiere (Mohr, 1952). Nach dem Ende des 2. Weltkriegs befanden sich ~100 Tiere in Gefangenschaft; die freilebende Population war zu diesem Zeitpunkt ausgestorben (Mohr, 1948). Im Jahr 1952 konnten die ersten Tiere aus dem Zuchtzentrum in Białowieża, Polen in den anliegenden Nationalpark ausgewildert werden. (Pucek, 1986, 1989; Krasinski et al., 1999). Die Ausrottung der freilebenden Wisentpopulation und die Nachzucht aus einem kleinen genetischen Pool führten zu einer niedrigen genetischen Variabilität der heutigen Wisentpopulation (Gralak et al., 2004; Lünser et al., 2005; Radwan et al., 2007) und hat möglicherweise Einfluss auf die Gesundheit der Tiere (Olech, 1987; Olech und Perzanowski, 2002; Pucek et al., 2004).

Der Wisent wird im Appendix III der Berner Konventionen („Übereinkommen über die Erhaltung der europäischen wildlebenden Pflanzen und Tiere und ihrer natürlichen Lebensräume“) als geschützte Art geführt (<http://www.naturschutzrecht-online.de/datenbanken/gesetze/Gesetze/showLawVersion?id=401>, 2012) und wurde als „gefährdete Art“ (Schutzstatus engl.: „*vulnerable*“) auf die rote Liste der IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) aufgenommen (www.iucn.org, 2008).

2.1.2. Wisente im Nationalpark Białowieża, Polen

Der Nationalpark Białowieża ist der letzte Primärwald der zentraleuropäischen Tieflandebene. Er erstreckt sich über eine Fläche von insgesamt 1.525 km² (Kraśnińska und Kraśniński, 2007), wovon etwa 650 km² in Polen und 875 km² in Weißrussland liegen. Im Jahr 2006 lebten 439 Wisente auf polnischer (Białowieża Nationalpark, 2008) und 334 Wisente auf weißrussischer Seite (Belovezhskaya Pushcha Nationalpark, 2006). Laut Kozło (2011) haben sich diese Zahlen durch Einführung eines intensiven Zuchtprogramms bis Ende 2010 nahezu verdreifacht, so dass heute Schätzungen zufolge die Hälfte der Weltwisentpopulation in Polen und Weißrussland beheimatet ist – diese Vermutung wurde jedoch bislang nicht durch andere Autoren bestätigt. Weitere im Nationalpark ansässige größere Wildarten sind Rothirsch (*Cervus elaphus*), Reh (*Capreolus capreolus*), Elch (*Alces alces*) und Wildschwein (*Sus scrofa*). Der Urwald wird von insgesamt ca. 11.000 Tier- sowie 1.200 Pflanzenarten bevölkert (<http://www.staff.amu.edu.pl/~zbow/ph/php/bial.htm>, 2010). Er setzt sich hauptsächlich aus Laub- und Mischwald mit z.T. dichtem Unterholz zusammen und wird von mehreren Flüssen durchzogen. Nach der etwa siebenmonatigen Vegetationsperiode ist das Gebiet im Winter für durchschnittlich drei Monate von einer geschlossenen Schneedecke bedeckt (Kraśnińska und Kraśniński, 2007). Seit 1979 werden 926,69 km² des Nationalparks von der UNESCO als Weltnaturerbe geführt. Hiervon stehen auf der polnischen Seite 47 km² unter besonderem Schutz („strenges Schutzgebiet“) und dürfen nur mit Sondergenehmigung betreten werden, während innerhalb des Nationalparks weitere, kleinere, aber frei zugängliche Schutzgebiete bestehen (<http://whc.unesco.org/en/list/33>, 2012; <http://www.bialowieza-info.eu/de/nationalpark.php>, 2012).

2.1.3. Biologie und Verhalten der Wisente im Nationalpark Białowieża

Im Sommer besteht eine Wisentherde aus 10 bis 20, im Winter hingegen aus bis zu 100 Tieren. Sie setzt sich aus Kühen, Kälbern und Jungtieren zusammen. Geschlechtsreife männliche Tiere leben in der Brunstzeit (August bis Oktober) meist solitär und außerhalb

dieser Zeit häufig in kleinen Bullengruppen ($n = 2-7$) (Pucek, 1989). Kühe erreichen im Freiland im Alter von 3 Jahren die Geschlechtsreife (in Gefangenschaft mit 24 Monaten) und setzen ihr erstes Kalb meist mit 4 Jahren (Kraśiński und Raczynski, 1967; Kraśiński 1978). Sie bleiben bis zum Alter von 19 bis 22 Jahren reproduktiv (Koch, 1956). Bullen im Freiland erreichen mit vier Jahren die Geschlechtsreife (Czykier et al., 1999), kommen aber in der Regel erst zwischen dem sechsten und zwölften Lebensjahr zur Fortpflanzung. Jüngere oder ältere Bullen können sich in den Revierkämpfen meist nicht gegen ihre Gegner durchsetzen. In Gehegehaltung sind aber auch ältere Bullen (bis 15 Jahren) fortpflanzungsaktiv. Kühe haben in freier Natur eine Lebenserwartung von bis zu 25 Jahren, Bullen werden selten älter als 20 Jahre (Kraśińska und Kraśiński, 2007). Der Nahrungsbedarf adulter Wisente liegt zwischen 30 und 45 kg Pflanzenfrischmasse pro Tag (Borowski et al., 1967; Pucek, 1986), die sich aus Gras und Wildkräutern (80%), sowie Baumblättern und Rinde (20%) zusammensetzt (Kraśińska und Kraśiński, 2007). Im Winter werden der Freilandpopulation Heu, Klee und Rüben zugefüttert (Kraśińska et al., 2000).

2.1.4. Balanoposthitis beim Wisent

Aufgrund der geringen Individuenzahl und ihres besonderen Schutzstatus (2.1.1.) findet ein intensives Krankheitsmonitoring der Wisente im Nationalpark Białowieża statt. Die Balanoposthitis ist eine Entzündung des äußeren Genitals männlicher Individuen, die am Präputium (Posthitis) beginnt und sich im Laufe des fortschreitenden Krankheitsprozesses meist auf den Penis (Balanitis) ausweitet (Lehnen, 2005). Lange Zeit nahm man an, dass die Erkrankung beim Wisent erstmals 1980 auf der polnischen Seite (Kita et al., 1994) des Nationalpark Białowieża beobachtet wurde und ein Jahr darauf auch auf der weißrussischen Seite zu finden war (Kita et al., 1994; Kita et al., 2003). Neuere Nachforschungen haben jedoch ergeben, dass die Krankheit seit mindestens 1962 auf weißrussischer Seite beobachtet wird (Bunevich, 2010). Das Altersspektrum erkrankter Bullen reicht von drei Monaten bis zu 20 Jahren (Bunevich, 2010; Kraśińska und Kraśiński, 2010), wobei die Altersgruppe der 2-3 jährigen Bullen mit 31-37% (= Anteil erkrankter Tiere an der Gesamtpopulation männlicher Wisente) am häufigsten betroffen ist (Bunevich, 2010; Kraśińska und Kraśiński, 2010). Eine Übertragung der Balanoposthitis allein über den Geschlechtsakt ist hiermit ausgeschlossen.

Bei der Balanoposthitis des Wisents handelt es sich nach aktuellem Kenntnisstand um eine bakterielle Mischinfektion (Lehnen, 2005). In der Literatur wird sie als eine katarrhalische, noduläre, purulente oder diphteroid-nekrotische Entzündung des Penis und des Präputiums

beschrieben, die von Fistelbildung im umliegenden Gewebe begleitet ist (Anusz et al., 2007) und mit dem Voranschreiten der Erkrankung zur Infertilität führt (Kraśńska und Kraśński, 2007). Makroskopisch ist zunächst eine ödematöse Verdickung des *Ostium praeputiale* mit vereinzelt hyperkeratotischen, nekrotischen Herden zu erkennen. Anfangs betreffen diese Veränderungen nur den Übergang von der Haut zur Schleimhaut; im weiteren Verlauf breitet sich die Nekrose auf die *Lamina externa* und die *Lamina interna* des Präputialschlauches aus. Eitriges Exsudat tritt aus der Präputialhöhle aus und die Präputialschleimhaut ist stark verdickt. Im fortgeschrittenen Stadium kann es zum Verschluss der Präputialöffnung durch nekrotisches Material und zur Ansammlung von Urin in der Präputialhöhle kommen. In besonders schweren Fällen führen die eitrig-nekrotisierenden Prozesse zur Autoamputation der Penisspitze (Abb. 2.1). Durch das Anschwellen der Präputialöffnung und eine eventuelle Fistelbildung in der Harnröhre wird die Miktion erschwert. Im fortgeschrittenen Stadium kann die Erkrankung zur Sepsis und in seltenen Fällen auch zum Tod führen (Kita et al., 1990; Kita et al., 1994; Schildger et al., 1996; Jakob et al., 2000; Lehnen, 2005).

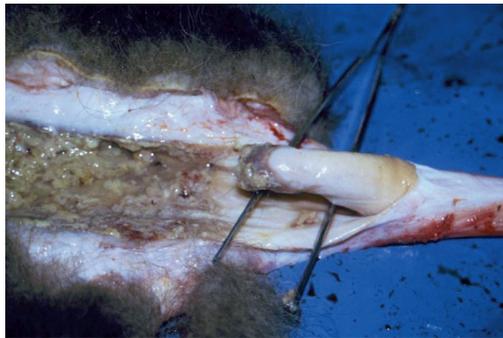


Abb. 2.1.: Balanoposthitis mit Autoamputation der Penisspitze (Foto: A. Lehnen, Nutzung mit Genehmigung der Fotografin)

Anhand histologischer Zustände wird die Erkrankung in drei Stadien eingeteilt. Stadium I ist makroskopisch nicht diagnostizierbar, histologisch sind jedoch fokale Hyperkeratosen sowie eine stark proliferierte Epidermis mit oberflächlicher Besiedelung rundlicher Bakterien erkennbar. Stadium II ist von einer epidermalen Nekrose gekennzeichnet, die bis in das *Stratum spinosum* reicht. Zudem lässt sich eine ausgeprägte Besiedelung mit Bakterien beobachten. Im Stadium III hat der ulzerative Prozess das Plattenepithel erreicht und das Gewebe ist massiv von Bakterien besiedelt (Lehnen et al., 2003; Lehnen, 2005).

Seit den ersten verzeichneten Krankheitsfällen in Polen 1980 werden die Wisentherden kontinuierlich beobachtet, um an Balanoposthitis erkrankte Wisentbullen rechtzeitig zu erkennen und gezielt abzuschließen, sowie Faktoren zu analysieren, die die Krankheitsentstehung möglicherweise begünstigen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Faktoren wie Populationsgröße und -dichte, Missbildungen der Geschlechtsorgane (Tiere mit Hodenmissbildungen erkranken vermehrt an Balanoposthitis) sowie genetische Faktoren eine Rolle spielen könnten (Kraśńska und Kraśński, 2010). Um der Ausbreitung der Erkrankung entgegenzuwirken, für die eine infektiöse Ursache angenommen wird, werden gezielt Bullen eliminiert, die aufgrund makroskopisch erkennbarer Veränderungen am Präputium (Identifikation betroffener Tiere mittels Fernglas) unter dem Verdacht stehen, an Posthitis/Balanoposthitis erkrankt zu sein (Pucek et al., 2004). Von 1980 bis Dezember 2009 wurden insgesamt 246 Bullen mit makroskopisch erkennbaren Anzeichen von Posthitis/Balanoposthitis entweder getötet (n = 216) oder tot aufgefunden (n = 30) (Kraśńska und Kraśński, 2010). Bunevich (2010) beschreibt die Erkrankung bei 130 getöteten und 23 tot aufgefundenen Bullen in Weißrussland in den Jahren 1966-2005. Der Anteil an erkrankten Bullen bezogen auf die Gesamtpopulation im gesamten Nationalpark Białowieża wird auf 6% geschätzt (Bunevich, 2010; Kraśńska und Kraśński, 2010).

Bei Wisentkühen (n = 66) ergaben makroskopische und histologische Untersuchungen der Schamlippen, der Vaginalschleimhaut und der Klitorisgrube keine Anhaltspunkte für ein pathologisches Geschehen ähnlich der Balanoposthitis bei männlichen Wisenten. Die bakteriologische Untersuchung der Vaginalflora von 40 weiblichen Wisenten ergab eine Besiedelung mit physiologischer Genitaltraktflora (Speck et al., 2006; Lehnen 2005). Auch Borchers et al. (2002) konnten bei der Untersuchung von 167 weiblichen Wisenten keinerlei Läsionen an deren Geschlechtsorganen feststellen.

2.1.5. Mögliche Ätiologie der Balanoposthitis beim Wisent und Bedeutung von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* für das Krankheitsgeschehen

Die Ätiologie der Balanoposthitis beim Wisent ist bislang unbekannt. Als Ursache der Erkrankung, die durch eine bakterielle Mischinfektion gekennzeichnet ist, wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Möglicherweise erleichtern prädisponierende Faktoren wie Verletzungen oder Irritationen der Haut durch Zäune, Unterholz oder Ektoparasiten das Eindringen von Viren oder Bakterien in tiefere Gewebeschichten (Lehnen, 2005). Das Präputium ist äußeren Einflüssen gegenüber deshalb stärker ausgesetzt als andere

Hautstellen, da es wesentlich dünner behaart ist, eine feine Haut besitzt und weit von der Bauchdecke entfernt relativ ungeschützt nach unten hängt. Hier entstehen eher Verletzungen oder aufsteigende Infektionen. Die Hoden, für die dies auch zutreffen könnte, können weit nach oben in den Schenkelspalt gezogen werden und sind somit deutlich besser geschützt (Lehnen, 2005; Krasnińska und Krasniński, 2007).

Es gibt Hinweise darauf, dass Faktoren wie Inzucht und geringe genetische Variabilität zu einer Reduktion der Immunkompetenz und somit einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit in Tierpopulationen führen (O'Brian und Everman, 1988; Frankham et al., 2010). Im Rahmen des Krankheitsgeschehens der Balanoposthitis beim Wisent könnte eine Störung der lokalen Immunabwehr im Bereich der Genitalschleimhaut eine Besiedelung mit pathogenen Mikroorganismen erleichtern (Pucek et al., 2004). Eine Rolle könnte hierbei die Funktionseinschränkung oder Ausschaltung gewebespezifischer Defensin-Gene spielen, die zur unspezifischen Abwehr des Immunsystems zählen und im Nebenhodengewebe bzw. der Präputialschleimhaut exprimiert werden. Dies könnte auch die spezifische Lokalität (männliches Genitale) der Erkrankung erklären (Lünser und Ludwig, 2005; Lünser, 2005). Untersuchungen der weißrussischen Wisentpopulation ergaben, dass deren hohe Krankheitsanfälligkeit einerseits auf die geringe genetische Variabilität und Inzucht innerhalb der Population und andererseits auf äußere Faktoren wie Nahrungskonkurrenz, Stress durch Verdichtung der Herden an den Winterfütterungsplätzen sowie Schwermetallbelastung und Mangel an Spurenelementen zurückzuführen ist (Krasochko und Krasochko, 2004; Bunevich, 2010). Ein Zusammenhang zwischen dem Heteroplasmiegrad der Wisentpopulation im Nationalpark Białowieża in Polen und der Inzidenz von Balanoposthiserkrankung konnte nicht festgestellt werden (Wójcik et al., 2009).

Borchers et al. (2002) untersuchten Blut-, Tupfer- und Gewebeprobe von 54 an Balanoposthitis erkrankten polnischen Wisenten auf Antikörper gegen Bovines Herpesvirus 1 (BHV-1), BHV-2, BHV-4, Caprines Herpesvirus 1 (CapHV-1), Cervides Herpesvirus 1 (CerHV-1), sowie gegen Bovines Virus Diarrhoe Virus 1 (BVD-1). Bei keinem der an Balanoposthitis erkrankten Wisentbullen konnten messbare Antikörpertiterwerte gegen die genannten Viren nachgewiesen werden. Zudem konnte in keiner der Proben DNA/ RNA dieser Viren nachgewiesen werden, weshalb sie als Ursache für die Balanoposthitis beim Wisent ausgeschlossen wurden (Borchers et al., 2002). Diese Aussage unterstützen auch Anusz et al. (2007), die bei der Untersuchung von Probenmaterial 39 männlicher Wisente,

darunter auch Tiere, die Symptome von Posthitis/ Balanoposthitis zeigten, zwischen symptomfreien und symptomatischen Tieren keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Antikörper gegen BHV-1 und BHV-5 feststellten.

Fusobacterium necrophorum (*F. necrophorum*) wird häufig im Zusammenhang mit eitrig-nekrotisierenden Erkrankungen wie der Posthitis beim Hausrind (*Bos primigenius taurus*) (Jensen und Mackey, 1971) oder der *Dermatitis interdigitalis contagiosa* („Moderhinke“) beim Hausschaf (*Ovis ammon aries*) (Benett und Hickford, 2011) genannt. Der Erreger tritt bei diesen Erkrankungen in Mischinfektion u.a. mit Bakterien wie *Dichelobacter nodosus*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. oder *T. pyogenes* auf. Experimentell wurde ein synergistischer Effekt bei Mischinfektionen von *F. necrophorum* und *T. pyogenes* nachgewiesen, der sich durch eine schnellere Vermehrung beider Erreger sowie eine stärkere Entzündungsreaktion und Nekrotisierung des Gewebes auszeichnet (Roberts, 1967). Auch im Rahmen der Balanoposthitis beim Wisent ist ein solches synergistisches Geschehen denkbar, da *F. necrophorum* regelmäßig bei kranken Bullen nachgewiesen werden konnte – allerdings nie im frühen, sondern ausschließlich im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Dieses schließt *F. necrophorum* als ursächlichen Erreger für die Balanoposthitis beim Wisent aus (Jacob et al., 2000; Anusz et al., 2007; Lehnen, 2005).

Weitere, im Rahmen von Balanoposthitis bei Hausrindern und Hausschafen genannte bakterielle Erreger sind *Trueperella pyogenes*., *Corynebacterium* spp. und Spirochäten. Auch diese Keime konnten beim Wisent nur im späten Stadium der Balanoposthitis nachgewiesen und als ursächliche Erreger deshalb ausgeschlossen werden (Lehnen, 2005).

Thiede et al. (2002) untersuchten Wisente auf Antikörper gegen *Mycoplasma bovis* und *M. bovis genitalium*, da beide Bakterienarten Erkrankungen am Genitaltrakt von Rindern hervorrufen können (Kirchhoff, 1982). Die Prävalenz von nachgewiesenen Antikörpern gegen *M. bovis genitalium* in der Gruppe an Balanoposthitis erkrankter Wisentbullen (Messung der Antikörpertiterwerte im Serum) war signifikant höher als in der Gruppe gesunder Bullen. Antikörper gegen *M. bovis* wurden nicht nachgewiesen. Obwohl der eindeutige Anzucht-Nachweis von *M. bovis genitalium* nicht gelang, kann dessen Beteiligung am Krankheitsgeschehen nicht ganz ausgeschlossen werden (Thiede et al., 2002; Lehnen, 2005).

Untersuchungen von an Balanoposthitis erkrankten Wisenten mittels bakterieller Kulturverfahren ergaben den Nachweis diverser Gram-positiver Bakterien (*Trueperella* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.) sowie Gram-negativer Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae (Jakob et al., 2000; Kita et al., 1990; Lehnen et al., 2003; Lehnen et al., 2006; Piusiński et al. 1997). Lehnen (2005) untersuchte Präputialtupferproben von an Balanoposthitis erkrankten Bullen (n=23) und isolierte in 57% (n=13) dieser Proben zwei neue Bakterien der Gattung *Trueperella* gen. nov.. In 87% der untersuchten Proben wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von entweder *T. bonasi* oder *T. bialowiezensis* nachgewiesen. Beide Bakterienarten sind schon im ersten Stadium der Erkrankung präsent. Sie konnten bisher noch nie aus gesunden Bullen und weiblichen Tieren isoliert werden. Dies spricht für die mögliche ätiologische Bedeutung von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* an der Balanoposthitis beim Wisent (Lehnen, 2005). Um die Frage abzuklären, ob *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* in der Lage sind, Wirtsgewebe zu besiedeln, zu schädigen oder zu zerstören und somit die Krankheit auszulösen, wurde in der vorliegenden Arbeit nach potentiellen Virulenzfaktoren dieser beiden Bakterienarten geforscht. Als Vergleichsorganismen dienten hierfür zwei human- und tierpathogene Verwandte, *Arcanobacterium (A.) haemolyticum* (2.2.4.2.) und *T. pyogenes* (2.2.4.3.). Der Vergleich mit diesen beiden Bakterienarten liegt nahe, da sie für eine Reihe von purulenten Weichteilinfektionen verantwortlich gemacht werden, die mit dem Krankheitsbild der Balanoposthitis beim Wisent vergleichbar sind. Zudem sind *A. haemolyticum* und *T. pyogenes* die am besten untersuchten Vertreter ihrer Gattungen und ihre Virulenzfaktoren sind vergleichsweise gut erforscht (Lämmler, 1990; Gahrn-Hansen und Frederiksen, 1992; Carlson et al., 1994a; Jost und Billington, 2005; Lucas, 2009; Jost et al., 2011).

2.2. Trueperella bonasi, Trueperella bialowiezensis, Trueperella pyogenes und Arcanobacterium haemolyticum

2.2.1. Taxonomie und phylogenetische Einordnung

Aufgrund biochemischer Profile und 16S rDNA-Gensequenzanalysen wurden *Trueperella bonasi* und *Trueperella bialowiezensis* bisher zur Gattung *Arcanobacterium* gezählt, zu der neun Spezies zählen: *Arcanobacterium abortisuis*, *A. bernardiae*, *A. bialowiezense*, *A. bonasi*, *A. haemolyticum*, *A. hippocoleae*, *A. phocae*, *A. pluranimalium* und *A. pyogenes* (Lehnen et al., 2006). Einige Arcanobakterien gehörten früher zu anderen Gattungen und

wurden im Laufe der Zeit mehrfach umbenannt. Der erste Vertreter dieser Gruppe war *Arcanobacterium haemolyticum* (Collins et al., 1982), vormals *Corynebacterium haemolyticum* (MacLean et al., 1946). Durch die Neuklassifizierung von *Actinomyces bernardiae* zu *Arcanobacterium bernardiae* (Ramos et al., 1997) und *Bazillus pyogenes* über die Stufen *Corynebacterium pyogenes* (Glage, 1903), und *Actinomyces pyogenes* (Collins und Jones, 1982; Reddy et al., 1982) zu *Arcanobacterium pyogenes* (Ramos et al., 1997) erhielt die Gattung zwei weitere Mitglieder.

Neuere chemotaxonomische und phylogenetische Untersuchungsergebnisse unterstützten jedoch frühere, durch die Untersuchung von Fettsäuren, Chinonen und polaren Lipiden gewonnene Hinweise darauf, dass die neun Arcanobakterien-Spezies innerhalb ihrer Gattung zwei Gruppen („cluster“) bilden (Abb. 2.2), die sich so deutlich voneinander unterscheiden, dass sie den Status eigenständiger Gattungen verdienen (Lehnen et al., 2006). Yassin et al. (2011) verfestigten diese Vermutungen und schlugen vor, nur drei Spezies in der Gattung *Arcanobacterium* zu belassen: *A. haemolyticum*, *A. phocae* und *A. pluranimalium*. Für *A. abortusis*, *A. bernardiae*, *A. bialowiezense*, *A. bonasi* und *A. pyogenes* schlugen die Autoren die Schaffung einer neuen Gattung namens „*Trueperella* gen. nov.“ vor. Die genaue Gattungszugehörigkeit von *A. hippocoleae* ist laut Yassin et al. (2011) nicht eindeutig; phylogenetisch gesehen sollte diese Spezies eher *Arcanobacterium* spp. als *Trueperella* spp. zugeordnet werden. Die neue Taxonomie stand mir erst ab September 2010 zur Verfügung; alle Arbeitshypothesen und Laboruntersuchungen der vorliegenden Arbeit bauen auf die vorher gültige taxonomische Einteilung auf und berücksichtigen die neue Klassifizierung nicht. Die Benennung der Bakterien in dieser Arbeit wurde jedoch der neuen Nomenklatur angepasst.

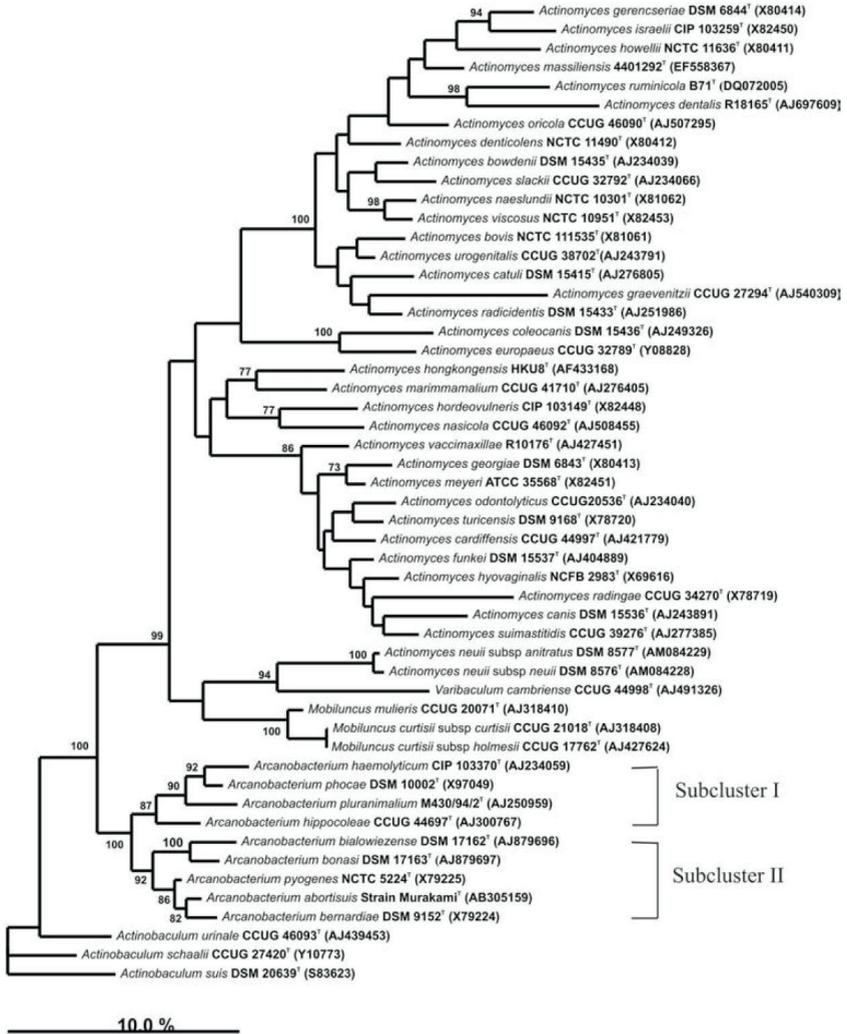


Abb. 2.2.: Phylogenetischer Stammbaum verschiedener Arten und Unterarten von *Arcanobacterium* und *Actinomyces* spp. (mit freundlicher Genehmigung von Yassin et al., 2011)

2.2.2. Erscheinungsbild der bakteriellen Kulturen

Die Kolonien von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* unterscheiden sich in ihrer Kulturmorphologie nur geringfügig. Beide Spezies sind auf Columbia-Schafblutagar-Platten (5% Schafblut) nach 48-72 h Bebrütung bei 37°C in aerobem Milieu als feine, glänzende, weißliche, stecknadelkopfgroße Kolonien mit glattem Rand zu erkennen (Lehnen, 2005). Kolonien von *T. bonasi* (DSM 17163) erreichen allerdings erst nach 72 h Inkubationszeit die Größe, die *T. bialowiezensis* (DSM 17163)-Kolonien bereits nach 48 h erreicht haben (eigene Beobachtung). An den Grenzen zu den Kolonien beider Spezies bildet sich eine sehr feine Zone vollständiger Hämolyse aus (Lehnen, 2005).

Im Vergleich hierzu benötigen *T. pyogenes* und *A. haemolyticum* zum optimalen Wachstum eine mit 5% CO₂ angereicherte Atmosphäre, in der sie auf Columbia-Schafblutagar-Platten nach 24 h auf stecknadelspitzengroße, glasige und innerhalb von 48 h zu 2-3 mm großen, weißen Kolonien heranwachsen. Bei *T. pyogenes* sind die feinen Kolonien von einer Zone vollständiger Hämolyse umgeben (Funke et al., 1997; Lucas, 2009; Rolle und Mayr, 2006). *Arcanobacterium haemolyticum* bildet auf Schaf- oder Rinderblut-Agarplatten keine Hämolysezone aus, sondern nur auf Agarplatten mit Kaninchen-, Pferde- oder Humanblut. Auf Schaf- oder Rinderblut-Agarplatten benötigt das Bakterium zur Ausbildung einer vollständigen β -Hämolysezone die Zugabe von 10% „Equi Faktor“, dem sterilfiltrierten Kulturüberstand einer 24 h-Flüssigkultur von *Rhodococcus equi* (García-de-la-Fuente et al., 2008; Lucas, 2009; Ülbegi-Mohyla et al., 2009). Das glatte, glänzende Kolonie-Wachstum mit Hämolyse entspricht dem des *A. haemolyticum*-Biovar „smooth type“. Im Gegensatz dazu weisen die Kolonien des Biovars „rough type“ eine raue Oberfläche auf und besitzen keine Hämolysezone. Beide Biovars unterscheiden sich auch in ihren biochemischen Eigenschaften (Carlson et al., 1994a).

Lichtmikroskopisch betrachtet erscheinen *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* Arcanobakterientypisch als Gram-positive, unbewegliche, pleomorphe, oft diphteroid gelagerte, kurze, schlanke Stäbchen (Lehnen et al., 2006). Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen dies (Abb. 2.3).

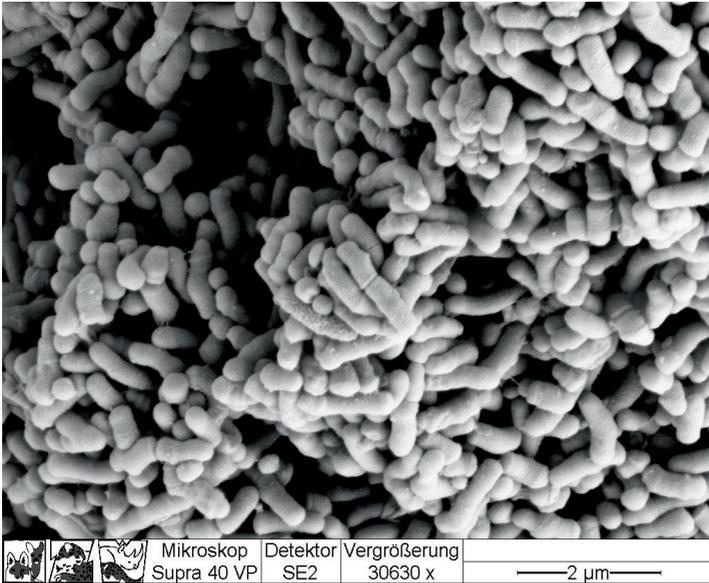


Abb. 2.3.: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer *T. bialowiezensis*-Kolonie (Foto: D. Viertel, IZW Berlin)

2.2.3. Methoden zur Artbestimmung von *Arcanobacterium* und *Trueperella*

Die Artbestimmung kann mithilfe biochemischer Profile, molekulargenetischer Nachweismethoden oder des Erscheinungsbildes artspezifischer Proteine in Trenngelen erfolgen.

2.2.3.1. Biochemisches Profil

Die unterschiedlichen *Arcanobacterium* und *Trueperella* Spezies lassen sich anhand ihrer biochemischen Profile mit Hilfe der „API“ Testsysteme „API CORYNE“, „API ZYM“ und „API 50CH“ (BioMérieux) unterscheiden (Narayanan et al., 1998; Ramos et al., 1997). Ferner können zur Identifikation das „API 20 STREP“-System und das „RapID™ ANA II“ (Oxoid) eingesetzt werden (Morrison und Tillotson, 1988; Brander und Jousimies-Somer, 1992). Im Vergleich zu *A. haemolyticum* und *T. pyogenes* zeigen sich *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* biochemisch vergleichsweise unreaktiv. Sie wachsen weder auf Gassner- noch auf McConkey-Agar, sind im O/F-Test negativ, sind Katalase-negativ und zeigen keine Serolyse-Reaktion auf der Löffler-Pferdeserum-Platte (Lehnen, 2005).

2.2.3.2. Spezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ramos et al. (1997) untersuchten aus Gewebeproben isolierte genomische DNA mit Hilfe einer für die 16S rRNA von Arcanobakterien spezifischen PCR. Da die direkte Anzucht von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* aus Wisent-Präputialgewebe oder -Tupferproben nicht immer möglich war, entwickelte Lehnen für den Nachweis dieser Bakterien eine spezifische PCR für 16S rDNA (Lehnen, 2005). Spezies können auch über „*intergenic spacer regions*“ (ISR) identifiziert werden (Hassan et al., 2008). Dabei werden die 16S – 23S rRNA ISR amplifiziert und sequenziert. Durch Vergleich mit archivierten speziespezifischen Sequenzen (z.B. GenBank) erfolgt dann die genaue Spezieszuordnung.

2.2.3.3. Sonstige Verfahren

Lehnen (2005) stellte fest, dass die Proteinbandenprofile von sechs Arcanobakterien-Spezies unterschiedlich aussehen. Auch in der SDS-PAGE Gelelektrophorese (SDS: *engl.* „sodium dodecyl sulfate“, PAGE: *engl.* „polyacrylamide gel electrophoresis“) unterscheiden sich diese sechs Spezies deutlich voneinander (Lehnen, 2005). Hijazin et al. (2012a) entwickelten ein massenspektrometrisches Verfahren zur Speziesdifferenzierung von 7 Spezies der Gattungen *Trueperella* und *Arcanobacterium*.

2.2.4. Durch *Trueperella* und *Arcanobacterium* verursachte Krankheiten

2.2.4.1. *Trueperella bonasi* und *Trueperella bialowiezensis*

Beide Erreger wurden bisher nur im Zusammenhang mit der Balanoposthitis des Wisents beschrieben. Die Bedeutung von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* für das Krankheitsgeschehen der Balanoposthitis ist gegenwärtig unklar. Für ihre Beteiligung an der Ätiologie der Erkrankung spricht jedoch, dass sie bisher ausschließlich bei kranken und noch in keinem Fall bei gesunden Wisentbullen nachgewiesen wurden und, im Gegensatz zu anderen potentiellen Erregern, schon im Frühstadium der Erkrankung im Gewebe anwesend sind. Zudem lassen sich Parallelen beim Vergleich der Balanoposthitis-Symptome mit Erkrankungen erkennen, die z.B. durch *T. pyogenes* beim Hausrind und Hausschaf und *A. haemolyticum* beim Menschen verursacht werden. Bei Infektionen mit *A. haemolyticum* und *T. pyogenes* kommt es häufig zu purulenten Entzündungen der Haut und Schleimhäute, die den eitrig-nekrotisierenden bis diphteroiden Präputial- und Penisentzündungen der an Balanoposthitis erkrankten Wisente ähnlich sind und im Folgenden besprochen werden. Die nahe Verwandtschaft von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* mit *T. pyogenes* und anderen Vertretern

der Gattungen *Arcanobacterium* und *Trueperella* legt die Hypothese nahe, dass *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* über ähnliche Virulenzfaktoren verfügen, die es ihnen ermöglichen, Wirtszellen zu besiedeln und zu zerstören. Auch eine Übertragung der Balanoposthitis-Erreger über Fliegen, wie sie bei der von *T. pyogenes* verursachten Sommermastitis vorkommt, ist denkbar (Lehnen, 2005). Möglicherweise treten *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* auch synergistisch mit *Fusobacterium* sp. oder *Mycoplasma* spp. auf (Lehnen 2005). Vertreter beider Bakteriengattungen wurden sowohl bei Infektionen mit *A. haemolyticum* (Lundblom et al., 2010; Stacey und Bradlow, 1999) und *T. pyogenes* (Doré et al., 2007; Rolle und Mayr, 2006; Seimiya et al., 2004; Kidanemariam et al., 2005), als auch bei an Balanoposthitis erkrankten Wisenten nachgewiesen.

2.2.4.2. *Arcanobacterium haemolyticum*

Arcanobacterium haemolyticum galt lange Zeit als ausschließlich humanpathogener Erreger, der erstmals von MacLean et al. (1946) beschrieben und vorwiegend aus Infektionen des Nasopharynx und der Haut isoliert wurde. Zur Risikogruppe für *A. haemolyticum*-bedingte Sinusitis, Pharyngitis und Tonsillitis gehören Jugendliche und junge Erwachsene. Die Symptomatik ähnelt der von *Streptococcus pyogenes*-Infektionen und reicht von Fieber, pharyngealem Exsudat und zervikaler Lymphadenopathie bis zu einem generalisierten, scharlachartigen Exanthem, das in 20-25% der Fälle 1-4 Tage nach dem Erscheinen der Pharyngitis-Symptome auftritt (Banck und Nyman, 1986; Linder, 1997; Carlson et al., 1994b; Darai et al., 2012).

Ursächlich durch *A. haemolyticum* bedingte Wundinfektionen, eitrige Entzündungen des Weichteilgewebes und Abszesse sind sowohl beim Menschen (Dobinsky et al., 1999; Tan et al., 2006) als auch, obgleich weitaus seltener, beim Pferd (Hassan et al., 2009) und beim Hauskaninchen (*Oryctolagus cuniculus forma domestica*) (Tyrrell et al., 2002) beschrieben worden.

Mehrere Autoren berichten zudem von selten auftretenden, tief sitzenden systemischen Erkrankungen wie Endokarditis, Osteomyelitis, septischer Arthritis, Meningitis und Pneumonie mit zum Teil septikämischem Verlauf, die entweder auf *A. haemolyticum* alleine zurückgeführt wurde oder, im Falle der Lemierre-Krankheit, als Co-Infektion mit *F. necrophorum* auftraten (Skov et al., 1998; Younus et al., 2002; Goyal et al., 2005; Therriault et al., 2008; Lundblom et al., 2010).

Es wird vermutet, dass die Haut oder Schleimhaut als Reservoir für *A. haemolyticum* dient und dass der Erreger durch Tröpfcheninfektionen übertragen wird (Lucas, 2009). Untersuchungen hierzu fehlen jedoch. Die Typisierung von insgesamt 138 aus menschlichen Proben isolierten *A. haemolyticum*-Stämmen ergab, dass die Stämme des Biovars „smooth type“ vorwiegend (75%) aus Wundinfektionen isoliert wurden, während das Biovar „rough type“ nahezu ausschliesslich in Verbindung mit Atemwegsinfektionen auftrat (Carlson et al., 2004a).

2.2.4.3. *Trueperella pyogenes*

Trueperella pyogenes ist ein vorwiegend veterinärmedizinisch relevanter, ubiquitär vorkommender opportunistischer Erreger, der entweder alleine oder zusammen mit anderen Bakterien (u.a. *Fusobacterium* spp., *Escherichia coli* oder *Staphylococcus aureus*) aus betroffenem Gewebe isoliert wird. Zu den Hauptwirten von *T. pyogenes* zählen insbesondere Hausrinder, Hausschafe, Hausziegen, Hausschweine und einige Wildwiederkäuerarten. *T. pyogenes* verursacht purulente Infektionen, die sowohl lokal beschränkt als auch systemisch auftreten können. Das Reservoir sind die Haut und Schleimhäute empfänglicher Wirtsspezies, wobei der Eintritt in den Wirt häufig über Gewebeläsionen erfolgt (Hirsh et al., 2004; Jost und Billington, 2005; Ericsson Unnerstad et al., 2009).

Beim Rind ist *T. pyogenes* hauptsächlich für Erkrankungen der Reproduktionsorgane verantwortlich. Wirtschaftlich relevant ist vor allem die Sommermastitis (auch bekannt als Holsteinsche Euterseuche), die trächtige Färsen und trockenstehende Kühe betrifft, die auf der Weide regelmäßigen Kontakt zu als Vektoren fungierenden Fliegenarten haben oder schlechten melkhygienischen Bedingungen ausgesetzt sind. Gewebeläsionen am Euter und den Zitzen begünstigen die Infektion, die mit einer schmerzhaften ödematösen Schwellung und Rötung eines oder mehrerer Euterviertel einhergeht. Im Gewebe bilden sich im fortgeschrittenen Stadium eitrig Abszesse. Das Eutersekret ist dunkel, blutig und enthält Gewebeteile (Rolle und Mayr, 2006). Der Anteil der *T. pyogenes*-Infektionen an Mastitiden beim Rind liegt zwischen 3,5% und 13% (Waage et al., 1999; Ericsson Unnerstad et al., 2009; Azawi et al., 2008). Gelangt *T. pyogenes* entweder ascendierend über Vagina und Cervix oder auf hämatogenem Wege in den Uterus der Kuh, kann es zu Aborten mit eitrig-nekrotisierender Plazentitis kommen (de Kruif, 1999; Rolle und Mayr, 2006). Für *T. pyogenes*-Endometritiden sind besonders trockenstehende Kühe und solche mit Zitzenverletzungen empfänglich (Silva et al., 2008; Petit et al., 2009; Santos et al., 2010).

T. pyogenes-Infektionen bei Bullen können zu seminaler *Vesiculitis purulenta*, purulenter Balanoposthitis und Orchitis führen (Roppel und Campero, 1998; Rolle und Mayr, 2006). Des Weiteren sind beim Rind durch *T. pyogenes* verursachte Pyelonephritis (Rosenbaum et al., 2005) und Thromboembolie (Müller et al., 2005) bekannt. Bei Leberabszessen (Doré et al., 2007; Rolle und Mayr, 2006) und Atemwegsinfektionen (Seimiya et al., 2004) kommen synergistische Infektionen von *T. pyogenes* mit *F. necrophorum* vor (Songer und Post, 2005).

Bemerkenswert ist, dass die Pathologie der *T. pyogenes*-Erkrankung bei Wildwiederkäuern von der bei Hausrind, -schaf und -ziege abweicht. Zwar wurden auch hier Metritiden berichtet (Twomey et al., 2010), aber die Anzahl der Fälle mit Pneumonie und Abszessen überwiegen. Pneumonien mit *T. pyogenes*-Beteiligung wurden unter anderen bei Rothirsch (Hattel et al., 2007), Alaska-Schneeschaf (*Ovis dalli*) (Jenkins et al., 2007), Hirschziegenantilope (*Antelope cervicapra*) (Portas und Byrant, 2005) und Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) (Hattel et al., 2004) beschrieben. Mehrere Studien untersuchten die Todesursachen bei den in den USA und Kanada vorkommenden Weißwedelhirschen im Zeitraum zwischen 1986 und 2008 (Baumann et al., 2001; Nettles et al., 2002; Karns et al., 2009). Die Autoren stellten fest, dass besonders viele männliche Tiere intrakranielle Abszesse aufwiesen, an deren Entstehen hauptsächlich *T. pyogenes* beteiligt war. Das gehäufte Auftreten bei männlichen Tieren wurde darauf zurückgeführt, dass sich die Hirschbullen Verletzungen der Kopfhaut durch das Reiben ihres Geweihs an Bäumen und während der Brunftzeit durch Rankenkämpfe mit anderen Bullen zuziehen, die als Eintrittspforte für die Bakterien dienen können. Es wird vermutet, dass *T. pyogenes* mit Hilfe seiner proteolytischen Enzyme den Schädelknochen durchdringen und das Gehirn infizieren kann (Baumann et al., 2001).

Zu erwähnen ist auch eine Studie über die Genitalflora männlicher und weiblicher Dorper-Hausschafe. Bei diesen in Südafrika beheimateten Tieren wurden mehrere Fälle von ulzerativer Balanitis und Vulvitis bekannt. Als am Krankheitsprozess beteiligte Bakterien wurden Mykoplasmen (bei 78% der erkrankten Tiere) und *T. pyogenes* (in 44,2% der Fälle) nachgewiesen. Von den Autoren wird ein synergistisches Zusammenwirken dieser Bakterien-spezies angenommen (Kidanemariam et al., 2005).

Neben Mastitiden treten bei Schafen und Ziegen Pyobacillosen auf, während bei Schweinen vorwiegend über Wundinfektionen berichtet wird (Rolle und Mayr, 2006); *T. pyogenes*-Mastitiden bei Sauen sind jedoch ebenfalls beschrieben (Christensen et al., 2007). Vereinzelt

wird über die Beteiligung von *T. pyogenes* an eitrigen Entzündungen bei Caniden, Reptilien und Vögeln berichtet. Bekannt sind der Fall eines Hundes mit Cystitis, einer Katze mit chronischer *Otitis externa* und fibrinopurulentem Exsudat aus dem Ohr (Billington et al., 2002b), der einer Bartagame (*Pogona vitticeps*) mit Pneumonie sowie der eines Geckos, der an einer *T. pyogenes*-Septikämie verstarb (Ülbegi-Mohyla, 2010a). Der Erreger wurde auch bei an Osteomyelitis erkrankten Truthähnen (*Meleagris gallopavo forma domestica*) nachgewiesen Brinton et al. (1993).

Ebenfalls selten werden *T. pyogenes*-Infektionen beim Menschen beschrieben. In den meisten Fällen hatten die betroffenen Patienten vor ihrer Erkrankung engen Kontakt zu Wiederkäuern oder Schweinen. Zu den belegten Fällen zählen Wund- (Kavitha et al., 2010), Atemwegs- (Hermida Amejeiras et al., 2004; Levy et al., 2009) und Abdominalinfektionen (Gahrhansen und Frederiksen, 1992), Endokarditiden (Plamondon et al., 2007), Fuß-Ulcera (Kotrajara und Tagami, 1987), und Abszesse (Dias et al., 1996).

2.2.4.4. *Trueperella bernardiae*, *Trueperella abortusis*, *Arcanobacterium phocae*, *Arcanobacterium pluranimalium*, *Arcanobacterium hippocoleae*

Über die pathogenen Eigenschaften der übrigen fünf Vertreter der Gattungen *Arcanobacterium* und *Trueperella* ist nicht viel bekannt, da sie bisher selten und oft aus nur einem Tier oder wenigen Individuen einer Spezies isoliert wurden.

Trueperella bernardiae comb. nov., im Folgenden als *T. bernardiae* bezeichnet (Funke et al., 1995; Ramos et al., 1997), wurde neben anderen Erregern bei lokalen Entzündungen beim Menschen nachgewiesen (Bemer et al., 2009; Loïez et al., 2009; Clarke et al., 2010).

Arcanobacterium phocae wurde mit durchschnittlich 8% Prävalenz aus Kalifornischen Seelöwen (*Zalophus californianus*), Seehunden (*Phoca vitulina*), Seeelefanten (*Mirounga* spp.), Seeottern (*Enhydra lutris*) und Gemeinen Delfinen (*Delphinus delphis*) isoliert, die zwischen 1994 und 2000 an der kalifornischen Küste tot oder lebend gestrandet waren (Ramos et al. 1997). Hierbei dominierten oberflächliche pyogene Infektionen wie Abszesse, Haut- und Wundinfektionen, die häufig als Mischinfektionen mit anderen Bakterien auftraten. Auch systemische *A. phocae*-Infektionen wie Hirnabszesse oder Osteomyelitiden wurden beobachtet. Diesen waren aber in der Regel Hautverletzungen (Schusswunden, Bisse, chirurgische Eingriffe) vorangegangen, die als Bakterien-Eintrittspforten dienten. Die

Bakterien wanderten anschließend über das lymphatische System, Nervenbahnen oder Blutgefäße bis zu den Zielorganen (Johnson et al., 2003). Die Pathologie der *A. phocae*-Infektionen weist große Parallelen mit *T. pyogenes*- und *A. haemolyticum*-Infektionen auf, und die von ihnen verursachten eitrigen Haut- und Wundinfektionen erinnern an die eitrig-nekrotisierende Balanoposthitis beim Wisent.

Arcanobacterium pluranimalium kommt bei verschiedenen Säugetierarten vor und wurde erstmals aus der Milz eines toten Schweinswals (*Phocoena phocoena*) und aus einem Lungenabszess eines Damhirsches (*Cervus dama*) isoliert (Lawson et al., 2001). Dieses Bakterium wurde auch bei einem Haushund nachgewiesen (Ülbegi-Mohyla et al., 2010b).

Arcanobacterium hippocoleae wurde bislang viermal aus Hauspferden isoliert – aus dem Vaginalausfluss einer Stute (Hoyles et al. 2002), aus dem Urin eines Pferdes (Cai et al., 2003) und aus der abortierten Plazenta einer Stute sowie aus dem Magen und der Lunge des abortierten Fohlens (Bemis et al., 2008).

Trueperella abortisuis comb. nov. (im Folgenden als *T. abortisuis* bezeichnet) ist der jüngste bekannte Vertreter der Gattung *Trueperella*. Azuma et al. (2009) isolierten das Bakterium erstmals aus der abortierten Plazenta einer Sau. Seitdem wurde es auch aus Rindern isoliert und spielt möglicherweise eine Rolle bei Infektionen anderer Spezies (Hijazin et al., 2012b).

2. 3. Bakterielle Virulenzfaktoren

2.3.1. Überblick

Die Pathogenität eines Mikroorganismus hängt von dessen Fähigkeit ab, in einen Wirtsorganismus eindringen, sich in selbigem vermehren und vor dem Immunsystem des Wirtes schützen zu können und Stoffwechselprodukte zu erzeugen, die auf den Wirt schädigend einwirken können. Bakterien haben eine Vielzahl an Virulenzfaktoren entwickelt (siehe Abb. 2.4.), die entweder Zell-assoziiert agieren oder extrazellulär wirken (Winn et al., 2005). Dabei werden folgende Faktoren unterschieden:

Adhäsine. Diese ermöglichen den Bakterien ihre Anheftung an Glykolipide oder Glykoproteine der Wirtszellmembran vor dem Eindringen in die Wirtszelle (Winn et al., 2005).

Kapseln. Einige Bakterien verfügen über eine Kapsel, die sie vor der Phagozytose durch den Wirt schützt (Buselmeier, 2009).

Siderophoren. Dies sind kleine Moleküle (<1 kDa), die dem Wirt Fe^{3+} -Ionen entziehen und mittels aktiver Transportmechanismen in die Bakterienzelle befördern, um sie dort zu speichern und später dem bakteriellen Stoffwechsel zuzuführen (Ratledge, 2007).

Invasine. Diese agieren extrazellulär, indem sie bestimmte Strukturen der Wirtszellmembran angreifen und so schädigen, dass sie für die Bakterien durchlässig wird. Die Zellen selbst werden dabei meist nicht zerstört. Invasine sind zumeist Enzyme, deren Name für ihre Funktion steht – so depolymerisieren Hyaluronidasen beispielsweise Hyaluronsäurepolymere, Kollagenasen spalten Kollagen und Neuraminidasen bauen Neuraminsäuren ab (Todar, 2010).

Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS). LPS ist ein Bestandteil der Zellmembran Gram-negativer Bakterien. Es setzt sich aus dem in der äußeren Bakterienwand verankerten Lipid A, sowie aus einer Polysaccharideinheit zusammen, die aus einem Mittelstück („Core-Region“) und dem O-Antigen besteht. Nach durch Immunabwehr hervorgerufener Bakteriolyse wird bakterienmembrangebundenes Lipid A frei. Es ist ein Endotoxin, das Immunreaktionen des Wirtsorganismus wie die Zytokinproduktion oder die Aktivierung der Komplementkaskade auslöst und zu einem breiten Spektrum pathophysiologischer Reaktionen wie Fieber, Hypotonie, intravaskuläre Koagulation, Schock und Tod führen kann (Todar, 2010).

Exotoxine. Sie stellen die am stärksten pathogene Gruppe bakterieller Virulenzfaktoren dar. Sie werden sowohl von Gram-positiven als auch Gram-negativen Organismen gebildet und in den Extrazellularraum abgegeben. Ihre Wirkung ist somit nicht auf den Infektionsherd beschränkt, sondern kann weit davon entfernte Wirtsstrukturen betreffen – je nach Wirkungsort werden sie auch als Enterotoxine, Neurotoxine, Zytotoxine, etc. bezeichnet. Nach Bindung an entsprechende Wirtszellrezeptoren können sie die Signaltransduktion der Wirtszelle stören, Löcher in deren Membran stanzen, gezielt einzelne Membrankomponenten zerstören oder ins Zytosol der Wirtszellen eindringen, für Veränderungen im Aktinskelett sorgen oder den Stoffwechsel der Wirtszelle schädigen, indem sie in die Proteinsynthese der Zelle eingreifen. Sie können die Homöostase stören, den Stofftransport behindern oder in die

Reproduktion der Zelle eingreifen. Superantigene dagegen erzeugen eine gegen den Wirt selbst gerichtete Immunantwort, die bis zum toxischen Schock des Wirtsorganismus führen kann (Popoff, 2005).

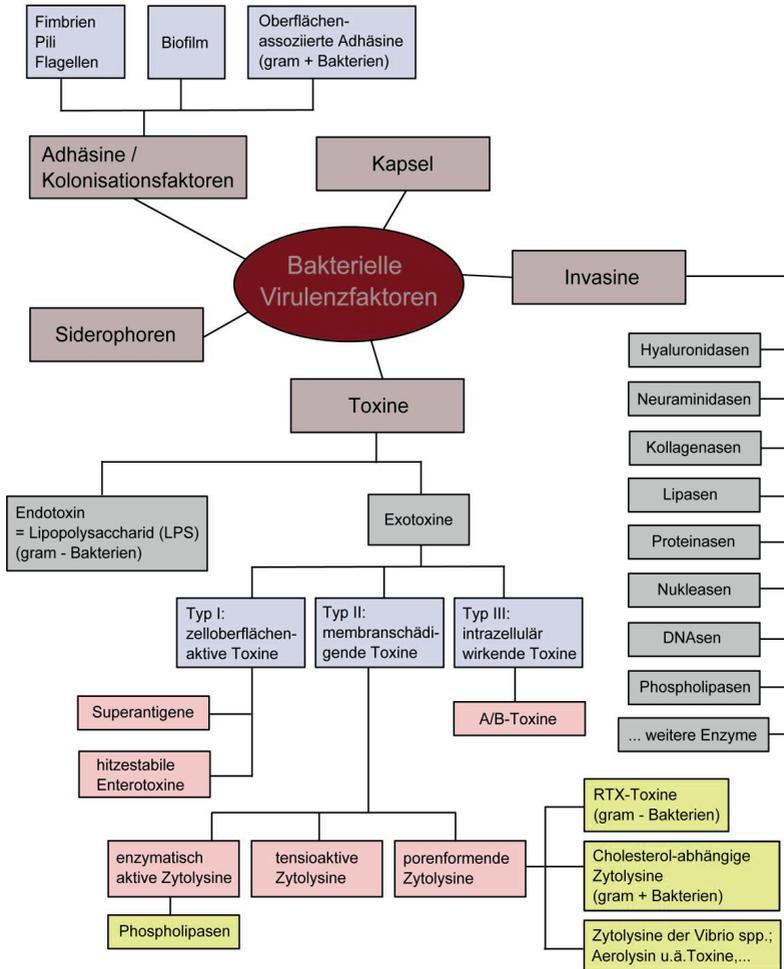


Abb. 2.4.: Einteilung bakterieller Virulenzfaktoren

2.3.2. Cholesterol-abhängige Zytolysine (CDCs)

In der Gruppe der Cholesterol-abhängigen Zytolysine (CDCs), zu der mittlerweile ca. 30 Hämolysine Gram-positiver, zumeist pathogener (Ausnahme: *Listeria seeligeri*) Bakterien gehören, befinden sich viele sehr potente Virulenzfaktoren, wie beispielsweise Botulinolysin (BLY) von *Clostridium botulinum*, Tetanolysin (TLY) von *Clostridium tetani*, Perfringolysin O (PFO) von *Clostridium perfringens*, Anthrolysin (ALO) von *Bacillus anthracis* oder Pneumolysin (PLY) von *Streptococcus pneumoniae*. CDCs werden, mit Ausnahme von Pneumolysin (*Streptococcus pneumoniae*), über einen Typ II-Sekretionsweg als wasserlösliche, monomere Proteine in das Extrazellulärmedium sezerniert und binden an Zelloberflächenstrukturen der Wirtszellen. Mit Ausnahme von Intermedilysin (*Streptococcus intermedius*) dient den CDCs Cholesterol als Toxinbindungsrezeptor. Die aus vier Domänen bestehenden Monomere bilden untereinander nicht-kovalent gebundene, amphipathische Oligomere, die große Poren (siehe Abb. 2.5.) in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle formen (Alouf, 2006a; Alouf et al., 2006b; Rosado et al., 2008; Heuck et al., 2010). Shatursky et al. (1999) und Ramachandran et al. (2002) haben den Mechanismus der Porenbildung erforscht und fanden Hinweise darauf, dass sich die CDCs mit Hilfe der Undekapeptid-Schleife an der Spitze von Domäne 4 in der Wirtszellmembran verankern. In dieser tryptophanreichen Schleife befindet sich auch die hochkonservierte Region (ECTGLAWE-WWR), die mit wenigen Variationen bei allen CDCs zu finden ist (Gilbert, 2010). Domäne 3 bildet die Außenwand der Poren, die aus 30-50 Monomeren bestehen und einen Durchmesser von bis zu 40 nm erreichen können (Tveten, 2005; Gilbert, 2010). Durch die Porenbildung verursachen CDCs die Aufquellung und Lyse von Wirtszellen (Braun und Focareta, 1991; Walz, 2005). Mit ihrer zytolytischen und hämolytischen Wirkung sind sie in der Lage, Körperzellen und Zellen des weißen und roten Blutbildes anzugreifen und zu zerstören, sowie die Replikation der Bakterien voranzutreiben. Listeriolysin O beispielsweise ermöglicht *Listeria monocytogenes*, vom extrazellulären Raum in das schützende Zytoplasma einer Zelle zu entkommen, wo sich das Bakterium rasch ohne Intervention des Immunsystems vermehren kann (Vasquez-Boland et al., 2001). Eine Vielzahl von Erkrankungen bei Tieren und Menschen kann auf die Wirkung von CDCs zurückgeführt werden. Hierzu zählen die Amerikanische Faulbrut der Honigbienen (*Apis mellifera*) (verursacht durch: Alveolysin O), Milzbrand (Anthrolysin O), Gasbrand (Perfringolysin O), Pneumonien (Pneumolysin O, Pyolysin), Pharyngitis (Streptolysin O) und Listeriose (Listeriolysin O) (Gilbert, 2010). Aufgrund ihrer funktionellen Ähnlichkeit zu Proteinen der „membrane attack complex/perforin-family“ (MACPF) werden die CDCs neuerdings unter dem Überbegriff

„MACPF/CDC-Superfamilie“ zusammengefasst, da lytische MACPF-Proteine einen ähnlichen Mechanismus der Porenbildung wie CDCs nutzen. MACPF-Proteine kommen bei Eukaryoten vor und sind im Immunsystem bei der Abwehr viraler und bakterieller Erreger sowie bei der Tumorkontrolle eingebunden (Rosado et al., 2008; Gilbert, 2010; Qiao et al., 2010).

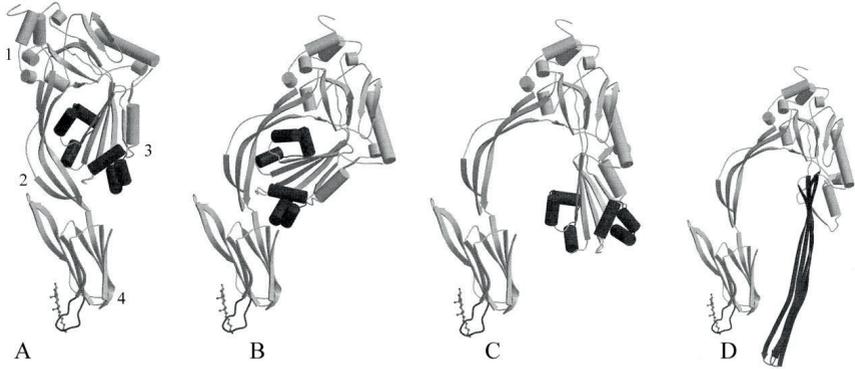


Abb. 2.5.: Schematische Darstellung eines CDC-Monomers während der Porenbildung. 1-4 = Domänen 1-4. Die Undekapeptid-Schleife der Domäne 4 ist in den Abbildungen A-D an ein Molekül Cholesterin gebunden. Die dunklen Bereiche markieren die Transmembran-β-Haarnadel (TMH)-Regionen der Domäne 3, die mit der Entfaltung der Domäne 3 (B-D) freigegeben werden. Diese formen nach ihrer Insertion in die Membran zusammen mit den TMH-Regionen anderer CDC-Monomere den Prä-Porenkomplex und später die Pore (leicht modifiziert nach Polekhina et al., 2006; Abdruck der Grafik mit freundlicher Genehmigung des Verlages Elsevier Ltd, USA)

2.3.2.1. Arcanolysin (ALN)

Arcanolysin (ALN) ist ein von *Arcanobacterium haemolyticum* gebildetes Cholesterol-abhängiges Zytolysin und ein für die Gruppe der CDCs untypisches Toxin (Lucas, 2009; Jost et al., 2011). Das 1.764 bp lange Gen, das für ein 64,1 kDA schweres Protein kodiert, weist sowohl in seiner Nukleotid- als auch in seiner Aminosäuresequenz signifikante Abweichungen der undekapeptiden Region zu dieser bei anderen CDCs hoch konservierten Aminosäuresequenz auf. Anstelle von „ECTGLAWE-WWR“ lautet die Sequenz bei ALN „EGTGLAWDKWW-“. Zudem verfügt ALN über eine N-terminale Extensionssequenz, die Sequenzen von Listeriolysin O und Streptolysin O (*Streptococcus pyogenes*) gleicht. Arcanolysin weist mit anderen CDCs eine durchschnittliche Nukleinsäuresequenz-Übereinstimmung von nur 55-56% auf. Die größte Aminosäuresequenz-Übereinstimmung

(74,3%) hat ALN mit Pyolysin (PLO) von *T. pyogenes*. In Klon-Versuchen mit rekombinantem ALN zeigte sich, dass es mit hoher Speziespräferenz an humane Erythrozyten bindet und auf diese zehnmals toxischer wirkt als auf ovine und bovine Erythrozyten. Diese Ergebnisse werden durch die Tatsache unterstützt, dass *A. haemolyticum* auf Schaf- und Rinderblutplatten eine kaum sichtbare Hämolysezone um seine Kolonien herum entwickelt, während die Hämolyse der Bakterien auf Human- und Kaninchenblut wesentlich ausgeprägter ist (Ülbeği, 2010; Jost et al., 2011). Da die Anwesenheit von freiem Cholesterin die zytolytische Aktivität von ALN kaum verringert, gehen Jost et al. (2011) davon aus, dass das Toxin an einen anderen Rezeptor bindet. Die Autoren nehmen an, dass ALN als Virulenzfaktor eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von *A. haemolyticum*-Infektionen spielt.

2.3.2.2. Pyolysin (PLO)

Pyolysin (PLO) ist ein Cholesterin-abhängiges Zytolysin und das hämolytische Exotoxin von *Trueperella pyogenes* (Roberts, 1968). Es ist der wichtigste Virulenzfaktor des Bakteriums. Es hat eine lytische Wirkung auf ein weites Spektrum tierischer Blutzellen und modifiziert die Zytokinexpression der Wirtszellen (Jost et al., 1999). Mittels Ammoniumsulfat- und Polyethylenglycol 4000-Fällung kann PLO aus dem Kulturüberstand einer *T. pyogenes*-Flüssigkultur gewonnen werden (Ding und Lämmler (1996). Billington et al. (1997) klonierten das PLO-Gen in kompetente *E. coli*-Zellen, die auf rinderbluthaltigen (5%) Selektivagarplatten auf hämolytische Aktivität selektiert wurden. Die Untersuchung der hämolysierenden Klone ergab ein 1.605 bp langes Gen, das für ein 57,9 kDA großes Protein kodiert. Pyolysin besitzt wie ALN eine von den anderen CDCs abweichende undekapeptide Region (Tabelle 2.1.). Eine zielgerichtete Mutagenese zeigte, dass diese Region für die Stärke der von PLO verursachten Hämolyse verantwortlich und für die vollständige Ausbildung seiner zytolytischen Aktivität essentiell ist (Billington et al., 1997, Billington et al., 2002b). Insbesondere die Anwesenheit von Prolin (P) scheint für die Virulenz des Toxins essentiell zu sein, da prolinfreie Mutanten nicht mehr zur Hämolyse fähig waren. Die Bindung von PLO an Membrancholesterin wurde durch die Mutagenese der als konserviert geltenden Region jedoch nicht behindert (Billington et al., 2002a). Intravenös oder intraperitoneal appliziert führt PLO den Tod von Labormäusen herbei. Versuche mit Knockout-Mäusen zeigten, dass nach Infektion mit *T. pyogenes*-Mutanten mit inaktiviertem *plo*-Gen signifikant weniger Tiere starben, als nach der Infektion mit dem *T. pyogenes*-Wildtyp (Jost et al., 1999). PLO-basierte Subunit-Vakzine schützten Mäuse wirksam vor Infektionen mit *T. pyogenes* (Billington et al.,

2001). Jost et al. (1999) stellten auch eine zytotoxische Wirkung von PLO für murine peritoneale Makrophagen und J774-Zellen fest. Pyolysin ist für die Virulenz und das Überleben von *T. pyogenes in vivo* essentiell (Jost et al., 1999).

Tab. 2.1.: Vergleich der Undekapeptide von ALN (Jost et al., 2011) und PLO (Billington et al., 1997) mit denen anderer CDCs. LLO: Listeriolysin O (Mengaud et al., 1989), PFO: Perfringolysin O (Tweten, 1988), PLY: Pneumolysin (Walker et al., 1987) und SLO: Streptolysin O (Kehoe et al., 1987). Abweichungen sind grau hinterlegt.

ALN	E	G	T	G	L	A	W	D	K	W	W	
PLO	E	A	T	G	L	A	W	D	P	W	W	
LLO	E	C	T	G	L	A	W	E	-	W	W	R
PFO	E	C	T	G	L	A	W	E	-	W	W	R
PLY	E	C	T	G	L	A	W	E	-	W	W	R
SLO	E	C	T	G	L	A	W	E	-	W	W	R

2.3.3. Phospholipasen

Phospholipide gehören neben Glykolipiden und dem bereits erwähnten Cholesterol (siehe 2.3.2.) zu den wichtigsten Membranlipiden. Sie sind aus einem hydrophilen, die Phosphatgruppe enthaltenden polaren Kopf und zwei hydrophoben, apolaren Fettsäureschwänzen aufgebaut (Hirsch-Kaufmann et al., 2009). Bakterielle Phospholipasen hydrolysieren Phospholipide und wandeln diese in Fettsäuren und andere lipophile Substanzen um. Sie werden sowohl zur Gruppe der Invasine als auch zur Gruppe der membranschädigenden Exotoxine gezählt. In Abhängigkeit davon, an welcher Stelle sie das Phospholipid spalten, werden folgende Typen unterschieden: Typ A (PLA₁ und PLA₂), B (PLB), C (PLC) und D (PLD) (Titball und Basak, 2006). MacFarlane und Knight (1941) beschrieben mit dem α -Toxin, einer PLC von *Clostridium perfringens*, das erste als Toxin wirkende Enzym. Es ist in der Lage, *in vitro* das Surfactant alveolarer Zellen abzubauen (Holm et al., 1991). Dagegen spielt die PLC von *Pseudomonas aeruginosa* eine Schlüsselrolle bei der Bildung von Signalmolekülen, die von Bakterien erkannt werden und sie zu den Orten mit den besten Kolonierungsbedingungen locken (Barker et al., 2004). Phospholipase D hingegen, ein essentieller Pathogenitätsfaktor von *Corynebacterium pseudotuberculosis*, wirkt dermonekrotisch, reduziert die Überlebensfähigkeit neutrophiler Granulozyten, erhöht die intravaskuläre Permeabilität und kann toxische Wirkung auf Säugetierzellen ausüben (Songer

et al., 1990; McKean et al., 2007). Zudem wurde nachgewiesen, dass PLD für die Abwanderung der Bakterien vom Infektionsherd in die Lymphozyten verantwortlich ist. Die intrazelluläre Expression von PLD reduziert die Lebensfähigkeit von Makrophagen und setzt *in vitro* auch die Viabilität oviner neutrophiler Granulozyten herab (McKean et al., 2007). Die PLD von *Neisseria gonorrhoeae* (NgPLD), dem Erreger der Gonorrhoe des Menschen, ist in der Lage, Konformationsänderungen am Zytoskelett von Wirtszellen zu verursachen. Es erhöht die Komplement-Rezeptor 3-vermittelte Invasion von zervikalen Epithelzellen, was zur Aufwellung oder Aufkräuselung der Schleimhaut und somit zur erleichterten Invasion von Bakterien in die Zervikalschleimhaut führt (Edwards et al., 2000; Edwards und Apicella, 2006). Es gibt auch Beispiele für die komplementierende Virulenzwirkung eines CDC und einer Phospholipase: bei einer *Listeria monocytogenes*-Infektion vermittelt Listeriolysin O die Befreiung aus den Phagosomen und die Kolonisierung weiterer Wirtszellen mit Hilfe doppelwandiger Vakuolen. Die bakterieneigene Phospholipase PLC-B sorgt dann für die Freisetzung des Listeriolysin O aus den Vakuolen. Bakterien mit dysfunktionaler PLC-B sind zwar in der Lage, Wirtszellen zu befallen, die Ausbreitung des Erregers von Zelle zu Zelle wird jedoch beeinträchtigt (Titball und Basak, 2006).

Tab. 2.2.: Übersicht über Phospholipase-Typen und ihrer Eigenschaften und Funktionen

Typ	Eigenschaften, Funktionen (in Klammer: Literaturhinweise)
A	<ul style="list-style-type: none"> - sind Karbonsäureesterasen (1) - spalten von Phospholipiden eine Fettsäure ab und hinterlassen Lysophosphatide (1) - werden von einer Reihe Gram-negativer Erreger produziert (z.B. <i>Salmonella enterica</i>, <i>E. coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Helicobacter pylori</i>) (2) - häufig membrangebunden (2) - können hämolytische Wirkung haben (1, 2) - Beweise für ihre Bedeutung als Virulenzfaktoren fehlen zumeist; die PLAs von <i>Y. pseudotuberculosis</i>, <i>Legionella pneumophila</i>, <i>Campylobacter</i> spp., etc., könnten jedoch als Virulenzfaktoren fungieren (2) - PLA₂ ist Bestandteil einiger Schlangengifte (z.B. von <i>Vipera russelli</i> (3) und <i>Crotalus durissus terrificus</i>) (4)
B	<ul style="list-style-type: none"> - spalten aus Lysophosphatiden die letzte (zweite) Fettsäure ab (1) - werden von pathogenen Bakterien wie <i>Moxarella bovis</i> gebildet (2) und sind Bestandteil des Giftes der Collet-Schwarzotter (<i>Pseudechis colletti</i>) (7).
C	<ul style="list-style-type: none"> - sind Phosphodiesterasen (1) und werden in folgende Untergruppen eingeteilt (2): <ol style="list-style-type: none"> 1. Zink-Metallophospholipase C Gram-positiver Bakterien (<i>Clostridium perfringens</i> α-Toxin; <i>Bacillus</i> spp., <i>Listeria</i> spp.) 2. Zink-abhängige Phospholipase C Gram-negativer Bakterien (<i>Pseudomonas fluorescens</i>, <i>Legionella pneumo-phila</i>) 3. Phosphatidylcholine Phospholipase C (PC-PLC) Gram-negativer Bakterien (<i>Burkholderia mallei</i>, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>) 4. andere Phospholipasen C (viele dieser Enzyme sind Zell-assoziiert und/oder werden von intrazellulären Pathogenen produziert) 5. Sphingomyelinase C (<i>Bacillus cereus</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Listeria</i> spp., <i>Leptospira interrogans</i>) 6. Phosphatidyl-Inositol-hydrolysierende Enzyme (<i>Bacillus cereus</i>, <i>Bacillus thuringiensis</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>)
D	<ul style="list-style-type: none"> - sind Phosphodiesterasen (1) - die PLDs von <i>Corynebacterium ulcerans</i>, <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> und <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> gehören zu den am besten erforschten Vertretern der Gruppe (2, 6) - sie sind mit dem PLD verwandt, das Bestandteil des Giftes der Braunen Einsiedlerspinne (<i>Loxosceles reclusa</i>) ist (2, 5)

(1) Titball und Basak, 2006; (2) Doenecke et al., 2005; (3) Prasad et al., 1996; (4) Oliveira et al., 2002; (5) Tambourgi et al., 2002; Lee und Lynch, 2005; (6) Lucas et al., 2010 ; (7) Bernheimer et al., 1987.

Bei der Phospholipase D (PLD) von *Arcanobacterium haemolyticum* handelt es sich um ein 31,5 kDA großes Protein (Cuevas und Songer, 1993). In Synergie mit dem von *Rhodococcus equi* gebildeten „Equi Faktor“, einem mehrteiligen Exoenzym mit membranolytischen Eigenschaften bestehend aus einer Cholesteroxidase, einer Sphingomyelinase C und einer cholin Phosphohydrolase, verursacht *A. haemolyticum* auf Rinderblut-haltigen Agarplatten (5% Blut) einen breiten Hämolysehof, der bei PLD-freien Mutanten nicht zu beobachten ist (Lucas, 2009). Bei *A. haemolyticum*-Infektionen ist PLD für die optimale Bindung des Erregers an die Wirtszelle unabdingbar, wobei sie jedoch nicht direkt als Adhäsion fungiert. Vielmehr wird vermutet, dass die Adhäsion von *A. haemolyticum* an die Wirtszelle durch PLD-vermittelte Umgestaltung von Membranbestandteilen in so genannte „Membranmikrodomänen“ oder „Lipid rafts“ ermöglicht wird. Nach Invasion der Wirtszelle bewirkt *A. haemolyticum*-PLD die Freisetzung des Erregers aus der Invasionsvakuole. In Inokulationsversuchen mit HeLa-Zellen und *A. haemolyticum*-Wildtyp sowie PLD-mutierten Varianten zeigte sich zudem, dass Stämme mit intakter PLD die Viabilität der HeLa-Zellen signifikant herabsetzen. In HeLa-Zellen exprimierte *A. haemolyticum*-PLD hat nekrotische Wirkung auf die Zellen (Lucas et al., 2010). Die Phospholipase D von *A. haemolyticum* ist am nächsten mit den PLDs von *Corynebacterium pseudotuberculosis* und *Corynebacterium ulcerans* verwandt (Cuevas und Songer, 1993; McNamara et al., 1995; Lucas et al., 2010). Zudem besteht eine strukturelle Ähnlichkeit der *A. haemolyticum* und *C. pseudotuberculosis*-PLDs zu den Toxinen der Nordamerikanischen Einsiedlerspinne (*Loxosceles intermedia*) und der Nordamerikanischen Braunen Einsiedlerspinne (*Loxosceles reclusa*). Deren PLDs oder auch „Sphingomyelinasen D“ besitzen, wie die bakteriellen PLDs, dermonekrotische und hämolytische Eigenschaften (Songer, 1997; Truett und King, 1993; Lee und Lynch, 2005; Lucas et al., 2010). Eine bekannte bakterielle Sphingomyelinase ist die als „ β -Hämolysin“ bekannte Sphingomyelinase C diverser *Staphylococcus* spp. (Blobel und Brückler, 1980).

2.3.4. DNAsen

DNAsen sind Enzyme aus der Gruppe der Invasine (Abb. 2.4.), die Desoxyribonukleinsäure spalten. Ihre Aufgabe besteht darin, den Bakterien das Eindringen in die Wirtszelle zu erleichtern (Hahn et al., 2008). So helfen die von Streptokokken der Gruppe A produzierten DNAsen den Bakterien beispielsweise, den extrazellulären Fallen (NETs) neutrophiler Granulozyten zu entkommen (Buchanan et al., 2006; Hasegawa et al., 2010).

2.3.4.1. DNAsen bei *Arcanobacterium haemolyticum* und *Trueperella pyogenes*

Sowohl bei *T. pyogenes* als auch bei *A. haemolyticum* wurden DNAsen beschrieben (Jost und Billington, 2005; Yasawong et al., 2010). Bei *T. pyogenes* wurde eine extrazellulär abgegebene DNase charakterisiert, die möglicherweise ein Virulenzfaktor ist (Lämmler und Blobel, 1988). Sie spielt vermutlich eine Rolle bei der Depolymerisierung hochvisköser DNA, die bei Entzündungsreaktionen aus den Zellresten zerstörter neutrophiler Granulozyten freigesetzt wird. Die DNase hydrolysiert diese Wirts-DNA; die entstehenden Nukleotide dienen den Bakterien als Nahrungsquelle (Jost und Billington, 2005; Moore et al., 2010). Über die genaue Wirkungsweise der *A. haemolyticum*-DNase ist wenig bekannt (Collins et al., 1982; Lucas, 2009).

2.3.4.2. DNAsen bei *Trueperella bonasi* und *Trueperella bialowiezensis*

Unter Verwendung von DNase-Test-Agar wurde bisher keine DNase-Aktivität bei *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* nachgewiesen. Dieses lag möglicherweise daran, dass der eingesetzte DNase-Test-Agar ungeeignet für die Anzucht der beiden *Trueperella* Spezies ist oder das Verfahren für den Nachweis einer schwach ausgeprägten DNase-Aktivität nicht empfindlich genug ist (Ülbegi, 2010).

2.3.5. Neuraminidasen

Neuraminidasen (Mukopolysaccharid N-Acetylneuraminyldrolasen) spalten N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) von Sialoglykokonjugaten (Glykolipiden, Glykoproteinen, Poly- und Oligosacchariden) ab. Aufgrund ihrer Aktivität werden sie alternativ auch als „Sialidasen“ bezeichnet. Sie werden von Viren (Influenza-Viren), Bakterien, Protozoen (Trypanosomen) und Säugerzellen gebildet (Briones et al., 1995; Schenkman et al., 1994; Vimr, 1994; Crenell et al., 1993).

Bakterielle Neuraminidasen werden vorrangig von Bakterien gebildet, die Schleimhäute befallen. Ihre toxische Wirkung beruht vorrangig auf der initialen Schädigung der Schleimhautoberfläche, wodurch das Anhaften an Wirtszellen und somit die Infektion des Gewebes durch die Bakterien ermöglicht wird (Fraser, 1978; Jermyn und Boyd, 2002; Uchiyama et al., 2009; Lewis und Lewis, 2012). Sie werden entweder von der Bakterienzelle in die Umgebung abgegeben oder kommen zellgebunden vor (Abrashov und Dulguerova, 2000; Soong, 2006). Ihre Aktivität steht im direkten Zusammenhang mit der Pathogenität einiger Bakterien wie *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica enterica* ser. Typhimurium,

Streptococcus pneumoniae oder *Corynebacterium* spp. (Uchiyama et al., 2009; Taylor, 1996; Vimr, 1994). So können sie beispielsweise Sialinsäure als Kohlenstoffquelle verfügbar machen, um Wachstum in einer nährstoffarmen Umgebung zu ermöglichen (Corfield, 1992; Byers et al., 1996; Abrashev und Dulguerova, 2000), Schleimhaut-Infektionen durch die Produktion von Biofilmen erleichtern (Soong et al., 2006; Parker et al., 2009; Xu et al., 2009; Li et al., 2012), die Sensitivität von Schleimhaut-IgA für bakterielle Proteasen steigern (Reinholdt et al., 1990), bakterielle Kolonisierung fördern und die Anfälligkeit des Wirtes für die Wirkung der Toxine erhöhen (Jost et al., 2001). Einige Neuraminidasen sind in der Lage, ein breites Spektrum an Glykosidverbindungen zu hydrolysieren, während andere sich auf die Hydrolyse eines spezifischen Glykokonjugates spezialisiert haben (Abrachev und Dulguerova, 2000). Die *Vibrio cholerae*-Neuraminidase ist in der Lage, Sialinsäure von komplexen Gangliosiden abzuspalten und in GM1, den Bindungsrezeptor des Cholera-Toxins, zu konvertieren (Moustafa et al., 2004; Galen et al., 1992). Die Gene bakterieller Neuraminidasen weisen untereinander nur eine 20-30%-ige Aminosäuresequenz-Übereinstimmung auf (Vimr, 1994) und können zwischen 40 und 120 kDA groß sein (Taylor, 1996). Sie sind anhand zweier konservierter Motive identifizierbar: dem ASP-Box-Motiv (Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp), das zwei bis fünf Mal innerhalb des Genes auftritt sowie dem RIP/RLP-Motiv (Arg-Ile/Leu-Pro). Letzteres gehört zur „katalytischen Triade“ und spielt eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung und Katalyse der Sialidase (Jost et al., 2002; Gaskell et al., 1995; Roggentin et al., 1989).

Virale Neuraminidasen wurden erstmals bei Influenzaviren beschrieben (Hirst, 1941). McCullers und Bartmess (2003) wiesen zudem synergistische Effekte zwischen viralen Neuraminidasen und Bakterien nach. Obwohl die toxische Wirkung viraler Neuraminidasen der bakterieller Neuraminidasen gleicht und die Faltung ihrer Proteine ähnlich ist, unterscheiden sie sich dennoch strukturell – bakterielle Neuraminidasen sind Monomere, virale Neuraminidasen dagegen Tetramere. Viralen Neuraminidasen fehlt das für bakterielle Neuraminidasen typische, sich wiederholende Aminosäuresequenz-Motiv RIP/RLP und z.T. auch das ASP-Box-Motiv (Crenell et al., 1993; Roggentin et al., 1989; Taylor, 1996). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass virale Neuraminidase-Inhibitoren (Zanamivir, Oseltamivir), die als Standard-Therapie bei Influenza-Infektionen eingesetzt werden, in der Lage sind, die Biofilm-Produktion der *Pseudomonas aeruginosa*-Neuraminidase NanA in vitro herabzusetzen und somit ihre Fähigkeit, Wirtsgewebe zu besiedeln, einzuschränken.

Dies macht sie zu interessanten Kandidaten für die Bekämpfung Neuraminidase-bildender Bakterien (Soong et al., 2006).

Neuraminidasen werden auch von einem weiten Spektrum höher entwickelter Organismen wie Pilzen, Insekten (Roth et al., 1992), Fischen (Sugita et al., 2000), Vögeln und Säugetieren gebildet. Ihre Proteinsequenzen weisen Ähnlichkeiten zu denen bakterieller Neuraminidasen auf – bei allen wurden die o.g. Aminosäuresequenz-Motive (RIP/RLP-Motiv sowie zwei bis fünf Ausführungen des ASP-Box-Motivs) beschrieben (Fronda et al., 1999; Achyuthan und Achyuthan, 2001).

2.3.5.1. NanH und NanA, die Neuraminidasen von *Arcanobacterium haemolyticum*

Lucas (2009) untersuchte 108 *A. haemolyticum*-Stämme auf Neuraminidase-Aktivität und identifizierte im Rahmen der Genom-Sequenzierung von *A. haemolyticum* zwei Neuraminidasen, NanH und NanA. NanH ist ein 92,2 kDa großes Protein, dessen Zellwandanker-Sequenz am C-Terminus darauf hinweist, dass das Enzym an die Zellwand gebunden ist. Da das *nanA*-Gen nicht vollständig sequenziert wurde, kann über eine mögliche Zellwand-Assoziation des NanA-Proteins nur gemutmaßt werden. Bei beiden *A. haemolyticum*-Neuraminidasen tritt das RIP/RLP-Motiv auf und das ASP-Box-Motiv ist viermal innerhalb des Genoms vertreten. Bemerkenswert ist, dass NanH und NanA untereinander keine größeren Sequenz-Übereinstimmungen aufweisen als im Vergleich zu Neuraminidasen anderer Bakterien-Spezies.

2.3.5.2. NanH und NanP, die Neuraminidasen von *Trueperella pyogenes*

Schaufuss und Lämmeler (1988) beschrieben erstmals die Neuraminidase-Aktivität von *T. pyogenes*. Jost et al. (2001, 2002) identifizierten mit NanH und NanP zwei membranständige Neuraminidasen, die mit der Virulenz des Erregers assoziiert waren. Sie verfügen über die Eigenschaft, die Viskosität von Schleim auf Schleimhautoberflächen herabzusetzen und damit das Eindringen des Erregers in die Schleimzellen zu ermöglichen. Zudem steigern sie die Empfänglichkeit von Schleimhaut-IgA für bakterielle Proteasen und erhöhen die Anfälligkeit der Wirtszellmembran für die Wirkung bakterieller Toxine. In nährstoffarmer Umgebung sind sie in der Lage, wirtszelleigene Sialinsäure als Kohlenstoffquelle verfügbar zu machen, um das Überleben der Bakterien in nährstoffarmen Milieus zu sichern (Schaufuss und Lämmeler, 1988; Jost et al., 2001; Jost et al., 2002). In *in vitro*-Infektionsversuchen mit *T. pyogenes*-Wildtyp-Stämmen und Neuraminidase-Knockout-

Varianten des Bakteriums wurde gezeigt, dass NanH und NanP Pathogenitätsfaktoren darstellen. Die Knockout-Varianten mit fehlender Neuraminidase-Aktivität wiesen eine signifikant verminderte (53%) Adhäsionsfähigkeit an HeLa-Zellen auf, während die Adhäsionsfähigkeit der Wildtyp-Stämme unverändert blieb. Allerdings wird vermutet, dass die Adhäsion von *T. pyogenes* an Wirts-Epithelzellen ein komplexer Prozess ist, der das Zusammenspiel der Neuraminidasen NanH und NanP mit weiteren Adhäsionsfaktoren (z.B. kollagen- oder fibronectinbindende Proteine) und Liganden verlangt (Jost et al., 2002). Das *nanH*-Gen ist 3.009 bp lang und kodiert für ein 107 kDa großes Protein, das in allen untersuchten Stämmen gefunden wurde (n = 53). Es enthält das RIP/RLP-Motiv sowie fünf Kopien des ASP-Box-Motivs (Jost et al., 2001). Das *nanP*-Gen dagegen hat eine Länge von 5.112 bp und kodiert für ein 186,6 kDa großes Protein. NanP wurde nur in 64,2% (n = 53) der untersuchten Stämme nachgewiesen – vornehmlich in bovinen (77,4%) und seltener in porcinen (29,4%) Stämmen. In der Aminosäuresequenz von NanP finden sich, wie bei NanH auch, das RIP/RLP-Motiv und fünf Wiederholungen des ASP-Box-Motivs (Jost et al., 2002).

2.3.6. UPF0027/RtcB-Proteine

Proteine der „UPF0027-Gruppe“ (UPF = Unknown Protein Function/RtcB-Proteine) werden von vielen unterschiedlichen Spezies (Menschen, Tieren, Pflanzen, Bakterien, Hefen, Viren) gebildet. Die Hauptfunktion dieser RNA-Ligasen besteht darin, beschädigte mRNA und tRNA zu reparieren, indem sie bei zerbrochenen RNA-Strängen 2′-,3′-zyklische Phosphodiesterasen mit 5′-OH-Enden verbinden. Es wird vermutet, dass sich Bakterien mit Hilfe von RtcB-Proteinen von Stress-induzierten RNA-Schädigungen erholen können (Tanaka et al., 2011a; Tanaka et al., 2011b; Popow et al., 2012). Virale RNA-Ligasen spielen möglicherweise eine Rolle bei der Virusreplikation (Flores et al., 2011; Cao et al., 2009). Ob bakterielle RNA-Ligasen eine ähnliche Funktion bei der Bakterienvermehrung übernehmen, ist bislang unbekannt. Die großen strukturellen und funktionalen Ähnlichkeiten innerhalb dieser Enzymgruppe lassen diese Vermutung dennoch zu (Popow et al., 2012). Bei vielen Bakterienpezies, wie z.B. *Corynebacterium* spp. und *Rhodococcus* spp. sind UPF0027/RtcB-Proteine bekannt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) – bei *Arcanobacterium* spp. und *Trueperella* spp. wurden solche Proteine bislang noch nicht beschrieben.

2.3.7. Übersicht über die Virulenzfaktoren von *Arcanobacterium haemolyticum* und *Trueperella pyogenes*

Tabelle 2.3. stellt die bisher bekannten Pathogenitätsfaktoren von *A. haemolyticum* und *T. pyogenes* in der Übersicht vor.

Tab. 2.3.: Übersicht über die Pathogenitätsfaktoren von *A. haemolyticum* und *T. pyogenes* (Jost und Billington, 2005; Lucas, 2009)

<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Phospholipase D (PLD) - Exonuklease NucA - zwei Neuraminidasen (Nan H und NanA) - hämolysierendes Exotoxin aus der Gruppe der MACPF/CDC-Superfamilie (ALN/PLO) - zwei kollagenbindende Proteine (Cpa und CbpA) - DNase - Fimbrien 	<ul style="list-style-type: none"> - fibrinogenbindendes Protein - fibronectinbindendes Protein - Fähigkeit, in Makrophagen zu überleben - Fähigkeit, in Epithelzellen einzudringen - Biofilm-Bildung - Proteasen - zwei Neuraminidasen (NanH und NanP) - hämolysierendes Exotoxin aus der Gruppe der MACPF/CDC-Superfamilie (ALN/PLO) - zwei kollagenbindende Proteine (Cpa und CbpA) - DNase - Fimbrien

3. Problemstellung und Ziele

Laut der Internationalen Vereinigung für den Schutz der Natur (IUCN, International Union for Conservation of Nature) stellt die seit den 1960er Jahren in der Wisent- (*Bison bonasus*) Population des Nationalpark Białowieża (Polen) beobachtete Balanoposthitis-Erkrankung eine ernsthafte Gefährdung für die Erhaltung der gesamten Spezies dar (<http://www.iucnredlist.org/>, 2012). Ätiologische Untersuchungen von Wisentpräputialproben ergaben, dass die Gram-positiven Bakterien *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* möglicherweise ursächlich am Krankheitsgeschehen der Balanoposthitis des Wisents beteiligt sind. Es wird vermutet, dass diese Bakterien mit Hilfe von Virulenzfaktoren in der Lage sind, Wirtszellen anzugreifen, Gewebe zu schädigen und damit möglicherweise das Milieu für den Befall durch Sekundärerreger zu schaffen. Hierbei wurde angenommen, dass bei *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* ähnliche Virulenzfaktoren eine Rolle spielen könnten, wie bei verwandten pathogenen Bakterien – in diesem Zusammenhang wurde bereits das hämolytische Exotoxin Pyolysin (PLO) von *T. pyogenes* sowie die beiden *T. pyogenes*-Neuraminidasen genannt (Lehnen, 2005). Bei *A. haemolyticum* sind ebenfalls zwei Neuraminidasen, das hämolytische Exotoxin Arcanolysin (ALN), eine Phospholipase D sowie eine Reihe weiterer potentieller Virulenzfaktoren bekannt (Lucas, 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diese Vermutungen mit Hilfe bakteriologischer und molekulargenetischer Methoden geprüft werden. Ziel war es, mögliche Virulenzgene zu identifizieren und ihre Funktion mittels Expressierung in *E. coli*-Zellen zu bestätigen. Als Vergleichsorganismen dienten hierfür *A. haemolyticum* und *T. pyogenes* – zwei pathogene, mit *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* eng verwandte Bakterien, deren Virulenzfaktoren weitgehend bekannt sind (Jost und Billington, 2005; Lucas, 2009). Für die Untersuchungen wurden folgende Typstämme verwendet: *T. bonasi* DSM 17163, *T. bialowiezensis* DSM 17162, *A. haemolyticum* DSM 20595 sowie *T. pyogenes* DSM 20630.

Tab. 3.1.: Übersicht über die in dieser Arbeit bei *T. bonasi* (DSM 17163) und *T. bialowiezensis* (DSM 17162) untersuchten Kandidaten für Virulenzfaktoren

Potenzieller Virulenzfaktor	Vergleichsorganismus
Neuraminidase	<i>A. haemolyticum</i> , <i>T. pyogenes</i>
Hämolytisches Exotoxin aus der MACPF/CDC-Familie	<i>A. haemolyticum</i> , <i>T. pyogenes</i>
Phospholipase	<i>A. haemolyticum</i>
Desoxyribonuklease	<i>A. haemolyticum</i> , <i>T. pyogenes</i>

4. Material und Methoden

4.1. Material

Die folgenden Übersichten führen die eingesetzten Bakterienstämme, Nährmedien, Chemikalien und Reagenzien, Testkits, Restriktionsendonukleasen und Puffer, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Computerprogramme auf.

4.1.1. Referenz-Bakterienstämme

Stamm	Herkunft/Hersteller
<i>Trueperella bonasi</i> DSM 17163	DSMZ, Deutschland
<i>Trueperella bialowiezensis</i> DSM 17162	DSMZ, Deutschland
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> DSM 20595	DSMZ, Deutschland
<i>Trueperella pyogenes</i> DSM 20630	DSMZ, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> , Feldisolat	Stammsammlung IZW
<i>Rhodococcus equi</i> , Feldisolat	Stammsammlung IZW
<i>Staphylococcus aureus</i> , Feldisolat	Stammsammlung IZW
XL1-Blue MR Superkompetente Zellen	Agilent Technologies, Deutschland
XL1-Blue MRF' Superkompetente Zellen, Tetrazyklin-resistent	Agilent Technologies, Deutschland
XL2-Blue MRF' Ultrakompetente Zellen, Tetrazyklin- and Chloramphenikol-resistent	Agilent Technologies, Deutschland

4.1.2. Nährmedien

Nährmedium	Hersteller
Columbia Agar mit 5% Schafblut	Oxoid GmbH, Deutschland
DNase-Agar (DNase-Test-Agar)	Sifin GmbH, Deutschland
Hirn-Herz-Bouillon (BHI-Bouillon)	Sifin GmbH, Deutschland
LB Agar (Lennox L Agar)	Invitrogen, Deutschland
LB Broth Base (Lennox L Broth Base)	Invitrogen, Deutschland
SOC Medium, gefiltert	Sigma-Aldrich, Deutschland

4.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurde deionisiertes H₂O (Millipore-H₂O) als Lösungsmittel verwendet.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Agarose GTQ	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Albumin Fraktion V, ≥98%, pulv., bovine	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
ATP, 100 mM solution	Fermentas GmbH, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Agilent Technologies, Deutschland
Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
dNTP Mix, 2mM	Fermentas GmbH, Deutschland
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
Ethanol, absolut	VWR International, Deutschland
FastAP Thermosensitive alkalische Phosphatase, 1U/μl + 10x Buffer Fast AP	Fermentas GmbH, Deutschland
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ficoll® 400	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Formamid, deionisiert ≥99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Gelatine für die Mikrobiologie	Merck KGaA, Deutschland
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10.000x in H ₂ O	VWR International, Deutschland
Chloroform, reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Glycerol	VWR International, Deutschland
GoTaq M80B 5u/μl DNA Polymerase + 5x Colorless GoTaq Reaktionspuffer	Promega, Deutschland
Hemin(chlorid) ≥98%, krist.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland
Ladepuffer Orange Dye	Fermentas GmbH, Deutschland
Leiter λ DNA/HindIII, 0,5μg/μl	Fermentas GmbH, Deutschland
Long PCR Enzym Mix, 5U/μl + 10x Long PCR Puffer mit 15mM MgCl ₂	Fermentas GmbH, Deutschland
Lysozym aus Hühnereiweiß	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Maltose Monohydrat	VWR International, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA, Deutschland

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, Deutschland
MUAN = 2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetyneuraminic acidsodium salt hydrate	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumazetat	Eurobio, Frankreich
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Natriumzitat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumhydrogenkarbonat	Merck KGaA, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen reinst	Merck KGaA, Deutschland
Puffergesättigtes Phenol zur DNA/RNA-Isolierung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon K 90	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Proteinase K (recombinant), PCR grade	Fermentas GmbH, Deutschland
Salzsäure, 1N	Merck KGaA, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS), reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
T4 DNA Ligase, 1 IU/ μ l	Fermentas GmbH, Deutschland
Tierblut (Hauskaninchen*, Hausrind*, Hausschwein*), defibriert	Elocin-Lab, Deutschland
Tierblut (Pferd, Hausschaf*), defibriert	Oxoid GmbH, Deutschland
Tierblut (Wisent), Vollblut	Wisentgehege Damerower Werder, Deutschland
Tierblut (Hausziege*), Vollblut	Freie Universität Berlin, Deutschland
TRIS PUFFERAN \geq 99,9%,	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Triton® X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
True Start Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase 5U/ μ l	Fermentas GmbH, Deutschland

* Im Folgenden als „Kaninchenblut“, „Rinderblut“, „Schweineblut“ und „Schafblut“ bezeichnet.

4.1.4. Testkits

Kit	Hersteller
Big Dye XTerminator Purification Kit	Applied Biosystems, UK
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, UK

Kit	Hersteller
Biotin Chromogenic Detection Kit	Fermentas GmbH, Deutschland
Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit	Fermentas GmbH, Deutschland
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas GmbH, Deutschland
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas GmbH, Deutschland
GeneJET™ PCR Purification Kit	Fermentas GmbH, Deutschland
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas GmbH, Deutschland
Gigapack III Gold RXN Packaging extract	Agilent Technologies, Deutschland
Silica Bead DNA Gel Extraction Kit	Fermentas GmbH, Deutschland
SuperCos 1 Vector Kit	Agilent Technologies, Deutschland

4.1.5. Restriktionsendonukleasen und deren Puffer

Restriktionsendonuklease/Puffer	Erkennungssequenz*	Hersteller
FastDigest® <i>EcoRI</i>	5'-G↓AATTC-3'	Fermentas GmbH, Deutschland
<i>EcoRI</i> 10 IU/μl	5'-G↓AATTC-3'	Fermentas GmbH, Deutschland
<i>HindIII</i> 10U/μl	5'-A↓AGCTT-3'	Fermentas GmbH, Deutschland
FastDigest® <i>KpnI</i>	5'-GGTAC↓C-3'	Fermentas GmbH, Deutschland
<i>MboI</i> 10 IU/μl	5'-↓GATC-3'	Fermentas GmbH, Deutschland
FastDigest® <i>NotI</i>	5'-GC↓GGCCGC-3'	Fermentas GmbH, Deutschland
FastDigest® <i>SmaI</i>	5'-CCC↓GGG-3'	Fermentas GmbH, Deutschland
FastDigest® <i>XbaI</i>	5'-T↓CTAGA-3'	Fermentas GmbH, Deutschland
10x Buffer FastDigest®	-	Fermentas GmbH, Deutschland
10x Buffer <i>EcoRI</i> with BSA	-	Fermentas GmbH, Deutschland
10x Buffer R with BSA	-	Fermentas GmbH, Deutschland
10x Buffer Tango	-	Fermentas GmbH, Deutschland

*Der Pfeil zeigt die Schnittposition an.

4.1.6. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Butan-Kartusche C 206	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
CO ₂ Gen zur Erzeugung einer CO ₂ -angereicherten Atmosphäre im Anaerobiertopf (2,5 l)	Oxoid GmbH, Deutschland

Produkt	Hersteller
Cryo-Röhrchen Cryovia, 2 ml, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Dialyseschlauch, SERVAPOR [®] MWCO 12 000 - 14 000, RC, Durchmesser 21 mm	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
Einmal-Küvetten PS	Brand GmbH + Co KG, Deutschland
Einmalspritze Injekt Luer Solo 20 ml	Braun Melsungen AG, Deutschland
EU Thin-wall 8-tube Strip 0,2 ml	Dominique Deutscher, Deutschland
Filterpapier 0859, Bogen 580x580 mm	VWR International, Deutschland
Objektträger	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Kunststoff-Einmalimpfösen, steril	Mickley Diagnostika, Deutschland
Mikrotiterplatte ABgene, 96 well	VWR International, Deutschland
Nylon-Membran Amersham Hybond [™] -N	GE Healthcare, Deutschland
Probengefäße 0,5 ml	Sarstedt, Deutschland
Schraub-Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäß 0,5 ml, PCR-rein	Eppendorf, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäß 1,5 ml, PCR-rein	Eppendorf, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäß 2,0 ml, PCR-rein	Eppendorf, Deutschland
Skalpellklingen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Spritzen-Filter 0,22 µm	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
Verschlussklammern für Dialysemembranen	VWR, Deutschland
Verschlussmatte aus Silikon für PCR-Platte, 96 well	VWR, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml, gammasterilisiert	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz

4.1.7. Geräte

Gerät	Hersteller
Elektronenmikroskop Supra 40 VP	Carl Zeiss AG, Deutschland
Elektrophoresekammer My Run	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
Feinwaage AW 423	Sartorius, Deutschland
Heiz-Thermomixer MKR 13	HCL Bio Tech, Deutschland
Kapillarelektrophorese-Sequencer ABI 3130x/	Applied Biosystems, USA
Kühlkombination KGP 39330	Robert Bosch GmbH, Deutschland
Mikrobiologischer Brutschrank B6200	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Mikroliterzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland

Gerät	Hersteller
Mikrowellenherd MA-8505D	Gold Star, Deutschland
NanoDrop Spectrometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
OD-Messgerät ATB Expression Densimat	Bio-Mérieux, Deutschland
PCR-Mixgerät MixMate PCR 96	Eppendorf, Deutschland
pH-Meter CG 842	Schott Glas, Deutschland
Photometer Biomate 3S	Fisher Scientific, Deutschland
Reinstwasser-System Modell LBMPP 20	Continental Water Systems Corporation, USA
Schüttelgerät KS-15 + Inkubationshaube TH 15	Johanna Otto GmbH, Deutschland
Sicherheitswerkbank Biowizard, Klasse II Typ KBS-130 GL	Kojar Tech Oy, Finland
Steuerggerät für Gelelektrophorese	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
Thermocycler Peq STAR 96	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Thermo-Magnet-Mixer MR 3001	Heidolph, Deutschland
Tischautoklav 3150 EL	Systec GmbH, Deutschland
Tischzentrifuge SN 070 1429	NeoLab, Deutschland
Transilluminator für die Geldokumentation Quantum-ST 4	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Ultraviolett Crosslinker	GE Healthcare, Deutschland
Vakuum-Blotter Transvac TE 80	Hoefer Scientific Instruments, USA
Vakuum-Pumpe PV 100 Red-EVAC	Hoefer Scientific Instruments, USA
Vakuumschweißgerät CB 1002	Bomann, Deutschland
Vortexer Lab Dancer vario, Yellow Line	IKA Labortechnik, Deutschland
Wasserbad Medingen W 22	Stork-Tronic, Deutschland
Wippschüttler Duomax 1030	Heidolph, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco mit Rotor 7500 3328	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Zentrifuge 5417 R mit Festwinkelrotor FA 45-24-11	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3 S-R mit Rotoren Bioshield® Rotor 7500 6435 (für 15 ml- und 50 ml- Gefäße) und Highplate® Rotor 7500 6444 (für 96 well-Platten)	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland

4.1.8. Computerprogramme

Programm	Hersteller/Homepage
BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor)	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
Inkscape	http://www.inkscape.org/
I-Tasser server for protein structure prediction	http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/
NCBI (BLAST, ORF-Finder, Primer Design)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Adobe Photoshop CS 3	Adobe, USA
Word, Excel, Powerpoint	Microsoft, USA

4.2. Methoden

4.2.1. Nährmedien für Bakterien

LB-Flüssigmedium

Lennox L Broth Base	8 g
Aqua dest.	400 ml
⇒ autoklavieren	

Zur Anzucht von *T. bonasi* (DSM 17163) und *T. bialowiezensis* (DSM 17162) wurden dem Medium folgende Komponenten alleine oder in Kombination zugegeben:

Fötales Kälberserum	5-15%
Tierblut, defibriniert (Rind, Pferd, Schaf, Kaninchen)	20 ml

LB-Agar

Lennox L Agar	12,8 g
Aqua dest.	400 ml
⇒ autoklavieren	

BHI-Flüssigmedium

BHI broth	37g
Aqua dest.	ad 1l

Zur Anzucht von *T. bonasi* (DSM 17163) und *T. bialowiezensis* (DSM 17162) wurden dem Medium folgende Komponenten alleine oder in Kombination zugegeben:

Fötale Kälberserum	5-15%
Tierblut, defibriniert (Rind, Pferd, Schaf, Kaninchen)	20 ml

BHI-Hämin-Flüssigmedium zur Anzucht von *Arcanobacterium*- und *Trueperella* spp.

BHI broth	37 g
Hemin(chlorid)	5 µg/ml
Aqua dest.	ad 1 l

⇒ autoklavieren

LB-Blut-Platten zur Identifizierung hämolysierender *Arcanobacterium*- und *Trueperella* spp. und deren Cosmid-Bibliotheken

Lennox L Agar	12,8 g
Aqua dest.	380 ml

⇒ autoklavieren, im Wasserbad auf 55°C herabkühlen

Tierblut, defibriniert (Rind, Pferd, Schaf, Kaninchen)
bzw. mit Citrat versetzt (Wisent, Ziege) 20 ml

Citratblut für Blut-Agarplatten

Nicht kommerziell erhältliches Tierblut (Wisentblut, Ziegenblut) wurde den Tieren frisch entnommen und mit Hilfe von Citrat ungerinnbar gemacht. Das Citratblut kann ca. 4 Wochen lang bei +5°C gelagert werden.

Wisent-/ Ziegenvollblut	45 ml
Natriumcitrat-Lösung, steril, 3,8%	5 ml

LB-Blut-equi-Platten zur Identifizierung potentiell PLD-produzierender *Arcanobacterium*- und *Trueperella* spp. und deren Cosmid-Bibliotheken

Lennox L Agar	12,8 g
Aqua dest.	360 ml
⇒ autoklavieren, im Wasserbad auf 55°C herabkühlen	

Rinderblut, defibriniert	20 ml
„Equi Faktor“	20 ml

Equi Faktor

Der von *Rhodococcus equi* gebildete „Equi Faktor“ ist ein Exoenzym, dessen membranolytische Eigenschaften in Verbindung mit dem β -Hämolyisin von *Staphylococcus aureus* auf Schafblutagarplatten zu einem CAMP-ähnlichen Phänomen – der Ausbildung einer halbmondförmigen vollständigen Hämolysezone – führen (Fraser, 1964; Prescott, 1991). Der Equi Faktor wird aus dem Kulturüberstand von *Rhodococcus equi*-Flüssigkulturen gewonnen. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu LB-Medium mit einer *Rhodococcus equi*-Kultur beimpft und über 24 h bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator herangezüchtet. Die Zellen wurden für 20 min bei 5.500 rpm und 4°C in der Multifuge 3 S-R (Heraeus Instruments) herunter zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen, sterilfiltriert und in 20 ml-Aliquots bis zum Gebrauch bei +5°C gelagert.

Ampicillin zur Selektion cosmid-/ plasmidhaltiger E. coli-Zellen

20 mg/ml Ampicillin-Stammösung; bei –20°C lagern, Konzentration im Medium:
100 µg Ampicillin/ml Agar
⇒ Zugabe zu allen Selektionsmedien bei Klonierungen (Plasmide und Cosmide)

Einfriermedium für Bakterien (zur Lagerung als Glycerinkultur bei -80°C)

LB-Flüssigmedium	70 ml
Glycerin (steril)	30 ml
⇒ autoklavieren	

4.2.2. DNA-Extraktion aus Bakterien

4.2.2.1. Gesamt-DNA-Extraktion für den Einsatz in der Polymerase-Kettenreaktion mittels DNeasy Blood & Tissue-Kit (Qiagen)

Enzymatischer Lysepuffer:

20 mM Tris-HCl (pH 8,0)

2 mM Natrium-EDTA

1,2% Triton® X-100

⇒ vor Gebrauch Lysozym ad 20 mg/ml begeben

Für den Einsatz in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) genomische DNA aus Bakterien (*E. coli*, *Trueperella* spp., *A. haemolyticum* DSM 20595) gewonnen. Die DNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll von Qiagen. Hierzu wurden die Bakterien je nach Spezies 1-4 Tage bei 37°C auf Columbia-Schafblut (5%)-Agar-Platten angezüchtet (*T. pyogenes* DSM 20630 und *A. haemolyticum* DSM 20595 in CO₂-Atmosphäre), mit einem Glasspatel abgenommen und in 180 µl enzymatischem Lysepuffer resuspendiert. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C wurden 25 µl Proteinase K und 200 µl Lysepuffer AL (Qiagen) hinzugegeben und weitere 30 min bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (100%) wurde die Suspension intensiv geschüttelt (Vortex), in ein DNeasy Zentrifugensäulchen überführt und in der Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus Instruments) für 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Nachdem das Filtrat verworfen wurde, wurden zum Waschen der an die Säule gebundenen DNA 500 µl Waschpuffer AW1 (Qiagen) zugegeben und das Röhrchen erneut für 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut verworfen und das DNeasy Zentrifugensäulchen nach Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW2 (Qiagen) nochmals für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Röhrchen wurde nun in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt. Um die DNA vom Trägermaterial zu lösen, wurden 100 µl Elutionspuffer AE (Qiagen) auf die Säule pipettiert. Nach einigen Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA-Lösung für 1 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch (260 nm) ermittelt (NanoDrop ND1000, PeqLab). Mit Elutionspuffer AE (Qiagen) wurde anschließend eine DNA-Konzentration von 100 ng/µl eingestellt. Die Lagerung der DNA-Lösung erfolgte bis zum Gebrauch bei -20°C.

4.2.2.2. Gewinnung hochmolekularer genomischer DNA (für die Cosmid-Klonierung und Blotting) mittels Dialyse

Für die Erstellung von Cosmid-Bibliotheken benötigt man sehr lange genomische DNA-Abschnitte als Ausgangsmaterial. Die DNA-Segmente sollten eine Länge von mindestens 150-200 kb haben (Sambrook und Russell, 2001), da Cosmid-Vektoren im Gegensatz zu Plasmid-Vektoren nicht imstande sind, kurze DNA-Fragmente aufzunehmen. Dies erreicht man am besten, indem man möglichst hochmolekulare genomische DNA als Ausgangsmaterial gewinnt und diese vor der Klonierung in den Vektor mit Restriktionsenzymen schneidet. Die DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Dialyse stellt eine sehr schonende Methode der DNA-Gewinnung dar, da die Einwirkung von Scherkräften auf die DNA während des Extraktionsprozesses äußerst gering ist. Der in der vorliegenden Arbeit genutzte Cosmid-Vektor SuperCos 1 (Agilent Technologies) kann Fragmente in den Größen zwischen 30-42 kb aufnehmen. Die DNA-Gewinnung mittels Dialyse erfolgte nach den Protokollen von Sambrook und Russell (2001).

2% Natriumhydrogencarbonatlösung

Natriumhydrogencarbonat	20 g
Aqua dest.	1000 ml

⇒ autoklavieren

„Lysis Lösung“ für den Bakterien-Aufschluß

10 mM NaCl
20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA
100 µg/ml Proteinase K
0,5% SDS

TE-Puffer für Dialyse

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA
⇒ autoklavieren

Vorbereitung der Dialyse-Membranen

Die trockene Dialyse-Membran wurde in ca. 10 cm lange Stücke geschnitten und in einen sterilen 1.000 ml-Glasbecher gegeben. Nach Zugabe von 500 ml einer 2%-igen (w/v) Natriumhydrogenkarbonat-Lösung + 1 mM EDTA (pH 8,0) wurden die Dialyse-Membranstücke für 10 min gekocht und danach mit sterilem Aqua dest. abgespült. Danach wurden die Membranen in einem sterilen 1.000 ml-Glasbecher mit 500 ml 1 mM EDTA (pH 8,0) 10 min gekocht, und nach ihrem Abkühlen bis zum Gebrauch bei +4°C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Dialyse-Membranen innen und außen mit sterilem Aqua bidest. gespült.

Phenol-Chloroform-Extraktion und Dialyse genomischer Bakterien-DNA

Je nach Spezies wurden die Bakterien bei 37°C über 48 h in CO₂-Atmosphäre (*T. pyogenes* DSM 20630, *A. haemolyticum* DSM 20595) bzw. 72 h ohne CO₂ (*T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17163) auf Columbia-Schafblutagar-Platten (5% Schafblut) zu stecknadelkopfgroßen Kolonien herangezüchtet. Dann wurden sie mit einem sterilen Glasspatel von den Platten abgenommen und in ein 50 ml-Schraubröhrchen mit 30 ml Lysis-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig mittels Magnetrührer gerührt und über Nacht bei 50°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 30 ml puffergesättigtes Phenol zu der Lösung lysierter Bakterien hinzugegeben. Nach ca. fünfminütigem, vorsichtigem Schwenken und anschließender Zentrifugation der Röhrchen für 10 min bei 13.000 Umdrehungen/min, 4°C in der Multifuge 3 S-R (Heraeus Instruments) wurde die obere, DNA-haltige wäßrige Phase von der phenolischen unteren und der proteinhaltigen mittleren Phase abgenommen. Diese Schritte wurden zweimal mit 30 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 25:24:1) und einmal mit 30 ml Chloroform-Isoamylalkohol wiederholt. Die DNA-haltige Oberphase der letzten Extraktion wurde in einen mit Aqua dest. gespülten Dialyseschlauch gegeben, der mit sterilen Plastikklammern verschlossen wurde. Der gefüllte Dialyseschlauch wurde zusammen mit einem Magnetrührstäbchen in ein mit TE-Puffer gefülltes großes Becherglas gegeben und 24 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührgerät gerührt. Während dieser Zeit wurde der TE-Puffer dreimal gewechselt. Die im Dialyseschlauch befindliche Lösung enthielt die aufgereinigte genomische DNA. Der DNA-Gehalt der Lösung wurde mittels NanoDrop Spectrometer (Peqlab Biotechnologie) bestimmt. Danach wurde die Lösung in 2 ml-Aliquots bei +5°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Hierbei macht man sich die Tatsache zunutze, dass DNA-Moleküle aufgrund des Phosphorsäure-Zucker-Rückgrats negativ geladen sind und im elektrischen Feld – je nach Fragment-Länge in unterschiedlicher Geschwindigkeit – in Richtung der positiven Elektrode wandern. Mit Hilfe eines neben den Proben im Gel aufgetragenen Molekulargewichts-Standards („Ladder“) lässt sich die ungefähre Größe der DNA-Fragmente bestimmen. Dem Ladepuffer wird ein Fluoreszenzfarbstoff (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain) zugesetzt, der sich in die DNA einlagert, so dass diese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Benötigte Lösungen:

50x TAE-Puffer

Tris	242 g
Essigsäure (CH ₃ COOH)	57,1 ml
EDTA, 0,5 M	100 ml
Aqua dest.	ad 1 l

⇒ Einstellen auf pH 8,0 mit 1 M KOH-Lösung.

Agarose-Gel

Agarose GTQ	1,5 g
1x TAE-Puffer	ad 100 ml

Ladepuffer mit Fluoreszenzfarbstoff

Orange Dye Loading Dye Solution (Fermentas)	1000 µl
GelRed™ (VWR)	6 µl

Die Agarose wurde durch Aufkochen in einem Mikrowellengerät in 1x TAE-Puffer verflüssigt und nach Abkühlen auf ca. 50°C in eine Gelkammer gegossen, in die anschließend ein Kunststoff-Kamm eingesetzt wurde, um Geltaschen für das Einfüllen der Proben zu erzeugen. Nach dem Abkühlen des Gels auf Raumtemperatur wurden die Proben zusammen mit je 1/10 Volumen GelRed™-haltigem Ladepuffer in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte anschließend bei 10-15 V/cm Gellänge in 1x TAE-Puffer. Abhängig von der Gelgröße und der Laufgeschwindigkeit betrug

die Laufdauer 30 min bis 5 h. Als Molekulargewichts-Standards dienten der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fragmentlängen in Basenpaaren (bp): 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.200, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100) sowie *HindIII*-verdaute DNA des Phagen Lambda (Fragmentlängen in bp: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125) von Fermentas.

4.2.3.1. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion wurde mit dem „Silica Bead DNA Gel Extraction Kit“ von Fermentas durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Protokoll von Vogelstein und Gillespie (1979), das sich auch für die DNA-Extraktion aus größeren Gel-Volumina eignet, da die Aufreinigung nicht über Säulen, sondern mit Hilfe DNA-bindender Glasmilch geschieht.

DNA-Aufreinigung nach „Silica Bead DNA Gel Extraction Kit“-Protokoll:

Die gewünschte Bande wurde mit einer sterilen Skalpellklinge unter UV-Licht-Kontrolle aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 2 ml Safe Lock Reaktionsgefäß gegeben. Zu dem Gelstück wurden drei Volumina des im Kit enthaltenen „Binding Buffer“ gegeben. Die Probe wurde für 5 min bei 55°C in einen Heiz-Thermomixer gestellt, um die Agarose zum Schmelzen zu bringen. Vor dem Zusetzen der Glasmilch wurde diese stark geschüttelt (Vortex), um die abgesetzten Glaskügelchen zu resuspendieren. Von der Glasmilch-Suspension wurden 5 µl in das Reaktionsgefäß mit dem verflüssigten Agarosegel gegeben, welches im Anschluss ebenfalls gevortext und für 5 min bei 55°C und 250 rpm in einen Heiz-Thermomixer plaziert wurde. Das Reaktionsgefäß wurde dann für 5 s bei 13.000 rpm zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus Instruments), der flüssige Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl eiskaltem Waschpuffer (Kit) durch Vortexen resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und nach einem weiteren, verlängerten Zentrifugationsschritt (1 min bei 13.000 rpm) wurde sämtliche Restflüssigkeit vorsichtig mit einer 100 µl-Pipette abgenommen und das weiße Pellet 10 min an der Luft getrocknet, bevor es für 5 min bei 55°C in 20–50 µl TE-Puffer oder Aqua dest. im Heiz-Thermomixer resuspendiert wurde. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß für weitere 30 s bei 13.000 rpm in die Zentrifuge gegeben und die DNA-haltige Flüssigkeit abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zum Gebrauch bei –20°C gelagert.

4.2.4. Filterpapier-Test zum Nachweis von Neuraminidase-/ Sialidase-Aktivität

Benötigte Lösung:

MUAN-Lösung, 100 μ M

MUAN: 2'-(4-methyl-umbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminsäure) 1 mg

0,1 M Natriumcitratlösung, pH 4,5 20,43 ml

⇒ Lösung bis zum Gebrauch in 1 ml-Aliquots bei -20°C lagern

Für die Untersuchung (Screening) von Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* und *Trueperella* sowie der Cosmid-Bibliotheken von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 auf Neuraminidase-Aktivität wurde der Neuraminidase-Filterpapier-Test (Potier et al., 1979) eingesetzt. Hierfür wurde die zu testende Bakterienkolonie mit einer Einweg-Impföse von der Agarplatte genommen und auf ein mit MUAN-Lösung befeuchtetes, saugfähiges Filterpapier aufgetragen. Das Filterpapier wurde für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend unter langwelligem UV-Licht (365-450 nm) begutachtet. Neuraminidase-positive Kolonien leuchten unter UV-Bestrahlung hellblau, während Neuraminidase-negative Kolonien unsichtbar bleiben. Die Farbreaktion beruht darauf, dass bakterielle Neuraminidasen das Substrat MUAN hydrolysieren und dabei in N-Acetylneuraminsäure und 4-Methylumbelliferon spalten, was eine Verschiebung des Fluoreszenzspektrums von 315-374 nm (Substrat) hin zu 365-450 nm (Produkt) bewirkt. Die Farbreaktionen wurden fotografisch dokumentiert.

4.2.5. Herstellung von *T. bonasi*- und *T. bialowiezensis*-Cosmid-Bibliotheken

4.2.5.1. SuperCos 1

Cosmide sind Vektoren, die zwei Klonierungssysteme miteinander verbinden: sie verfügen einerseits über die cos-Stellen des λ -Bakteriophagen-Systems und besitzen andererseits einen Replikationsursprung (ori), mit dessen Hilfe sie sich in der *E. coli*-Wirts-Zelle wie ein Plasmid vermehren können.

Für die vorliegende Arbeit wurde der Cosmid-Vektor SuperCos 1 (Agilent Technologies; Vektorkarte im Anhang A) gewählt. Er hat eine Größe von 7,9 kb und besitzt zwei cos-Stellen, die eine *Xba*I-Schnittstelle flankieren sowie eine *Bam*HI-Schnittstelle, die außerhalb der von den cos-Stellen flankierten Region liegt. Zudem verfügt er über Resistenzgene gegen

die Antibiotika Ampicillin und Neomycin. Nach dem Verdau des Vektors mit *XbaI* und *BamHI* liegt SuperCos 1 in Form von zwei Fragmenten vor, zwischen die Fremd-DNA von 30–42 kb ligiert werden kann. Während der „Verpackungsreaktion“ können nur Ligationsprodukte einer Größe von 38-50 kb (Insert + Vektor) in die Phagenköpfe verpackt werden, die sich anschließend mit λ -Schwänzen (im Kit enthalten) verbinden und *E. coli*-Zellen infizieren können. Nach der Infektion erhält man im Gegensatz zur reinen Phagen-Klonierung keine Plaques, sondern wie bei der Plasmid-Klonierung Kolonien, die beliebig vermehrt, eingefroren und auf unterschiedliche biologische Eigenschaften untersucht werden können. In Abb. 4.1. wird der schematische Verlauf einer Cosmid-Klonierung dargestellt.

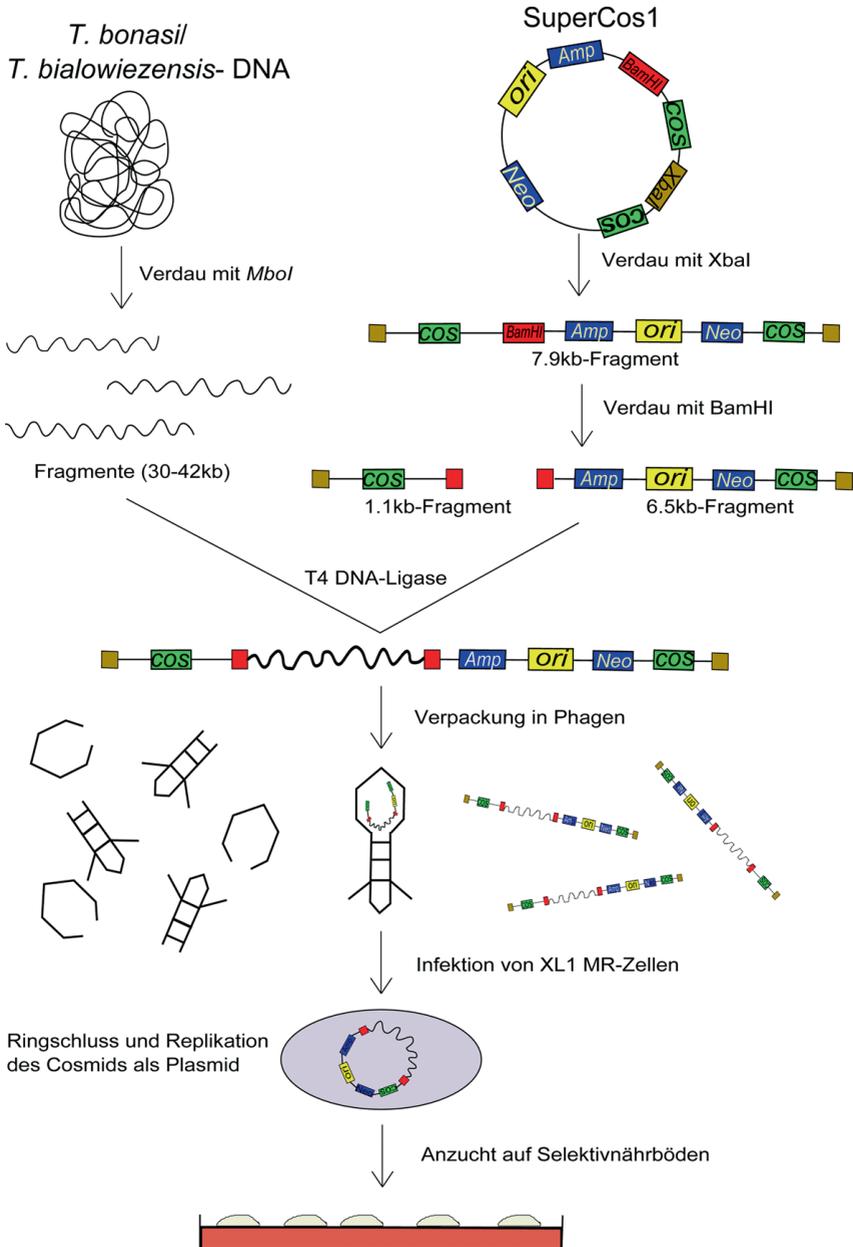


Abb. 4.1.: Schematische Darstellung der Cosmid-Klonierung

Der Vektor eignet sich insbesondere für den Aufbau von Genbanken prokaryotischer und einzelliger eukaryotischer Organismen, da sich deren Genome häufig von einer überschaubaren Anzahl an Cosmid-Klonen repräsentieren lassen.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden gemäß den Protokollen folgender Kits durchgeführt:

- a) SuperCos 1 Cosmid Vector Kit (Agilent Technologies)
- b) Gigapack® III Gold packaging extract (Agilent Technologies)

4.2.5.2. Vorbereitung der XL1 Blue MR Superkompetenten Wirtszellen

Folgende Lösungen werden benötigt:

Anzuchtmedium für E.coli XL1 Blue MR-Zellen mit 2% Maltose und 10 mM MgSO₄

Lennox L Broth Base	20 g
Maltose	2 g
MgSO ₄	1,2 g
Aqua dest.	ad 1 l
⇒ autoklavieren	

Mit einer abgeflamten Metall-Impföse wurde etwas Material von der Oberfläche des bei -80°C gelagerten XL1 Blue MR-Zellen-enthaltenden Glycerin-Stocks geschabt und auf einer LB-Agarplatte bei 37°C für 24 h angezüchtet. Von dieser LB-Agarplatte wurde mit einer sterilen Einmal-Impföse eine Einzelkolonie abgenommen. Diese wurde in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen mit 5 ml Anzuchtmedium transferiert und für 4-6 Stunden bei 37°C und 250 rpm in einem Thermo-Schüttelgerät gemischt. Die Bakterien wurden dann für 10 min bei 3.000 rpm herunter zentrifugiert, nach Entfernen des Medienüberstands in 2,5 ml steriler 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert und im Anschluss mit derselben Lösung auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt. Nach ihrer Verdünnung wurden die Bakterien sofort in der „Packaging“-Reaktion weiterverwendet.

4.2.5.3. Vorbereitung des Cosmid-Vektors

Der Cosmid-Vektor wurde gemäß dem Herstellerprotokoll vollständig mit *XbaI* und *BamHI* geschnitten. Der Verdau erfolgt in zwei separaten Schritten:

SuperCos 1 (1ng/μl)	22 μl
FastDigest® <i>XbaI</i>	22 μl
FastDigest® Puffer	22 μl
Aqua dest.	154 μl
<hr/>	
gesamt	220 μl

⇒ Ansatz für 30 min bei 37°C inkubieren, dann

Fast Alkaline Phosphatase 10 μl dazugeben.

⇒ Ansatz für 30 min bei 37°C inkubieren, dann die Reaktion durch Inkubieren für 20 min bei 80°C stoppen

Um die Größe des geschnittenen (linearisierten) Vektors zu überprüfen, wurde 1 μl des Ansatzes auf ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetragen und für 60 min bei 10 V/cm Gellänge in einer Gelelektrophoresekammer in 1 x TAE laufen gelassen. Nach der Feststellung der erwarteten Bandengröße von 7.9 kb wurde die mit *XbaI* geschnittene Cosmid-DNA mit Hilfe des „Silica Bead DNA Gel Extraction Kit“ (siehe 4.2.3.1.) aufgereinigt und einem weiteren vollständigen Restriktionsenzymverdau unterzogen:

SuperCos I/ <i>XbaI</i>	70 μl
FastDigest® <i>BamHI</i>	20 μl
FastDigest® Puffer	20 μl
Aqua dest.	90 μl
<hr/>	
gesamt	200 μl

⇒ Ansatz für 30 min bei 37°C inkubieren, dann

Fast Alkaline Phosphatase 10 μl dazugeben.

⇒ Ansatz für 30 min bei 37°C inkubieren; danach die Reaktion durch Inkubieren für 20 min bei 80°C stoppen.

1 µl der dephosphorylierten, geschnittenen Vektor-DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, um den Verdau, wie oben beschrieben, gelelektrophoretisch zu überprüfen. Ein vollständiger Verdau war durch Anwesenheit zweier Banden (1,1 kb und 6,5 kb) zu erkennen. Danach wurde die DNA abermals mittels „DNA Extraction Kit“ extrahiert und im Anschluss in 20 µl Aqua dest. aufgenommen.

4.2.5.4. Vorbereitung der Insert-DNA

Als Insert-DNA für die Cosmid-Klonierungen diente hochmolekulare genomische *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162-DNA (siehe 4.2.2.2.). Die genomische DNA wurde, wie auch die Vektor-DNA, mit der Restriktionsendonuklease *MboI* partiell verdaut:

Reaktionsansatz:

DNA (<i>T. bonasi</i> / <i>T. bialowiezensis</i>), 100 ng/µl	535 µl
<i>MboI</i> (10 IU/µl)	0,15 µl
Red Buffer	60 µl
Fast Alkaline Phosphatase	5 µl
<hr/>	
gesamt	1000 µl

⇒ Ansatz für 10 min bei 37°C inkubieren, dann die Reaktion durch Wärmebehandlung für 20 min bei 68°C stoppen; danach erfolgt die DNA-Extraktion (siehe 4.2.3.1.)

Die überwiegende Anzahl der erhaltenen Fragmente lag im gewünschten Größenbereich zwischen 25 und 40 kb.

4.2.5.5. DNA-Ligation

Katalysiert durch das virale Enzym T4 DNA Ligase wurde die lineare Cosmid-DNA unter Verbrauch von ATP mit den DNA-Fragmenten von *T. bonasi* DSM 17163 bzw. *T. bialowiezensis* DSM 17162 (= Inserts) verknüpft. Bei der Ligation entstehen kovalente Bindungen zwischen den freien 5'-Phosphatgruppen und den ihnen gegenüberliegenden 3'-Hydroxylgruppen glatter (*blunt*) oder überstehender (*sticky*) Enden doppelsträngiger DNA.

Ligationsansatz:

vorbereitete Insert-DNA	2,5 µg
vorbereitete SuperCos 1-DNA; 1 µg/µl	1 µl
10 x Ligase Buffer	2 µl
ATP, 10 mM	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Aqua dest.	ad 20 µl

Beim Zusammenpipettieren des Ligationsansatzes in ein 1,5 µl Reaktionsgefäß wurden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet, um die Einwirkung von Scherkräften auf die DNA zu vermindern. Der Inhalt der Reaktionsgefäße wurde in einer Tischzentrifuge kurz herunterzentrifugiert, dann erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C.

Benötigte Lösungen:

TE-Puffer

10 mM Tris-HCL, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

SM-Puffer

NaCl 5,8 g

MgSO₄·7H₂O 2 g

1 M Tris-HCl, pH 7,5 50 ml

Gelatine (2%) 5 ml

Aqua dest. ad 1 l

10 mM MgSO₄

MgSO₄·7H₂O 0,24 g

Aqua dest. ad 100 ml

⇒ autoklavieren und kühl (8°C) lagern

4.2.5.6. Packaging und Titration der Packaging-Reaktion

Das Verpacken der Insert-tragenden, linearen Cosmide in Phagen („Packaging“) wurde gemäß den Herstellerangaben mit Hilfe des Gigapack® III Gold packaging extracts (Agilent Technologies) durchgeführt. Zwei Gefäße mit „packaging extract“ wurden aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen und erst auf Trockeneis gestellt, dann zwischen zwei Fingern rasch aufgetaut.

Im NanoDrop Spectrometer wurde die im Ligationsansatz enthaltene DNA-Menge gemessen und mit TE-Puffer auf eine Konzentration von ca. $200\text{ ng}/\mu\text{l}$ eingestellt. Je $4\text{ }\mu\text{l}$ eines jeden Ligationsansatzes (einer für *T. bonasi* und einer für *T. bialowiezensis*) wurde zu jeweils einem Gefäß „packaging extract“ hinzupipettiert und durch vorsichtiges, scherkräftevermeidendes Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach kurzem Herunterzentrifugieren in der Tischzentrifuge wurde das Gefäß für zwei Stunden bei 22°C inkubiert, bevor $500\text{ }\mu\text{l}$ SM-Puffer und $20\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform zu dem Ansatz hinzugegeben wurden. Danach wurde das Reaktionsgemisch wieder in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der flüssige, phagenhaltige Überstand in ein neues $1,5\text{ ml}$ Safe Lock Gefäß überführt. Von der Phagen-Lösung wurde eine 1:10 sowie eine 1:50-fache Verdünnung mit 10 mM MgSO_4 hergestellt (siehe 4.2.5.5.). Je $25\text{ }\mu\text{l}$ der Phagen-Dilutionen wurden in einem $1,5\text{ ml}$ Safe Lock Reaktionsgefäß mit je $25\text{ }\mu\text{l}$ der Bakterien-Lösungen vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden $200\text{ }\mu\text{l}$ LB-Medium pipettiert und der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert und alle 15 min vorsichtig geschwenkt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch für 1 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in $50\text{ }\mu\text{l}$ frischem LB-Medium resuspendiert. Mit einem sterilen Glasspatel wurde der komplette Ansatz jeder Bibliothek auf insgesamt jeweils 40 Ampicillin-haltigen LB-Blut-Platten ($50\text{ }\mu\text{l}$ Ansatz/Platte) ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Nach 24 h befanden sich ca. 200 Einzelkolonien auf jeder Platte. Somit war jede der beiden Bibliotheken mit ca. 8×10^3 Kolonien vertreten. Die Genome von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 werden bei einer durchschnittlichen Insert-Länge von 32.500 bp mit insgesamt jeweils etwa $2,6 \times 10^8\text{ bp}$ in den Cosmid-Bibliotheken repräsentiert. Wenn man das Genom von *A. haemolyticum* DSM 20595, das laut GenBank 1.986.154 bp groß ist (Yasawong et al., 2010), als Vergleich heranzieht und davon ausgeht, dass *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17163 eine ähnliche Genomgröße besitzen, würde man auf eine ca. 130-fache Abdeckung der Genome durch die jeweilige Cosmid-Bibliothek kommen.

4.2.5.7. Screening der Cosmid-Bibliotheken

Die Cosmid-Klone wurden mit Hilfe unterschiedlicher Testverfahren auf die Anwesenheit von vier verschiedenen Virulenzfaktoren untersucht:

Virulenzfaktor	Nachweis-Methode
Neuraminidase	Farbreaktion auf MUAN-Filterpapier
Hämolyisin	Lyse-Höfe auf LB-Blut-Platten
Phospholipase D	Lyse-Höfe auf LB-Blut-equi-Platten
DNase	Klare Höfe um Kolonien auf DNase-Test-Agar-Platten

Neuraminidase

Siehe Kapitel 4.2.4.

Hämolyisin

Sowohl *T. bonasi* als auch *T. bialowiezensis* weisen beim Wachstum auf Columbia-Schafblutagar-Platten (5% Schafblut) feine Zonen vollständiger Hämolyse an den Grenzen ihrer Kolonien auf (Lehnen, 2005). Um diese Hämolyse-Aktivität bei den Cosmid-Klonen nachweisen zu können, wurden Ampicillin-haltige LB-Blut-Agarplatten (siehe 4.2.1.) verwendet. Da die hämolytischen Eigenschaften von Bakterien auf unterschiedlichen Blutsorten differieren können, wurde die Hämolysefähigkeit der Klone unter Verwendung von insgesamt sieben Blutsorten untersucht (Wisent-, Schaf-, Ziegen-, Rinder-, Pferde-, Kaninchen- und Schweineblut).

Phospholipase D

Phospholipase D (PLD) lysiert in Anwesenheit von *Rhodococcus equi* Erythrozyten (Barksdale et al., 1981). Dieser CAMP-artige Effekt entsteht durch die synergistische Wirkung von PLD mit der Cholesteroxidase und der Phospholipase C von *Rhodococcus equi*.

Beide Genombanken wurden zunächst vollständig auf LB-Blut-equi-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin (siehe 4.2.1.) ausgestrichen und die Kolonien anschließend auf Ausbildung eines hämolytischen Hofes sowie bei positivem Befund auf dessen Größe untersucht, um Hinweise auf die Bildung von Phospholipase D oder Hämolyisin zu bekommen (Songer et al., 1990).

Unabhängig vom PLD-Nachweis wurden alle Klone beider Bibliotheken für weitere Untersuchungen eingefroren, indem die Kolonien von jeweils 2 Platten in 2 ml Einfriermedium transferiert und bei -80°C gelagert wurden.

DNase

Siehe Kapitel 4.2.12.

4.2.6. Cosmidextraktion/Plasmidextraktion

Die Extraktion der Insert-tragenden Cosmide aus den XL1 Blue MR-Zellen und der Insert-haltigen Plasmide aus den XL2 MRF' Ultrakompetente Zellen wurde mittels GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen waren im Kit enthalten.

Eine Kolonie eines Insert-tragenden Klons wurde zunächst über Nacht bei 37°C in 15 ml-Zentrifugenröhrchen in 5 ml LB + 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin bei leichtem Schütteln im Schüttelinkubator angezüchtet. Das Pellet wurde herunterzentrifugiert, durch Auf- und Abpipettieren mit einer Eppendorf-Pipette in 250 μl Resuspensionslösung resuspendiert und in ein 2 ml Safe Lock Reaktionsgefäß übergeführt. Dem Gemisch wurden 250 μl Lysis-Lösung zugesetzt wonach das Reaktionsgefäß mehrfach vorsichtig geschwenkt wurde, bis der Inhalt klar und viskös erschien. Nach Zugabe von 350 μl Neutralisierungslösung wurde das Reaktionsgefäß abermals mehrfach geschwenkt und im Anschluss für 5 min bei 13.000 rpm in eine Tischzentrifuge gestellt. Zelltrümmer und chromosomale DNA befinden sich im weißen Pellet am Boden des Tubes, während der Cosmid-/ Plasmid-haltige Überstand in ein mitgeliefertes GeneJet™ Spin Column überführt wurde, dass in ein neues 2 ml Safe Lock Reaktionsgefäß eingehängt wurde. Nach 1 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde die Membran zweimal für 30 s bei 13.000 rpm mit je 500 μl Waschlösung gewaschen und nach einem weiteren, einminütigen Zentrifugationsschritt wurden 50 μl Elutionspuffer auf die Membran pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde einige Minuten stehen gelassen und danach 2 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die aufgereinigte Cosmid-/ Plasmid-DNA wurde mit Elutionspuffer auf eine Konzentration von 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ eingestellt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

4.2.7. Subklonierungen von geschnittenen Cosmid-Inserts in den Plasmid-Vektor

pJET 1.2

Da die Anwendung des Standard-Sequenzierverfahrens nach Sanger auf diejenigen Cosmid-Klone, die Träger von vermuteten Virulenzfaktor-Genen waren, aufgrund der großen Insert-Länge nicht praktikabel war, wurden die Inserts dieser Klone abermals mit einer Restriktionsendonuklease verdaut und die entstandenen Schnitt-Fragmente für weiteres Virulenzfaktor-Screening in den Plasmid-Vektor pJET1.2/*blunt* Cloning Vector (Fermentas) subkloniert (Vektorkarte im Anhang B).

4.2.7.1. Restriktionsenzymverdau von Cosmid-Insert-DNA

Reaktionsansatz:

aufgereinigte Cosmid-Insert-DNA, 100 ng/μl	5 μl
<i>EcoRI</i>	0,5 μl
10x Buffer <i>EcoRI</i>	1 μl
Aqua dest.	ad 10 μl

⇒ Ansatz für 12 Stunden bei 37°C inkubieren, dann Reaktion mit 1,5μl 0,5 M EDTA (pH 8,0) stoppen:

Die Insert-DNA der Cosmide, die in den Virulenzfaktor-Tests (siehe 4.2.5.7.) positive Reaktionen zeigten, wurde aufgereinigt (siehe 4.2.6.) und in separaten Ansätzen mit *EcoRI* (5'-G↓AATTC-3') verdaut. Um die Vollständigkeit des Verdau zu überprüfen, wurden einige μl des Ansatzes einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Die Restriktionsendonuklease wurde so gewählt, dass die aus dem Verdau resultierenden DNA-Fragmente zwischen 1.000 und 10.000 bp lagen, um die Subklonierung in den Plasmid-Vektor zu ermöglichen.

4.2.7.2. pJET1.2/*blunt* Cloning Vektor

Der *blunt*-end Klonierungs-Vektor pJET1.2. ist 2.974 bp groß und besitzt ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Zudem verfügt er über ein Suizid-Gen, dessen offener Leserahmen (Open reading frame, ORF) mit der Aufnahme eines Inserts durchbrochen wird und somit von der Wirtszelle nicht mehr korrekt abgelesen werden kann. Insert-freie Klone exprimieren das Suizid-Gen und sterben ab, während Insert-haltige Klone überleben. Die Klonierungen

wurden gemäß des CloneJET™ PCR Cloning Kit-Herstellerprotokolls (Fermentas) durchgeführt.

4.2.7.3. Entfernung der Überhänge und DNA-Ligation („blunting“)

Der Verdau mit *EcoRI* hinterlässt 5'-überhängende („sticky“) DNA-Enden. Deshalb mussten die DNA-Fragmente vor der Ligation mit dem *blunt-end*-Klonierungs-Vektor pJET1.2. von diesen Überhängen befreit werden. Das dafür verwendete „DNA blunting enzyme“ ist eine thermostabile DNA-Polymerase mit Fehlerkorrektur-Funktion („proof-reading“), die 3'-Überhänge entfernt und 5'-Überhänge auffüllt. Das eingesetzte Mengenverhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA war 3:1.

Reaktionsansatz:

mit <i>EcoRI</i> verdaute Cosmid-DNA	3 µl
2x Reaktionspuffer	10 µl
DNA blunting enzyme	1 µl
Aqua dest.	4 µl

⇒ vortexen, herunterzentrifugieren und für 5 min bei 70°C inkubieren; dann auf Eis stellen und folgende Komponenten hinzupipettieren:

pJET1.2./ <i>blunt</i> Cloning Vector, 50 ng/µl	1 µl
T4 DNA Ligase, 5 IU/µl	1 µl

⇒ Reaktionsgefäß mit Ligationsansatz vortexen, herunterzentrifugieren und für 30 min bei 22°C inkubieren.

4.2.7.4. Transformation in XL2 MRF' Ultrakompetente Zellen

Für die Transformation wurden chemokompetente XL2 MRF' Ultrakompetente Zellen (Agilent Technologies) verwendet, die Resistenz-Gene gegen Tetrazyklin und Chloramphenicol besitzen. Die Transformation erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

Ein 100 µl-Gefäß mit XL2 MRF' Ultrakompetente Zellen wurde über einen Zeitraum von 20 min langsam auf Eis aufgetaut, dann mit 2 µl β-Mercaptoethanol versetzt, vorsichtig geschwenkt und weitere 10 min auf Eis gestellt. Danach wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu den Zellen hinzupipettiert, dieser mehrfach geschwenkt und für 30 min erneut auf Eis gestellt.

Im Anschluss wurde der Transformationsansatz einem 30-sekündigem Hitzeschock in einem 42°C warmen Wasserbad ausgesetzt, für 2 min auf Eis gestellt und dann in ein 2 ml Safe Lock Reaktionsgefäß mit 900 µl SOC-Medium (Sigma-Aldrich) gegeben, das auf 42°C vorgewärmt worden war. Das Reaktionsgefäß mit dem Medium-Zell-Gemisch wurde dann in einen Schüttelinkubator gegeben und 60 min lang bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Diese Inkubation gibt der Wirts-Zelle Zeit, die äußere Matrix zu regenerieren. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf 50 LB-Blut-equi-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert (= 20 µl Ansatz/Platte) und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die durchschnittliche Ausbeute einer Transformation (50 Platten) betrug 16.000 Klone.

4.2.7.5. Plasmid-Extraktion und Sequenzierung

Die Extraktion Virulenzgen-positiver Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (siehe 4.2.6). Die Vorbereitung auf die Sequenzierung Neuraminidase-positiver Klone erfolgte gemäß den Protokollen in Abschnitt 4.2.10.5. Mit Hilfe der in Abschnitt 4.2.10.3. aufgeführten Primer und Protokolle wurde das sogenannte „*primer walking*“ durchgeführt. Beim „*primer walking*“ wird genomische DNA unter Verwendung immer neuer Oligonukleotid-Primer amplifiziert. Zu Beginn des „*primer walking*“ ist die Anfangs- und die Endsequenz eines bestimmten Abschnitts der genomischen DNA bekannt. Das amplifizierte und durch anschließende Sequenzierung erhaltene Fragment dient als Vorlage für die Entwicklung der nächsten Primer und PCR-Protokolle. Auf diese Weise verfährt man, bis die gesamte genomische DNA schrittweise amplifiziert und sequenziert ist.

4.2.7.6. Bioassay zur Bestätigung der Neuraminidase-Aktivität

Um ermitteln zu können, welches der beiden sequenzierten, auf dem Plasmid-Klon bon/cos6A/pJET4A befindlichen Gene für die gesuchte Neuraminidase-Aktivität codiert, wurde einerseits der entsprechende Klon erneut angezchtet und Plasmid-DNA extrahiert (siehe 4.2.6), als auch erneut DNA aus einer frischen 48 h-*T. bonasi* DSM 17163-Kultur extrahiert. Die DNA beider Quellen wurde mit je 2 Primerpaaren in Long-PCRs (siehe 4.2.10.3.) eingesetzt, welche jeweils eines der beiden fraglichen Gene flankierten (bon_UPF_F & bon_UPF_R sowie bon_Sialidase_3F & bon_Sialidase_3R). Als Negativkontrolle diente genomische *A. haemolyticum* DSM 20595-DNA. Die so gewonnenen PCR-Produkte wurden in den Plasmid-Vektor pJET1.2. subkloniert (siehe 4.2.7.3.), in XL1 Blue MRF' Ultrakompetente Zellen transformiert (siehe 4.2.7.4.) und nach der Anzucht auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten dem MUAN-Filterpapier-Test (siehe 4.2.4.) unterzogen.

4.2.8. Auswerten ermittelter Sequenzen

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem BioEdit Alignment-Programm (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) aneinandergefügt. Im NCBI ORF-Finder wurden die Open Reading Frames der in der Gesamtsequenz enthaltenen Gene ermittelt und mit Hilfe des NCBI BLAST Search-Programmes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit Sequenzen bestehender Gendatenbankeinträge verglichen.

4.2.9. Hämolyseaktivität-Assay

Ding und Lämmler (1996) beschrieben einen Test zum Nachweis der Hämolyse-Aktivität von *Arcanobacterium* spp., der auf der Fähigkeit der Bakterien beruht, Erythrozyten zu lysieren.

Benötigte Lösung:

PBS, pH 7,5

NaCl	4,8 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	7,6 g
KH ₂ PO ₄	1,45 g
Aqua dest.	ad 1 l

Erythrozyten-Gewinnung

1.500 µl Vollblut vom Schaf bzw. Pferd wurden in einem 2 ml Safe Lock Reaktionsgefäß 20 min lang bei 2.000 rpm in der Biofuge fresco (Heraeus Instruments) zentrifugiert, der Überstand (Plasma) verworfen und das Erythrozyten-Pellet in 1.000 µl PBS vorsichtig resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2.000 rpm, 20 min) wurde der Überstand erneut abgossen. Das Erythrozyten-Konzentrat wurde 1:10 und 1:100 mit PBS verdünnt und anschließend gemäß des Pipettierschemas (Abb. 4.2.) im Hämolyseaktivität-Assay eingesetzt.

Bakterien-Anzucht für den Hämolyseaktivität-Assay

Die Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* und *Trueperella* wurden 2-4 Tage bei 37°C auf Columbia-Schafblut-Agar-Platten angezüchtet, mit einem Glasspatel abgenommen und in 10 ml PBS (pH 7,5) resuspendiert. Dann wurde die Bakteriensuspension bei 2.500 rpm für 10 min bei 4°C in der Multifuge 3 S-R (Heraeus Instruments) zentrifugiert, der Überstand abgossen und das Pellet erneut in 10 ml PBS-Puffer gelöst. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Um eine vergleichbare Bakterienkonzentration für alle Versuchsansätze zu

gewährleisten, wurde das Pellet zunächst mit einer Pipette in PBS resuspendiert und dann mit Hilfe des OD-Messgerätes (ATB Expression Densimat, Bio-Mérieux) und weiterem PBS-Puffer auf eine definierte Trübung von 6 gemäß Mc Farland-Standard eingestellt.

Versuchsaufbau des Hämolyseaktivität-Assays

Der Test wurde nach unten stehendem Pipettierschema in einer 96-well-Mikrotiterplatte mit Rundboden (VWR International) durchgeführt (Abb. 4.2.). In jede Vertiefung wurden 15 µl Bakterien-Suspension bzw. PBS (Negativkontrolle) pipettiert und 50 µl Erythrozyten-Suspension hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und bei 37°C inkubiert. Die Beurteilung des Hämolyse-Grades erfolgte nach ½, 1, 2, 4, 8, 16, 24 und 48 h Inkubation des Ansatzes bei 37°C. Bei positivem Ergebnis erfolgte eine vollständige Lyse der im Reaktionsgefäß befindlichen Erythrozyten, die als gleichmäßig rote Färbung der im Probengefäß enthaltenen Flüssigkeit sichtbar wurde. Im Falle eines negativen Ergebnisses sammelten sich die Erythrozyten punktförmig am Boden des Reaktionsgefäßes, während der Rest der Lösung farblos erschien.

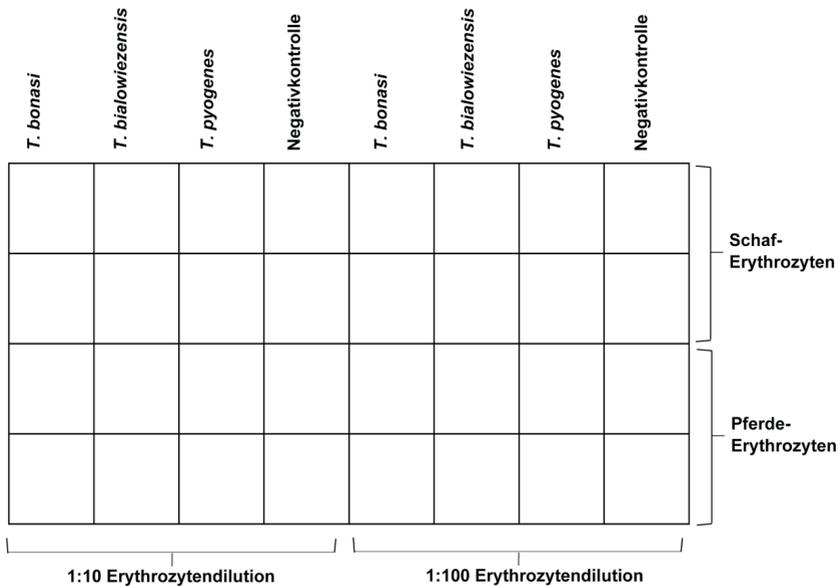


Abb. 4.2.: Pipettierschema für den Hämolyseaktivität-Assay

4.2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.2.10.1. Primer-Design

Alle Oligonukleotid-Primer (mit Ausnahme der 10-mere für die „Uneven PCR“) wurden mit Hilfe des „Primer design“ Programms der NCBI-Webseite erstellt. Bei der Erstellung der Primer wurde auf einen hohen G/C-Gehalt (50-60%), hohe Bindungsspezifität durch eine Mindestlänge von 18 bp und ähnliche Schmelztemperaturen der beiden Primer eines Paares geachtet (Schmelztemperatur = die Temperatur, bei der 50% aller DNA-Moleküle als Einzelstrang vorliegen). Bei den Namen der Primer steht „F“ jeweils für „Vorwärts-“ (forward-) Primer und „R“ jeweils für „Rückwärts-“ (reverse-) Primer. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma BioTez (Berlin).

4.2.10.2. Standard-PCR

Die PCR dient der exponentiellen Vermehrung (Amplifikation) spezifischer Nukleotidsequenzen. Diese können anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, mit dem Fluoreszenzfarbstoff GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (VWR) gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die PCR-Produkte können zudem für Nachfolganwendungen wie Klonierungen, Blotting, und Sequenzierungen verwendet werden. Während der PCR werden drei aufeinanderfolgende Schritte zyklisch wiederholt: in der Denaturierungsphase trennt sich die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge auf. In der darauffolgenden Annealingphase heften sich die Oligonukleotid-Primer an die Einzelstränge an und in der abschließenden Polymerisations- oder Extensionsphase (Neustrangsynthese) katalysiert eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase in Anwesenheit von Magnesium-Ionen die Anlagerung der im PCR-Ansatz enthaltenen Desoxynukleotide in 5'-3'-Richtung an die Einzelstrang-DNA und bildet so einen neuen Doppelstrang aus, wobei sich die Anzahl der Kopien in jedem Zyklus verdoppelt. Für die hier beschriebene Standard-PCR wurden Primer gewählt, die spezifisch für das Pyolysin (PLO)-Gen von *T. pyogenes* sowie das Arcanolysin (ALN)- und das Phospholipase D (PLD)-Gen von *A. haemolyticum* sind. Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur wurde jede Primerkombination zunächst mit jeder neu eingesetzten Bakterien-DNA-Probe einer Test-PCR mit einem Temperaturgradienten von 50 – 60°C eingesetzt. Alle weiteren PCRs wurden mit der ermittelten optimalen Annealingtemperatur durchgeführt (59 bzw. 60°C), bei der die Positivkontrolle eine deutliche Bande in der erwarteten Höhe produzierte und weder bei der zu testenden DNA, noch bei der Positivkontrolle unspezifische Banden zu beobachten waren.

Mit Hilfe dieser Methode sollte zudem sichergestellt werden, dass eventuelle Kreuzreaktionen zwischen den vermuteten *T. bonasi*- und *T. bialowiezensis*-Hämolysin-Genen mit *T. pyogenes plo* oder *A. haemolyticum aln* bzw. *pld* erkannt werden. Ülbegi (2010) identifizierte auf diesem Wege in einer PCR-Reaktion mit plo-spezifischen Primern mittels Absenkung der Annealingtemperatur das Phocaelysin-Gen (*ply*) von *A. phocae*.

Spezifische Oligonukleotid-Primer für die PCR:

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5'-3'	Annealingtemperatur
PLO_1F	GCGCCGCGAGTCTCCATCTC	60°C
PLO_1R	GTTGCGCGCGTTTGCTGGAA	60°C
PLO_2F	TGGCGCGCTCGTGTTAGCAA	60°C
PLO_2R	CTTGCCCTGCGGGTCGTAGC	60°C
ALN_1F	CAACGGTAGCAGGCACGGCA	60°C
ALN_1R	ACCGCCACGGTGACGAAGTG	60°C
ALN_2F	TCCCAGGAGCGTTGGTCCGT	60°C
ALN_2R	GGCACAGCTGGAACGGTGGT	60°C
PLD_1F	TTGGTAGTGCGGCTGCTGCG	60°C
PLD_1R	TCCAGCCGACACCTCCGACT	59°C

Spezifische Oligonukleotid-Primer für die Sonden-Herstellung:

Für die DotBlot- und Southern Blot-Reaktionen wurden mittels PCR spezifische Sonden hergestellt, die anhand der Virulenzfaktor-Gene von *T. pyogenes*-PLO sowie *A. haemolyticum*-ALN und -PLD entwickelt wurden. Auf die Funktion und den Einsatz der Sonden wird in Kapitel 4.2.11. genauer eingegangen.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5'-3'	Annealingtemperatur	Länge
PLO_F1	GGGACGAGATTAGCTACGAC	54°C	272 bp
PLO_R1	TTTGACATTTTCCTCGACCC	50°C	
ALN_F1	CAAAGTTCGCTTTGGAATGG	50°C	281 bp
ALN_R1	GTTCTTGAACCAAGCCGTA	52°C	
PLD_F2	CAACTAGTGCTGGCGATACG	54°C	275 bp
PLD_R2	AGCAACTGCTTCCTTGTCGT	52°C	

Reaktionsansatz:

Lösung	Menge in µl/Ansatz
H ₂ O	15,9
5x GoTaq-PCR-Puffer + 1,5 mM MgCl ₂	5,0
dNTP-Mix (2 mM)	1,0
Primer 1 (25 µM)	1,0
Primer 2 (25 µM)	1,0
GoTaq DNA Polymerase	0,1
Proben-DNA	1,0
Summe	25,0

PCR-Bedingungen:

Schritte	Temp. (°C)	Zeit	zurück zu Schritt Nr.	Zyklen
1 Initial-Denaturierung	94	10 min		
2 Denaturierung	94	1 min		
3 Annealing	55	1 min		
4 Polymerisation	72	1,5 min	2	30
5 Abschluss-Polymerisation	72	10 min		
6 Kühlung	8	unendlich		

4.2.10.3. Long PCR

Bei der Long PCR wird eine DNA-Polymerase verwendet, die besonders zur Amplifikation großer PCR-Produkte (bis zu 21 kb Länge) geeignet ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Long PCR-Methode für die Plasmid-PCR des 5.037 bp langen Neuraminidase-positiven *T. bonasi*-Plasmid-Klones bon/cos6A/pJET4A verwendet. In nachfolgenden PCR-Reaktionen wurde die Methode beibehalten, um die auf dem Plasmid-Klon befindlichen Gene mit Hilfe des „*primer walking*“ komplett sequenzieren zu können.

Spezifische Oligonukleotid-Primer:

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5'-3'	Annealingtemperatur
pJET1.2._F	CGACTCACTATAGGGGAGAGCGGC	61°C
pJET1.2._R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	54°C
bon_Neu_1_F	AAAGTCGCTGGGCAGTCCGC	58°C
bon_Neu_2_F	CCCGGAAATTACAACAGGAA	50°C
bon_Neu_1R	GCGCAGCCTTCGAAGTGGGT	58°C
bon_Neu_2_R	AGAGCTCCCAGAGCCTCCGC	60°C
bon_Neu_3F	CGGGTTCGATGGGTACGGCG	60°C
bon_Neu_3R	CCGCAACCACGCCTACACCA	58°C
bon_Neu_4F_1	CGGCCTGGAAAAGCCTGGGT	58°C
bon_Neu_4F_2	CGTCCCCGCGCCATTAGTT	58°C
bon_Neu_4R_1	CCGAGCTGAGCGTCGTCGTG	60°C
bon_Neu_4R_2	AACCGCACAAAGGGCGTCTG	58°C
bon_Neu_5F	CCGATGCAGTCAAACCTACTA	52°C
bon_Neu_5R	CACGGAGGGCGCCAGTTTT	58°C
bon_Neu_6F	GCCCAACCTGGGCACCTTGA	58°C
bon_Neu_6F_1	GTCGGGAACGGGCGAAGCAA	58°C
bon_Neu_6R	GCTTGCCTTCCGGGCTCGAC	60°C
bon_Neu_6R_1	CCCAGGTTGGGCATGGCTGG	60°C
bon_UPF_F	GGCCCCGGCACATGATGGTC	60°C
bon_UPF_R	CGGTCACGGCTGGCAAACCA	58°C
bon_Sialidase_1F	CGTGACCGATCTGGACGGCG	60°C
bon_Sialidase_1R	GGCCTGACACCGGTGGCTTC	60°C
bon_Sialidase_2F	GCAGACACCGTCCCATCGCC	60°C
bon_Neu_7R	GCGAGAAAGCGCCCGAACCT	58°C
bon_Sialidase_3F	CCCGCTGGTGCGAACATTGC	58°C
bon_Sialidase_4F	GCCCCTTGTGCGGTTTCGTGT	58°C
bon_Sialidase_2R	TGGGTTCTCTCGACCCGGT	58°C
bon_Sialidase_3R	CGTCCGAGCCTTCTCGCAGC	60°C

Reaktionsansatz:

Lösung	Menge in µl/Ansatz
dd H ₂ O	34,0
10x Long-PCR-Puffer + 1,5 mM MgCl ₂	5,0
dNTP-Mix (2 mM)	5,0
Primer 1 (25 µM)	2,0
Primer 2 (25 µM)	2,0
Long PCR enzyme mix	0,25
Proben-DNA	2,0
Summe	50,0

PCR-Bedingungen:

Schritte	Temp. (°C)	Zeit	zurück zu Schritt Nr.	Zyklen
1 Initial-Denaturierung	95	5 min		
2 Denaturierung	95	15 sec		
3 Annealing	60	30 sec		
4 Polymerisation	68	3,5 min	2	30
5 Abschluss-Polymerisation	68	10 min		
6 Kühlung	8	unendlich		

4.2.10.4. Uneven PCR

Mit der Methode der „uneven PCR“ (Chen & Wu, 1997) lassen sich aus nur teilweise bekannten Gen-Sequenzen PCR-Fragmente amplifizieren, indem man einen spezifischen mit einem unspezifischen Primer kombiniert. Die „uneven PCR“ setzt sich aus zwei aufeinanderfolgenden PCR-Durchläufen zusammen, die beide aus 40 PCR-Zyklen bestehen. Im 1. Durchlauf wird ein spezifischer Primer (der z.B. anhand einer konservierten Region erstellt wird) mit einem unspezifischen Primer, einem 10 Nukleotide (= 10-mer) langen Zufallsprimer (= „random primer“) kombiniert. Von dem im 1. Durchlauf generierten PCR-

Produkt werden 0,5 µl entnommen und im 2. Durchlauf als Ausgangsmaterial (= Template) eingesetzt. Die Komponenten entsprechen alle denen des 1. Durchlaufs mit der Ausnahme, dass ein spezifischer interner (= „nested“) Primer anstelle des in der ersten Reaktion verwendeten spezifischen Primers eingesetzt wird. Um einerseits das Annealing der verschiedenen langen Primer mit ihren unterschiedlichen Schmelztemperaturen zu ermöglichen, gleichzeitig aber die Amplifizierung unspezifischer Fragmente zu verhindern, wird die Annealingtemperatur während der PCR-Reaktion mehrfach verändert.

Unspezifische Oligonukleotid-Primer:

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5'-3'	Schmelztemperatur
10-mer 1	TTAGGTAACG	28°C
10-mer 2	GCAATGGATT	28°C
10-mer 3	ATTCCTAGCG	30°C
10-mer 4	CGTCGAATGT	30°C
10-mer 5	CCAGCTTAACT	30°C
10-mer 6	CGATGTCAGT	30°C
10-mer 7	AACCTGTACA	28°C
10-mer 8	CTTAGGGAGC	32°C
10-mer 9	TGGCAGAAAC	30°C
10-mer 10	GCTACCACAT	30°C

Spezifische Oligonukleotid-Primer:

Um eine größtmögliche Spezifität der Primerbindung zu gewährleisten, wurden alle spezifischen Primer in die konservierte Region des Pyolysin-Gens von *T. pyogenes* gelegt.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Annealingtemperatur
Pyo_ECT_F	GAGGCGACAGGTCTAGCGTG	58°C
Pyo_2R	CACGCTAGACCTGTCGCCTC	58°C
Pyo_AF	ACAGGTCTAGCGTGGGA	49°C
Pyo_AR	TCCCACGCTAGACCTGT	49°C
Pyo_BR	CCACCACGGATCCCACGCTAGACC	64°C

Reaktionsansatz:

Lösung	Menge in µl/Ansatz
H ₂ O	12,6
5x PCR-Puffer GoTaq + 1,5 mM MgCl ₂	5
dNTP-Mix (2 mM)	2,5
Primer 1 (10 µM), unspezifisch	1,0
Primer 2 (10 µM), spezifisch	2,5
GoTaq-Polymerase	0,4
Proben-DNA	1,0
Summe	25,0

PCR-Bedingungen:

Schritte	Temp. (°C)	Zeit (sec)	zurück zu Schritt Nr.	Zyklen
1 Initial-Denaturierung	94	60		
2 Denaturierung	94	30		
3 Annealing	55	60		
4 Polymerisation	72	60		
5 Denaturierung	94	15		
6 Annealing	42	60		
7 Polymerisation	72	60	2	20
8 Denaturierung	94	15		
9 Annealing	57	30		
10 Polymerisation	72	30		
11 Denaturierung	94	15		
12 Annealing	45	30		
13 Polymerisation	72	30	8	20
14 Abschluss-Polymerisation	75	300		
15 Kühlung	8	unendlich		

4.2.10.5. Sequenzier-PCR und Sequenzierung

Hierbei werden komplementäre DNA-Stränge einzeln sequenziert. Anstelle normaler Desoxynukleotidtriphosphate werden bei der Sequenzier-PCR-Reaktion vereinzelt Fluoreszenzfarbstoff-markierte Didesoxynukleotidtriphosphate in die neu amplifizierte DNA eingebaut. Jedes der 4 ddNTPs trägt eine andere Markierung. Der Einbau der Moleküle erfolgt gemäß des Komplementärprinzips (G-C, A-T). Die markierten Moleküle stoppen die DNA-Synthese, wodurch PCR-Produkte unterschiedlicher Länge entstehen. Bei ausreichend großer Molekülzahl erhält man Einzelstränge, die sich in ihrer Länge nur um jeweils ein Nucleotid unterscheiden und deren letztes Nucleotid immer ein markiertes Nucleotid ist. Die Amplifikate werden schließlich in einem automatischen Sequenziergerät untersucht, welches die fluoreszierenden Moleküle kapillarelektrophoretisch auftrennt, misst und auswertet. Da jedes der vier ddNTPs eine andere Markierung trägt, verrät diese, welches Nucleotid das Letzte pro neusynthetisiertem Strang ist und die komplette Sequenz wird lesbar.

Reaktionsansatz:

Lösung	Menge in µl/Ansatz
5x BigDye®-Terminator	1,5
v.1.1. Sequencing Buffer®	
Primer (10 µM)	1,0
BigDye® Reaction Mix	2,0
Template-DNA	5,5
Summe	10,0

PCR-Bedingungen:

Schritte	Temp. (°C)	Zeit	zurück zu Schritt Nr.	Zyklen
1 Denaturierung	95	10 sec		
2 Annealing	50	5 sec		
3 Polymerisation	60	1,5-4 min	1	18
4 Kühlung	8	unendlich		

Protokoll:

Der Reaktionsansatz wurde nach obigem Protokoll bei Raumtemperatur in ein 0,5 µl Reaktionsgefäß pipettiert und in den Thermocycler (Peqlab Biotechnologie) gestellt. Als Primer dienen die spezifischen Oligonukleotide der Standard-, der Long- und der uneven PCR. Die Annealingtemperatur wurde der Länge des zu erwartenden Amplifikates angepasst (1 min/1.000 bp). Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurde die Probe dem Thermocycler entnommen und nach folgendem Protokoll weiter bearbeitet:

+ 45 µl Sam Solution (Big Dye X-Terminator Purification Kit)

+ 10 µl Big Dye X-Terminator Solution (vorher vortexen)

⇒ 20 min bei 1.850 Umdrehungen/min bei Raumtemperatur schütteln, herunterzentrifugieren und in den Sequencer (Applied Biosystems) stellen.

Mit Hilfe der Computerprogramme BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) und BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden die erhaltenen Sequenzen anschließend bearbeitet und mit bekannten Sequenzen verwandter Bakterienspezies verglichen, um Übereinstimmungen bzw. Sequenzähnlichkeiten zu detektieren.

4.2.11. DNA-Blotting (DotBlot-Hybridisierung, Southern Blotting)

Für das DNA-Blotting, welches auf einer Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) beruht, wurde das Biotin-Streptavidin-System von Fermentas verwendet. Als Sonden wurden mittels Standard-PCR mit *T. pyogenes*-PLO- sowie *A. haemolyticum*-ALN- und PLD-Primern generierte (siehe 4.2.10.2.), Biotin-markierte Sonden (siehe 4.2.11.1.) verwendet. Markierte DNA-Sonden dienen der Detektion bekannter Sequenz-Abschnitte in der Target-DNA. Die Reaktion beruht auf folgendem Prinzip: die zu testende DNA wird einzelsträngig mit Hilfe eines UV-Crosslinkers auf einer Nylon-Membran fixiert. Die Biotin-markierte Sonde wird ebenfalls einzelsträngig gemacht und mit der zuvor auf die Nylon-Membran aufgebracht DNA inkubiert. Dabei hybridisiert die Sonde mit komplementären Fragmenten der auf der Nylonmembran fixierten DNA. Unspezifische Bindungen werden durch Inkubation des Blots mit fremder DNA (hier: genomische Kaninchen-DNA) sowie Detergenzien wie deionisiertes Formamid und SDS verhindert (die Sonde muß die Fremd-DNA von der Ziel-DNA verdrängen). Überschüssiges Sondenmaterial wird von der Membran abgespült. Anschließend

wird der Blot mit einem Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat inkubiert, das mit hoher Affinität an die Biotin-markierten Sonden bindet, die ihrerseits über Wasserstoffbrückenbindungen mit den auf der Membran fixierten komplementären DNA-Fragmenten verbunden sind. Die Sichtbarmachung der gebundenen Sondenabschnitte geschieht mittels Zugabe eines Streptavidin-bindenden Substrates (NTB = Nitroblau-tetrazoliumchlorid/BCIP = 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-Toluidinsalz). Die an das Konjugat gekoppelte alkalische Phosphatase setzt das Substrat um, wobei es eine Farbreaktion (Chemolumineszenz) auslöst. Positive Proben erscheinen blau-violett. Die Reaktion wird durch Waschen in Aqua dest. gestoppt, sobald die Hintergrundfärbung zu stark wird.

4.2.11.1. Sonden-Markierung

Die mittels Standard-PCR (siehe 4.2.10.2.) hergestellten Sonden wurden nach dem Protokoll des „Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit“ (Fermentas) mit Biotin markiert. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 10 µl der 100 ng/µl DNA-Template-Lösung, 10 µl Dekanukleotide in 5x Reaktionspuffer und 24 µl Aqua dest. einpipettiert. Der Ansatz wurde geschüttelt (Vortex), kurz in einer Tischzentrifuge herunterzentrifugiert, für 5-10 min in ein kochendes Wasserbad plaziert und nach erneutem Herunterzentrifugieren auf Eis gestellt. Danach wurden 5 µl „Biotin Labeling Mix“ und 1 µl Klenow-Fragment, *exo*⁻ (5 U) hinzupipettiert, der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und für 20 h bei 37°C in einen Heizblock gestellt. Die Reaktion wurde mit 1 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0, gestoppt. Die markierte Sonde wurde bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

4.2.11.2. Southern Blotting

Southern (1975) beschrieb eine Methode, mit der sich spezifische Fragmente in genomischer DNA detektieren lassen, die zuvor mittels Restriktionsenzymen verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Dabei werden die in der Agarose befindlichen DNA-Fragmente mittels eines Saugverfahrens (Blotting) auf eine Nitrozellulose-beschichtete Nylonmembran transferiert (Abb. 4.3.). Nach der Fixierung der transferierten DNA-Fragmente auf der Nylonmembran (UV-Crosslinker) erfolgte die Vor-Hybridisierung mit unspezifischer DNA, die eigentliche Hybridisierung mit spezifischer, markierter Sonde und die Detektion gemäß dem DotBlot-Protokoll (siehe 4.2.11.3.).

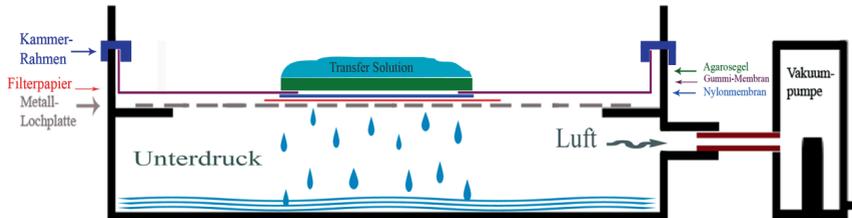


Abb. 4.3.: Schematischer Aufbau eines Southern Blot

Restriktionsenzymverdau genomischer *T. bonasi* DSM 17163- und *T. bialowiezensis* DSM 17162-DNA

Benötigte Lösungen und Biochemikalien:

Genomische DNA, 100 ng/μl	40 μl
NotI/ EcoRI/ KpnI/	
HindIII/ SmaI	5 μl
10x Puffer (je nach Enzym unterschiedlich)	5 μl

⇒ Ansatz für 1 h (Fast digest® enzymes) bzw. 12 h (normale Restriktionsenzyme) bei 37°C inkubieren, dann Reaktion mit EDTA stoppen:

0,5 M EDTA, pH 8,0	7,5 μl
--------------------	--------

Hochmolekulare genomische DNA (siehe 4.2.2.2.) wurde nach obigem Protokoll in mehreren Ansätzen mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen vollständig verdaut. Die Restriktionsspaltprodukte wurden anschließend bei 120 A (ca. 75 V) in der Gelelektrophorese über 5 h in einem 1,5%-igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer aufgetrennt und im Anschluss unter UV-Licht fotografiert (siehe 4.2.3.). Als Größenmarker bei der Gelelektrophorese diente der Ladder Mix von Fermentas. Die Färbung der Fragmente erfolgte mit Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass sie keine Schnittstellen innerhalb des *T. pyogenes*-PLO-Gens und des *A. haemolyticum*-ALN-Gens haben. Außerdem sollten sie eine Erkennungssequenz von mindestens sechs Nukleotiden haben, um zu starkem Verdau der genomischen DNA vorzubeugen.

Transfer der DNA auf eine Nitrozellulose-beschichtete Nylonmembran

Benötigte Lösungen:

Depurination-Lösung (0,25 M HCl)

HCl (37%) 20,8 ml

Aqua dest. ad 1 l

Transfer-Lösung

NaOH 16,0 g

NaCl 35,1 g

Aqua dest. ad 1 l

Der Transfer der DNA vom Agarosegel auf die Nylonmembran erfolgte unter Verwendung einer Vakuumkammer (Vakuum-Blotter Transvac TE 80, Hoefer Scientific). Diese wurde wie folgt auf den DNA-Transfer vorbereitet: über die Metall-Lochplatte der Kammer wurde ein mit Aqua dest. befeuchtetes Filterpapier gelegt, das an allen Seiten ca. 3 cm länger war, als das zu blottende Gel. Hierauf wurde eine auf Gel-Größe zugeschnittene Nylon-Membran (Amersham Hybond™-N) plziert, die zuvor in Aqua dest. getaucht wurde. Auf die Nylon-Membran wurde eine Gummi-Maske mit einem rechteckigen Fenster in der Mitte gelegt, welches allseits einige Millimeter kleiner als das Agarose-Gel war. Das Agarose-Gel wurde dann direkt auf das Fenster der Gummi-Maske gelegt und fortan nicht mehr verschoben, da der Transfer der negativ geladenen DNA zur positiv geladenen Nylon-Membran bei Kontakt sofort beginnt. Das Agarose-Gel wurde mit Depurination-Lösung überschichtet und die mit dem Kammer-Rahmen vollständig abgedichtete Vakuumkammer mit der Vakuum-Pumpe verbunden. Nach 10 min Pumpenlauf (bei ca. 0,15 bar Unterdruck) wurde die restliche, auf dem Gel verbliebene Depurination-Lösung vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Gel mit Transfer-Lösung überschichtet. Nach einer weiteren Stunde Transfer wurde auch die Transfer-Lösung entfernt und die Lage der Gel-Taschen auf der getrockneten Nylon-Membran eingezeichnet. Mit Hilfe eines UV-Crosslinkers wurde die DNA bei 254 nm, 30 W, 60 s auf der Nylon-Membran fixiert. Im Anschluss erfolgte die Prä-Hybridisierung, Hybridisierung und Detektion gemäß des DotBlot Hybridisierungs-Protokolls (siehe 4.2.11.3.). Hat die Probe an ein komplementäres DNA-Stück gebunden, kann die korrespondierende Bande (wie beim DotBlot auch) durch eine blau-violette Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

4.2.11.3. DotBlot Hybridisierung

Die DotBlot Hybridisierung wurde gemäß des „Biotin Chromogenic Detection Kit“-Protokolls von Fermentas durchgeführt.

Benötigte Lösungen:

100x Denhardt's Lösung

Bovines Serum-Albumin, Fraktion 5 (BSA)	2 g
Ficoll® 400	2 g
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	2 g
Aqua dest.	ad 100 ml

20x SSC (pH 7,0)

NaCl	175,3 g
Na-Citrat	88,2 g
Aqua dest.	ad 1 l

⇒ pH-Wert mit 10 M NaOH auf pH 0,7 einstellen

Prä-Hybridisierungs-Lösung

20x SSC	6 ml
100x Denhardt's Lösung	1 ml
Deionisiertes Formamid	10 ml
SDS	0,1 g
Aqua dest.	3 ml

⇒ unmittelbar vor Gebrauch genomische Kaninchen-DNA (1.000 ng/μl) 10 min bei 100°C denaturieren und der Lösung zu einer Endkonzentration von 50 μg/ml begeben.

Hybridisierungs-Lösung

Prä-Hybridisierungs-Lösung	15 ml
----------------------------	-------

⇒ unmittelbar vor Gebrauch die Biotin-markierte Sonde für 5 min bei 100°C denaturieren und zum Abkühlen auf Eis stellen (Verhindern des Renaturierens der Sonde). Im Anschluss der Prä-Hybridisierungslösung zu einer Endkonzentration von 25-100 ng/ml begeben.

20x SSC-Lösung (stock solution)

NaCl	175,3 g
Natriumcitrat-Dihydrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ -2H ₂ O)	88,2 g
Aqua dest.	ad 1 l

⇒ auf pH 7.0 einstellen und autoklavieren

2x SSC, 0,1% SDS-Lösung

20x SSC-Lösung	100 ml
SDS	1,0 g
Aqua dest.	ad 1 l

0,1x SSC, 0,1% SDS-Lösung

20x SSC-Lösung	5 ml
SDS	1,0 g
Aqua dest.	ad 1 l

1x Blocking/Waschpuffer (B/W-Puffer)

10x Blocking/Waschpuffer (Fermentas)	20 ml
Aqua dest.	ad 200 ml

Blocking-Lösung

1x Blocking/Waschpuffer	50 ml
Blocking Reagenz (Fermentas)	0,5 g

Streptavidin-Lösung

Blocking-Lösung	20 ml
5000x Streptavidin-AP Konjugat	4 µl

1x Detektionspuffer

10x Detektionspuffer	3 ml
Aqua dest.	ad 20 ml

Substrat-Lösung

1x Detektionspuffer	19,4 ml
50x BCIP/NBT	600 µl

Aufbringen der DNA auf die Nylon-Membran

Eine Lösung genomischer DNA wurde 10 min lang bei 100°C gekocht, kurz auf Eis gestellt und anschließend punktförmig direkt auf eine positiv geladene, Nitrozellulose beschichtete Nylon-Membran (Hybond™-N, GE Healthcare) pipettiert. Nach dem Trocknen wurde die DNA durch Inkubation in einem UV-Crosslinker (siehe 4.2.11.2.) auf der Membran fixiert. Während des gesamten Vorgangs wurde darauf geachtet, dass die Nylon-Membran nur am Rand und nur mit sterilen Pinzetten oder Plastikhandschuhen berührt wurde, um der versehentlichen Bindung humaner DNA (Kontamination) auf der Membran vorzubeugen.

Prä-Hybridisierung und Hybridisierung

Die UV-fixierte Nylon-Membran wurde in eine Plastiktasche gegeben, die mit Prä-Hybridisierungslösung (0,2 ml/cm² Membran) gefüllt und anschließend unter Ausschluß etwaiger Luftblasen luftdicht verschweißt wurde. Die Tasche wurde für 4 h bei 42°C in einen Heiz-Schüttelinkubator gelegt und mit ca. 60 rpm bewegt. Danach wurde die alte Prä-Hybridisierungslösung verworfen. Die Nylonmembran wurde in eine neue Plastiktasche übergeführt, diese mit Hybridisierungslösung (60 µl/cm²) gefüllt, unter Ausschluß von Luftblasen gleichfalls luftdicht verschweißt und bei 42°C und ca. 60 rpm für 12 h in einem Heiz-Schüttelinkubator bewegt. Nachdem die Nylon-Membran dem Hybridisierungsbehältnis entnommen wurde, wurde sie in einer Plastikschale auf einen Wippschüttler gelegt und bei leichtem Schwenken zweimal für je 10 min mit 2x SSC + 0,1% SDS gewaschen. Im Folgenden wurde die Plastikschale mit Aqua dest. gespült, die Membran wieder in den Behälter gegeben, und dann zweimal mit 0,1x SSC + 0,1 SDS für je 20 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert und dabei alle 5 min vorsichtig geschwenkt.

Detektion

Die folgenden Schritte wurden alle bei Raumtemperatur ausgeführt. Zunächst wurde die Membran in einer Plastikschale auf einen Wippschüttler gestellt und bei Raumtemperatur 5 min lang in 30 ml 1x Blocking/Waschpuffer bei leichter Bewegung gewaschen. Danach wurde der B/W-Puffer entsorgt und durch 30 ml Blocking-Lösung ersetzt. Die Membranoberfläche (einschl. der fixierten DNA) wurde nun 30 min lang bei leichtem Schütteln geblockt. Dann wurde die Membran für 30 min bei leichter Bewegung in 20 ml Streptavidin-Lösung inkubiert und im Anschluss erst für 15 min mit 60 ml B/W-Puffer und dann für 10 min mit 20 ml Detektionspuffer auf dem Wippschüttler gewaschen. Danach folgte die Entwicklung des Blots. Hierfür wurde die Membran in eine auf ihre Größe zugeschnittene

Plastiktasche gegeben, in die 10 ml frisch zubereitete Substrat-Lösung eingefüllt wurde. Die Plastiktasche wurde so verschweißt, dass die in ihr enthaltene Lösung keine Luftblasen enthielt und anschließend für 15-30 min im Dunkeln entwickelt. Positive Reaktionen erschienen als blau-violette Farbreaktion auf der Nylon-Membran. Die Reaktion wurde nach der Entwicklung durch kurzes Spülen mit Aqua dest. gestoppt.

4.2.12. DNase-Test

Jeffries et al. (1957) entwickelten eine einfache Methode, um Desoxyribonuklease (DNase) produzierende Bakterien zu detektieren. Hierfür setzten sie dem Plattenmedium hochmolekulare Desoxyribonukleinsäure zu, deren Phosphodiesterverbindungen durch DNase hydrolysiert werden. Nach 24-stündiger Bebrütung der zu untersuchenden Bakterien bei 37°C auf der DNase-Platte wird diese mit 1 M Salzsäure überschichtet. Dadurch fällt die dem Medium zugesetzte hochmolekulare DNA aus und lässt das Plattenmedium opak erscheinen. Um DNase-positive Kolonien herum entsteht durch den DNA-Abbau ein klarer Hof. Je 3.200 Klone aus den genomischen Cosmid-Bibliotheken von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 wurden mit Hilfe von DNase-Test-Agar-Platten auf DNase-Aktivität hin untersucht. Hierzu wurden 42 g des DNase-Test-Agars in 1 l Aqua dest. suspendiert und 15 min lang bei 121°C autoklaviert. Der Agar wurde dann auf 55°C herabgekühlt und nach Beigabe von 5 ml einer 20 mg/ml Ampicillin-Lösung in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen wurden je 16 Platten/Bibliothek mittels Glasspatel mit den Cosmid-Klonen beimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden die Platten ca. 2 mm hoch mit 1 M Salzsäure übergossen und auf Hofbildung um die Kolonien herum untersucht. Als Positivkontrolle diente *Staphylococcus aureus*.

4.2.13. Erstellung phylogenetischer Stammbäume

Für die Darstellung des Verwandtschaftsverhältnisses der *T. bonasi*-Neuraminidase Aminosäuresequenz zu den Neuraminidase sequenzen verwandter Bakterien wurden die Aminosäuresequenzen von *T. pyogenes* NanH und NanP, *A. haemolyticum* NanA und die der *A. viscosus* Sialidase herangezogen.

Zu den Kriterien für die Auswahl des am besten geeigneten („best fitting“) Modells der Proteinentwicklung gehört, dass das gewählte Model mit seinen theoretischen und mathematisch im Modell eingefassten Annahmen zur Sequenzevolution (diese beschreiben, wie Mutationen stattfinden) am besten zum vorhandenen Datensatz passt und somit die

Unterschiede der Sequenzen in den tatsächlich vorliegenden Daten am besten beschreibt. Die Auswahl, welches der getesteten Modelle diesen Anforderungen entspricht, erfolgt mit Hilfe statistischer Parameter, die die Wahrscheinlichkeit des Passens für jedes der getesteten Modelle widerspiegeln. Bei älteren Modellen erfolgte dies lediglich mit den „Maximum Likelihood values“ (*lnL*-Wert); heute werden häufig die Informationskriterien „Akaike information criterion“ (AIC) und neuerdings das auch für größere Stichproben geeignete „Bayesian information criterion“ (BIC) hinzugezogen.

Für die vorliegenden Aminosäuresequenzdaten erwies sich das Modell „WAG+G+I“ (Whelan und Goldman, 2001) als das „Best-Fit Substitution Model“ für die Beschreibung des Verwandtschaftsverhältnisses zwischen der *T. bonasi*-Neuraminidase und anderen Neuraminidasen, da hierfür die niedrigsten BIC- und AIC-Werte sowie die höchsten *lnL*-Werte errechnet wurden. Für die Erstellung eines ersten Stammbaumes (Abb. 5.8.) wurden alle Alignment-Positionen, die eine Lücke („gap“) enthielten, entfernt (= „complete deletion“), so dass die Gesamtlänge des Alignments um die Summe dieser Positionen verkürzt wurde. Somit können evtl. in den Lücken liegende phylogenetisch relevante Informationen verloren gehen. Für die Erstellung des zweiten Stammbaumes (Abb. 5.9.) wurden dagegen alle Positionen verwendet (= „use all sites“), was bedeutet, dass die gap-Position nur dann entfernt wurde, wenn im Vergleich zweier Sequenzen eine Sequenz einen gap aufweist. In den gaps (d.h. Insertionen bzw. Deletionen) enthaltene Informationen bleiben erhalten; doch dadurch, dass diese nun unterschiedlich lang sein können, fließen sie nicht mehr alle mit dem gleichen Gewicht in die Baumrekonstruktion ein. Folglich erzeugt jede Methode eine statistische Verzerrung, deren Auswirkungen unklar sind. Wenn, wie im vorliegenden Fall, beide Methoden nahezu identische Topologien erzeugen, spricht dies für eine höhere Verlässlichkeit (Robustheit) hinsichtlich des Ergebnisses.

Die Phylogenien in dieser Arbeit (Abb. 5.8. und 5.9.) wurden nach Korrektur der Alignments per Hand mit Hilfe des Programms MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) erstellt. Die „Maximum likelihood“ für die Berechnungen beträgt 100 bootstraps. Der „Gamma distribution shape parameter“ (G) ist α . Aufgrund des geringen Verwandtschaftsgrades mit der *T. bonasi*-Neuraminidase wurde *T. pyogenes* NanP aus den Stammbäumen entfernt.

4.2.14. Erstellung räumlicher Proteinstruktur-Modelle

Die räumlichen Proteinstrukturmodelle der *T. bonasi*-Neuraminidase und des *T. bonasi* „UPF-ähnlichen Proteins“ wurden mittels Eingabe der Aminosäuresequenzen der genannten Proteine in das Programm zur Erstellung von 3D-Proteinstrukturmodellen der i-Tasser-Online-Plattform der University of Michigan, USA (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/>) erstellt. Die Modelle stellen die Proteinbindungsstellen sowie die Sekundärstruktur der Proteine dar (siehe Abb. 5.10 und 5.13.).

5. Ergebnisse

Die in diesem Kapitel beschriebenen Tests werden nach ihrer Relevanz in Bezug auf die Charakterisierung möglicher Virulenzfaktoren bei *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* (= positives Testergebnis) beschrieben und nicht in chronologischer Reihenfolge der Untersuchungen.

Im folgenden Übersichtsdiagramm werden die Ergebnisse der Untersuchungen an potentiellen Virulenzfaktoren von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* schematisch dargestellt.

Untersuchung von von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* auf mögliche Virulenzfaktoren

Neuraminidase

Neuraminidase-Filterpapier-Test (MUAN-Test) mit *T. bonasi* und *T. bialowiezensis*:
beide Bakterien positiv (+)

Erstellung von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis*-Cosmidbibliotheken. Untersuchung aller Cosmidklone auf Neuraminidase-Aktivität (MUAN-Test)

T. bialowiezensis-Cosmidbibliothek:
alle Klone Neuraminidase negativ (-)
-> **Schlussfolgerung:**
T. bialowiezensis-Cosmidbibliothek deckt nicht das komplette *T. bialowiezensis*-Genom ab.

T. bonasi-Cosmidbibliothek:
mehrere Klone Neuraminidase-positiv (+)

Selektion Neuraminidase-positiver *T. bonasi*-Cosmidklone & Cosmidextraktion des Klones bon/cos6A, Restriktionsenzymverdau mit *EcoR* I und *Xho* I, Subklonierung in den Plasmidvektor pJET 1.2.

Selektion der Plasmidklone auf Neuraminidase-Aktivität (MUAN-Test): **mehrere Neuraminidase-positiv (+) Plasmid-Klone**

Selektion Neuraminidase-positiver Plasmidklone (MUAN-Test). Plasmidextraktion des Klones „bon/cos6A/pJET4A“, schrittweise Sequenzierung des ca. 5000 bp langen Inserts mittels „primer walking“.

Identifizierung des „*T. bonasi* UPF-ähnlichen Gens“ (ORF „bon-UPF“: 1161 bp)

Identifizierung der „*T. bonasi* Neuraminidase NanH“ (ORF „bon-NEU“: 3312 bp)

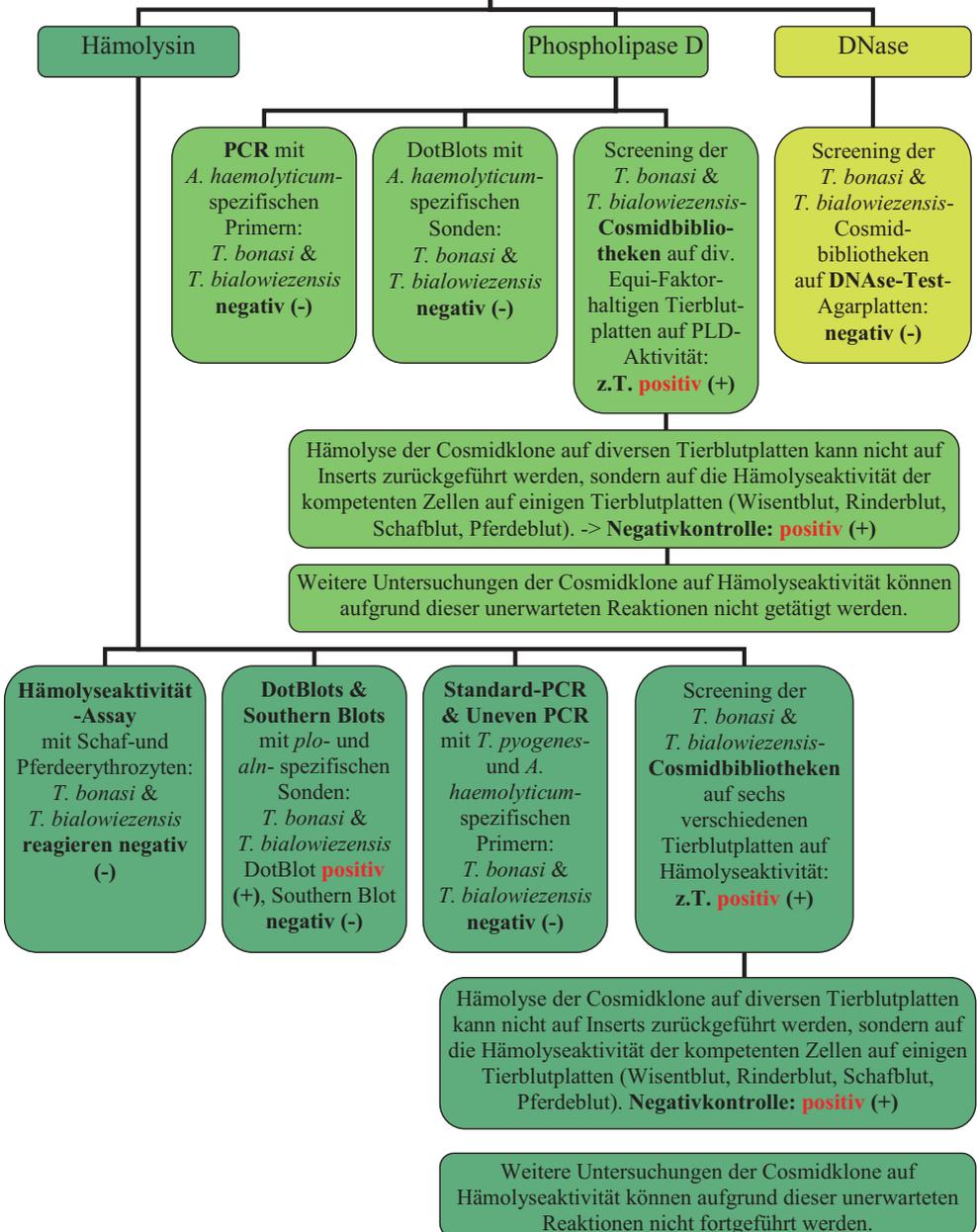
Stammbaumerstellung aufgrund geringer NS- und AS-Sequenzübereinstimmungen in der Gruppe der „UPFs“ nicht möglich. Erstellung eines Proteinstrukturmodells des „*T. bonasi* UPF-ähnlichen Proteins“

Plasmidklone, die allein das „*T. bonasi*-UPF-ähnliche Gen als Insert tragen, erweisen sich im MUAN-Test als **Neuraminidase-negativ (-)**.

Die Erstellung von Stammbäumen ergibt, dass die NS- und AS-Sequenz der „*T. bonasi* Neuraminidase NanH“ am nächsten mit der „*T. pyogenes* Neuraminidase NanH“ verwandt ist. Erstellung eines Proteinstrukturmodells der „*T. bonasi* Neuraminidase NanH“.

Ist die Neuraminidase UPF-abhängig?
PCR mit *T. bonasi* & Neuraminidase-Primern -> Bande in erwarteter Höhe. Klonierung des PCR-Produktes in Plasmidvektor -> Neuraminidase-**positive** Klone. Das *T. bonasi* UPF-ähnliche Gen ist für die Ausbildung der Neuraminidase-Fähigkeit nicht notwendig.

Untersuchung von von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* auf mögliche Virulenzfaktoren (Fortsetzung)



5.1. Neuraminidase

5.1.1. MUAN-Test der Bakterien auf Filterpapier

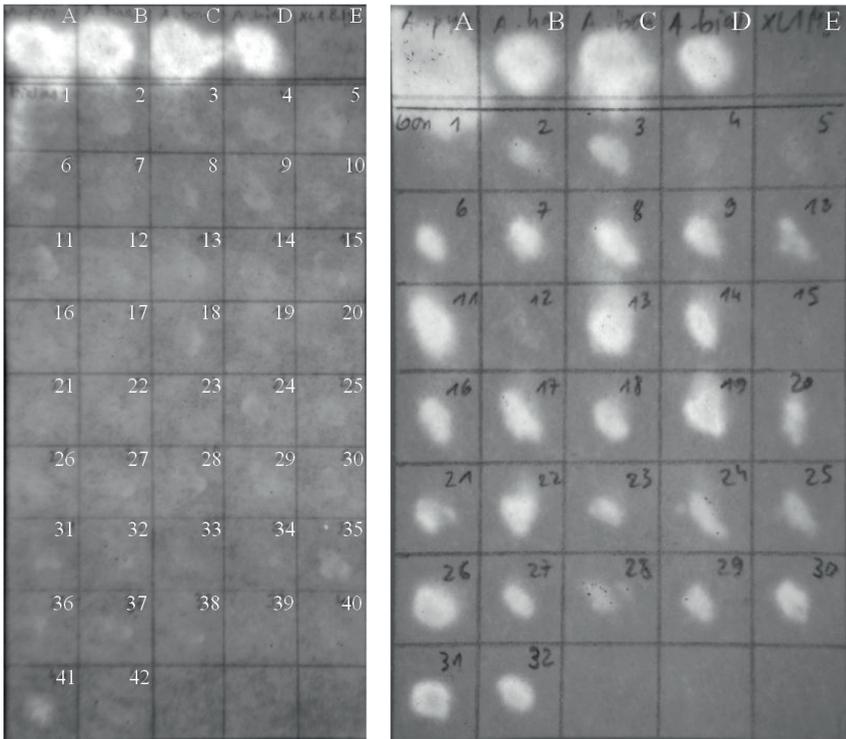
Trueperella pyogenes DSM 20630, *A. haemolyticum* DSM 20595, *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 wurden mittels Impföse auf MUAN-getränktes Filterpapier aufgebracht und auf Neuraminidase-Aktivität untersucht. Mit Ausnahme der Negativkontrolle leuchteten alle untersuchten Bakterien unter UV-Bestrahlung deutlich hellblau und waren somit Neuraminidase-positiv (Abb. 5.1.).



Abb. 5.1.: Neuraminidase-Filterpapiertest mit (1) *T. pyogenes* DSM 20630, (2) *A. haemolyticum* DSM 20595, (3) *T. bonasi* DSM 17163, (4) *T. bialowiezensis* DSM 17162 und der (5) Negativkontrolle = *E. coli* XL2 Ultrakompetente Zellen.

5.1.2. Screening der Cosmid-Bibliotheken auf Neuraminidase-Aktivität

Die aus jeweils 8×10^3 Einzelkolonien bestehenden Cosmidbibliotheken von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 wurden mittels Neuraminidase-Filterpapiertest vollständig auf Neuraminidase-Aktivität untersucht, wobei die Klone zunächst in Gruppen (ca. 200-220 Klone/Gruppe) getestet wurden (Abb. 5.2). Hierbei wies nur eine der *T. bialowiezensis*-Gruppen (Abb. 5.2. (a), Nr. 41) eine leichte Neuraminidase-Aktivität auf, welche im Einzelklon-Test nicht bestätigt wurde. Dagegen erwiesen sich in der *T. bonasi*-Bibliothek 27 von 32 Gruppen als schwach bis deutlich Neuraminidase-positiv (Abb. 5.2. (b)). Daraufhin wurde eine Einzelklon-Testung Neuraminidase-positiver Gruppen durchgeführt.

**Abb. 5.2. (a)****Abb. 5.2. (b)**

Neuraminidase-Filterpapieretest mit den in Gruppen zusammengefassten Cosmid-Klonen der genomischen (a) *T. bialowiezensis*-Bibliothek (A = *T. pyogenes* DSM 20630; B = *A. haemolyticum* DSM 20595; C = *T. bonasi* DSM 17163; D = *T. bialowiezensis* DSM 17162; E = XL1 Blue MR Superkompetente Zellen; 1-42 = zusammengefasste Klonierungsplatten 1-42), (b) *T. bonasi*-Bibliothek (A = *T. pyogenes* DSM 20630; B = *A. haemolyticum* DSM 20595; C = *T. bonasi* DSM 17163; D = *T. bialowiezensis* DSM 17162; E = *E. coli* XL1 Blue MR Superkompetente Zellen; 1-32 = zusammengefasste Klonierungsplatten 1-32). Auf jeder Klonierungsplatte befanden sich ca. 200 Klone.

5.1.3. Subklonierung des Cosmid-Klones bon/cos6A in den Plasmidvektor pJET 1.2. und Identifizierung zweier Neuraminidase-positiver Plasmid-Klone

Jede der beiden Cosmid-Bibliotheken (*T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162) bestand aus ca. 8×10^3 Kolonien, die erst in Gruppen und später – im Fall einer positiven Reaktion – einzeln auf Neuraminidase-Aktivität getestet wurden. Die Untersuchung der Einzelklone Neuraminidase-positiver Gruppen der *T. bonasi*-Cosmid-Bibliothek ergab

mehrere Neuraminidase-positive Klone; unter anderen wurde der *T. bonasi*-Cosmid-Klon bon/cos6A isoliert (Abb. 5.4., Nr. 1). Dessen Cosmid wurde extrahiert und die im Cosmid befindliche Insert-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *EcoR* I und *Xho* I verdaut (Abb. 5.3.). Die dabei entstandenen Fragmente wurden in den Plasmidvektor pJET 1.2. subkloniert. Die Plasmidklone wurden wiederum auf Neuraminidase-Aktivität überprüft (Abb. 5.4.). Aus den Neuraminidase-positiven *T. bonasi*-Plasmid-Klonen bon/cos6A/pJET4A (Abb. 5.4., Nr. 8) und bon/cos6A/pJET7A (Abb. 5.4., Nr. 9) wurde das jeweilige Plasmid isoliert und deren ca. 5000 bp lange Inserts anschließend (5.1.4. und Anhang C) mittels „primer walking“ (siehe 4.2.7.5.) sequenziert. Die Insertsequenz des Klons bon/cos6A/pJET7A erwies sich hierbei als identisch mit der des Klons bon/cos6A/pJET4A.

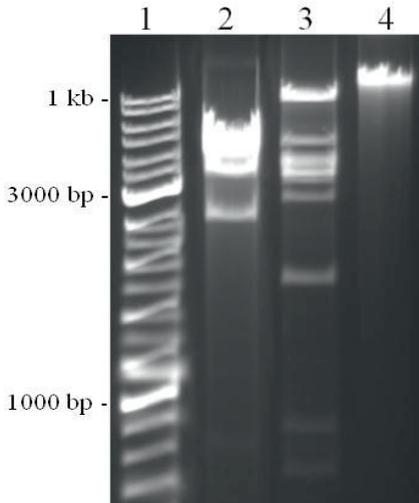


Abb. 5.3.: Verdau des Neuraminidase-positiven Cosmid-Klones bon/cos6A mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen.

1 = Standard (Ladder Mix, Fermentas); 2 = bon/cos6A/*EcoR* I; 3 = bon/cos6A/*Xho* I; 4 = Cosmid von bon/cos6A, ungeschnitten.

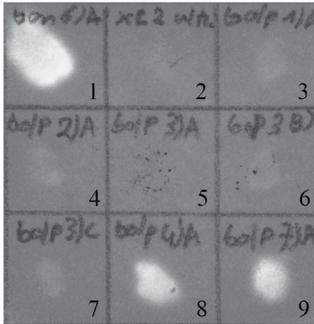


Abb. 5.4.: Neuraminidase-Filterpapier-Test der in den Plasmidvektor pJET 1.2. klonierten Fragmente des Neuraminidase-positiven Cosmid-Klones bon/cos6A

1 = Neuraminidase-positiver Cosmid-Klon bon/cos6A (Positivkontrolle); 2 = *E.coli* XL2 Ultrakompetente Zellen (Negativkontrolle); 3 = Plasmidklon bon/cos6A/pJET1A; 4 = Plasmidklon bon/cos6A/pJET2A; 5 = Plasmidklon bon/cos6A/pJET3A; 6 = Plasmidklon bon/cos6A/pJET3B; 7 = Plasmidklon bon/cos6A/pJET3C; 8 = Plasmidklon bon/cos6A/pJET4A; 9 = Plasmidklon bon/cos6A/pJET7A.

5.1.4. Sequenzierung des Neuraminidase-positiven Plasmid-Klons bon/cos6A/pJET4A

Die Sequenzierung des Neuraminidase-positiven *T. bonasi*-Plasmid-Klons bon/cos6A/pJET4A mittels „primer walking“-Technik ergab eine Nukleinsäuresequenz von 5037 bp. Die Sequenz enthielt zwei offene Leseraster (ORF), die mittels „BLAST search“ mit bekannten Sequenzen anderer Bakterien verglichen wurden. Hierbei umfasste ORF „bon-NEU“ 3312 bp (siehe 5.1.5.) und ORF „bon-UPF“ 1161 bp (siehe 5.1.6.). Die vollständige Sequenz des Inserts sowie die Leserichtung beider Gene wird in Anhang D dargestellt.

5.1.5. Die *Trueperella bonasi*-Neuraminidase

Die Verifizierung der *T. bonasi*-Neuraminidase erfolgte *in silico* durch Vergleich ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz mit Sequenzen bekannter bakterieller Neuraminidasen/Sialidasen mittels „BLAST search“ und Alignment (siehe 5.1.5.2.) und funktionell mittels Bioassay (siehe 5.1.5.3.). Die Nukleotidsequenz der *T. bonasi*-Neuraminidase wurde unter der accession-Nummer KC92507 in die NCBI Gendatenbank eingetragen. Für das Neuraminidase-Protein von *T. bonasi* wurde ein Molekulargewicht von 117,80 kDa (http://web.expasy.org/compute_pi/) und ein isoelektrischer Punkt von pH 4,77 errechnet (<http://isoelectric.ovh.org/>).

5.1.5.1. Nukleotid- und Aminosäuresequenz

Die Aminosäure-Zusammensetzung des *T. bonasi*-Neuraminidase-Proteins ist in Abb 5.5. dargestellt. Die am häufigsten vorkommende Aminosäure ist Glycin (12%); die am seltensten

vertretene Aminosäure ist Cystein. Obgleich die Aminosäuresequenzen der bakteriellen Neuraminidasen/ Sialidasen untereinander nur sehr geringe Ähnlichkeit (20-30%, Vimr et al., 1994) aufweisen, lassen sich zwei, für diese Gruppe charakteristische, Motive identifizieren. Das erste ist das sogenannte RIP/RLP (Arg-Ile/Leu-Pro)-Motiv und das zweite die sogenannte ASP-Box. Innerhalb der Aminosäuresequenz der *T. bonasi*-Neuraminidase ist das katalytische RIP/RLP-Motiv wie bei allen bakteriellen Neuraminidasen einmal vertreten. Im Gegensatz dazu tritt das ASP-Box-Motiv (Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp) fünfmal (Abb. 5.6.) innerhalb der *T. bonasi*-Neuraminidase auf, was konsistent mit den Literaturangaben zur zwei- bis fünffachen Wiederholung des Motivs ist (Jost et al., 2002).

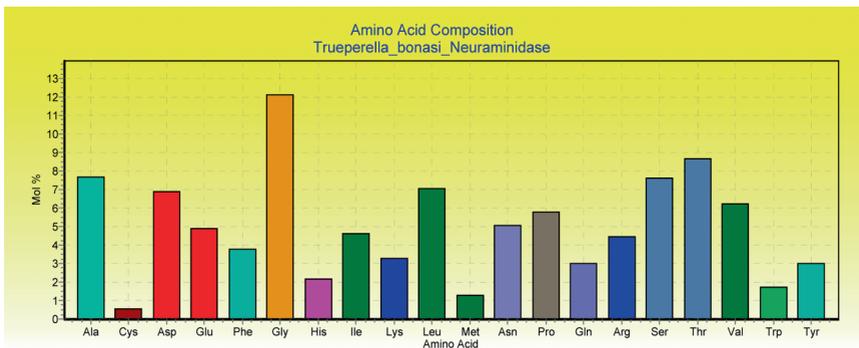


Abb. 5.5: Aminosäure-Zusammensetzung des *T. bonasi*-Neuraminidase-Proteins (Quelle: BioEdit)

ORF „bon-NEU“, *T. bonasi*-Neuraminidase (3312 bp):

```

Pos.
1   atgggaatgtacgtccggcctgacaccgggtggcttccttacttacgggtccacactt
   M G M Y V R P D T G G F L T Y G S T L
58  cgggataacgagtgactcacatcacgtggacgcaaagttcaactgaaggcctgtca
   P D N E W T H I T W T S S T E G L S L
115 ctttacgtcgatggccagctacgcgaaaacaagacttggctctgttcaaaacccaatc
   Q Y V D G Q L R E N K T W S V Q N P I
172 acgattcctgccgacaagctcggaggcaaaggtttcagcggcctcgtcgatgaacta
   T I P A D K L G G K G F S G L V D E L
229 aaaatctacaaccgggcactcacggccgagaggtttcggcatcgatcgacgtcta
   K I Y N R A A L T A A E V S A S I D A L
286 gagctcccagagcctccgcccctcccaaaactcaacgcaacattttctatcatgaat
   E L P E P P P A P K L N A T F S I M N
343 ccgaaacccgaaggcgcagccttcgaagtgggtgaaactatccggttcgagcttaa
   P K P E G A A F E V G E T I R F E L K

```

5. Ergebnisse

400 gtcacgaatgataccggcatcgatcgctcatttgaatccacggcttcgaacctgat
V T N D T G I D R S F E S T A S N L D
457 aactgcgcggatgcaaatggagcgcgtacgcgcccggcgataccgagtcgtgccc
N W R G C K W S A L R A G D T Q S C P
514 ttccccacgcacacggttactgatgaggacgtcaaggcagggttcacgcgcgacg
F P T H T V T D E D V K A G G F T P T
571 atcacattccagatttacgatcgaccggctactctggccctgcaacgcgcccggca
I T F Q I Y D R T G Y S G P A T P A A
628 cccttcgagggtaatccggtaggcggtatctccacgcctcgtcacaatcaacaacttt
P F E G N P V G V S P R L V T I N N F
685 gagttcacggacgggacgaataaagacaattacagcgcgggggatgaactcactgcc
E F T D G T N K D N Y S A G D E L T A
742 tcgctgacactcaaaatgtcttcgatgaaacagtgaacgtgctcgcacacgacgac
S L T L T N V F D E T V N V S L N D D
799 gacctaaagtgttcgggctatcctccgggatcctctcaccgtgtgattcattg
D L K C S G A I L P G S S L T C C D S L
856 acctactcgggtgacccgcgaagatttggagcgcggtcaagccgagctgagcgtcgtc
T Y S V T R E D L E R G Q A E L S V V
913 gtgaatgcgtcatctggcgagctcactggaactgcaacagctaccgcaaccacgct
V N A S S G E A L T G T A T A T A T T P
970 acaccaaccacgtggccgacagcgcagccattccctgcccgaacggcgatcctcgc
T P T T W P T A Q P F P A P N A D P R
1027 ttggcgcagcactatcggatctgacgaaggttgaactcacgtgcccgggcagatac
L A P A L S D L T K V E T H V P G R Y
1084 aacattcgattccagcaattgccgcagcaccacaaggcagcattctggcatcgtat
N I **R I P** A I A A A P N G D I L A S Y
1141 gacctgcccctaataatggcgggggagggcgagactcgccaacgaaaactca
D L R P T N G A G S G G D S P N E N S
1198 atcgttcagcgtcggtaaaagatggcggtaaaacttggggaccgcttacgacaatt
I V Q R R **S K D G G K T W** G P L T T I
1255 gccaaaggccactcgcaccccaaggacaacgattatggttggctgacctcgtac
A K G G H V A P E G Q R Y G W S D P S Y
1312 gtcgctgatcacgaaaccgggaaatcttcaacttcttgggttctctcgacgcc
V V D H E T G E I F N F F V G S L D A
1369 ggtttgcccgaacaaccctcctacaagttagacgagaaccggacaggttgatgaaagc
G L P N N P S Y K L D E N G Q V D E S
1426 catcgcgcacgatgaatttcaccgctgcaaaactcgacagacaacggctacacctgg
H R R T M F T V A N **S T D N G Y T W** N
1483 aagttcgcacaatcacgaacgacgctcggcgagcgtcgcagcagcgttacagggc
K L R T I T N D V L G E R A A D V T G
1540 tgtttcgaacgctcgggtcaggcatacaaaaacgaaccgacaagggcgct
C F A T S G A G I Q K Q H E P H K G R
1597 ctgctccaacaagccgctgtcggcataaggatggcggattccgcgccttaacgatc
L L Q A G A C A R H K D G G F R A L T I
1654 ttctcagatgaccaccaagacctggcaaaaggcgaatttcgctctgccaccgag
F **S D D H G K T W** Q S G N F A S A T E
1711 ggcgcccagttttccgctggaattatgacgaaaacaaggtcgccgaactttccgat
G A Q F F R W N Y D E N K V A E L S D
1768 ggccgctcatgctcaattcgcgcatccacgcggttcccaaggcgtggtaccgc
G R L M L N S R I P R G S H G A G Y R

5. Ergebnisse

1825 ctcgctcgcaatctcgggaagacggcgccatgaactggggagagtatcgatatcgatgag
L V A I S E D G G M N W G E Y R I D E
1882 caattgcaggattctcagaataatgcacaattgcttcgcccggtcccgcagcggaac
Q L Q D S Q N N A Q L L R P F P T A N
1939 aagggaaacttgcgttcgaaagtctctgctgttctcgaacaaaagaatcattggaac
K G T L R S K V L L F S N T K N H W N
1996 cgcgtcaacgggtcacgtgtcgatgtcttacgacgacggcgccgtcctggcccgtgtct
R V N G H V S M S Y D D G A S W P V S
2053 aagcaggttcgcacggggcggaaccgggttacaccacgatggctgttcaacaggggtggg
K Q V R T G G T G Y T T M A V Q Q G G
2110 acaattggctctgctgatggaaccaatatttggaaacgatcggctacatcaatttc
T I G L L M E P N I W N D I G Y I N F
2167 tctctcagctacctcgagcctgaactgccattcgaagtcaagctcggcgctattgaa
S L S Y L E P E L P F E V K L G A I E
2224 gatgtatcggcaactgacgggtagccattgaaaccgattgaggttacgacgacgggc
D V S A T D G V A I E P I E V T T T G G
2281 aatgatccctctctagcggatacctattctgctgaaggcttgccctccgggctcgac
N D P S L A D T Y S A E G L P S G L D
2338 atcgaccccgctactggaacgatctcgggtacgccgaaggaaggcctctcagaagcc
I D P A T G T I S G T P K E G L S E A
2395 gcgagtttcgacgtccggtgacaaatgaagaagctgaggtggcattggcaatccct
A S F D V R V T I E E A E D G T G I P
2452 cgtatctcttcgacaacctcactctcacgctagctcccggcgagaagcgcccga
R I S S T T F T L T L A P G E K A P E
2509 cctgcaccgagtcagaaactcagccgctcggcgtggcggtgtggctggcagtgcc
P A P S P E L Q P S P L A G G V V G S G
2566 cggtttgccgatgttgatggtgatggatagccgatgtgttggtgttggtatgat
R F G D V D G D G Y A D V L A V G S D
2623 ggggtggtccatttctatgctggtcatagcgggggcatattatcatgttgggccgatt
G V V H F Y A G H S G G I Y H V G P I
2680 ggttctggttttggtggaacgtcggttgaccaagctcagtgatgtcaatgggtgatgg
G S G F G G T S L T K V S D V N G D G
2737 cggccagatttcttgggtccggcatgatgatggcggttgtttgtctaccatgtgtct
R P D F L V R H D D G R L F V Y H V S
2794 gctgatggtcatattgttcaaggtgccaggttgggcatggctggaatgggatggat
A D G H I V Q G A Q V G H G W N G M D
2851 aacatcacctatgttggccggttgggagccggttcacaggagtatgtgattgctcgt
N I T Y V G R L G A G S Q E Y V I A R
2908 caggtggctagtggtgatttgtatcgttataacctgacatctagtggttggactgca
Q V A S G D L Y R Y T L T S S G L T A
2965 tcggccaagattggccacgggtgggggaagatgacccgatttttagccggttggcaac
S A K I G H G W G K M T R I L A V G N
3022 attgttgggtgatagcaatccggatctggttgggtattcgcattcgcattggtcagattggtcaggg
I V G D S N P D L V G I R S D G K M F
3079 gcttatcagggccatggcagtggtggacggtgtctgcctttggctcagattggtcaagg
A Y Q G H G D G T V S A F G Q I G Q G
3136 tggacctcgttcgtgaacgcttctcgttccgggtgatctcaccaacgatggccgctt
W T S F V N A F V P G D L T N D G R L
3193 gatctgattggtattcgtggagatggcaagatgtcttctatgaaaatactggcagg
D L I G I R G D G K M F F Y E N T G R

```

3250 ggctatttcaagcccgccgctccagatcggtcacggctggcaaaccatgaaacacatc
      G Y F K P A V Q I G H G W Q T M K H I
3307 agctag
      S *

```

Abb. 5.6.: Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe, Einzelbuchstaben-Code) der *T. bonasi*-Neuraminidase. Die katalytische Untereinheit (RIP) ist gelb gekennzeichnet. Die ASP-Box-Motive sind cyanblau markiert.

5.1.5.2. Verwandtschaft mit anderen bakteriellen Neuraminidasen

Das Ergebnis des „BLAST search“ zeigte, dass die *T. bonasi*-Neuraminidase anhand ihrer konservierten Motive in die Superfamilie der Sialidasen eingeordnet werden kann (Abb. 5.7.).

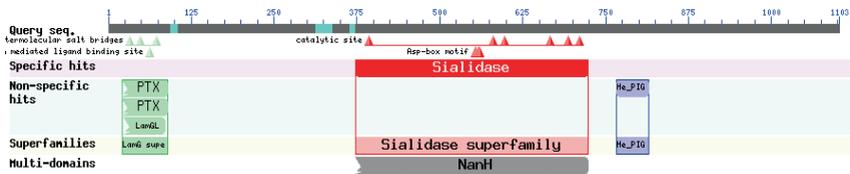


Abb. 5.7.: Ergebnis des „BLAST search“ der *T. bonasi*-Neuraminidase Aminosäuresequenz: Einordnung in die „Sialidase Superfamily“ anhand konservierter Motive. (Quelle: NCBI)

Größte Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten bestehen zwischen der *T. bonasi*-Neuraminidase und den Neuraminidasen von *T. pyogenes* (NanH und NanP), *A. haemolyticum* (NanH und NanA) sowie den Sialidasen mehrerer *Actinomyces* spp.; im Folgenden wird *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*) stellvertretend für diese Spezies aufgeführt. Das Alignment dieser sechs Neuraminidasen/ Sialidasen befindet sich in Anhang D. Aminosäure-Übereinstimmungen mit der *T. bonasi*-Neuraminidase sind gelb markiert. Die zum Vergleich herangezogenen Neuraminidasen sind unter den folgenden Zugangs-Nummern in der GenDatenbank der NCBI eingetragen: *T. pyogenes* NanH = AAK15462.1; *T. pyogenes* NanP = AAK98800.1; *A. haemolyticum* NanA = YP_003696413.1; *A. haemolyticum* NanH = ADH91794; *A. viscosus* Sialidase = AAA21932.1.

Die Nukleinsäuresequenz der *T. bonasi*-Neuraminidase weist die größte sequenzielle Übereinstimmung mit *T. pyogenes* NanH (44%) auf; danach folgen *A. haemolyticum* NanH

und NanA, *A. viscosus* Sialidase und *T. pyogenes* NanP mit 2-8%-iger Nukleinsäuresequenz-Übereinstimmung.

Als Modell für die Proteinevolution erwies sich für die verwendeten Aminosäuresequenzdaten das Modell „WAG+G+I“ als das „Best-Fit Substitution Model“ (siehe 4.2.13.). Vergleicht man die Aminosäuresequenz der *T. bonasi*-Neuraminidase mit Neuraminidasen verwandter Bakterien, findet man auch hier die größte Sequenzübereinstimmung mit *T. pyogenes* NanH (59%). Danach folgen *A. haemolyticum* NanH und *A. viscosus* Sialidase (jeweils 41%), sowie *A. haemolyticum* NanA und *T. pyogenes* NanP (jeweils 38%). Aufgrund der geringen Ähnlichkeit zwischen der *T. bonasi*-Neuraminidase und *T. pyogenes* NanP wurde Letztere bei der Erstellung der Stammbäume nicht berücksichtigt (Abb. 5.8. und 5.9.). Während vor Erstellung des Stammbaumes in Abb. 5.8. die Lücken („gaps“) in den Sequenzen entfernt wurden („complete deletion“), wurden für den Stammbaum in Abb. 5.9. alle Positionen verwendet („use all sites“). Die geringe Abweichung zwischen beiden Stammbäumen bestätigt die Verlässlichkeit der Beschreibungen der Aminosäuresequenzverwandtschaften zwischen den genannten Neuraminidasen.

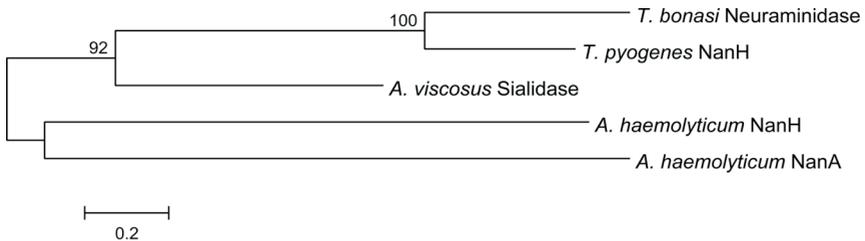


Abb. 5.8.: Aminosäuresequenz-Verwandtschaften der *T. bonasi*-Neuraminidase unter Verwendung des Modells WAG+I+G; **complete deletion** (= Erstellung des Modells nach manueller Entfernung der gaps). Maximum likelihood = 100 bootstraps. I = invariable sites. G = Gamma distribution shape parameter: α . Die Phylogenie wurde mit Hilfe des Programms MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) erstellt.

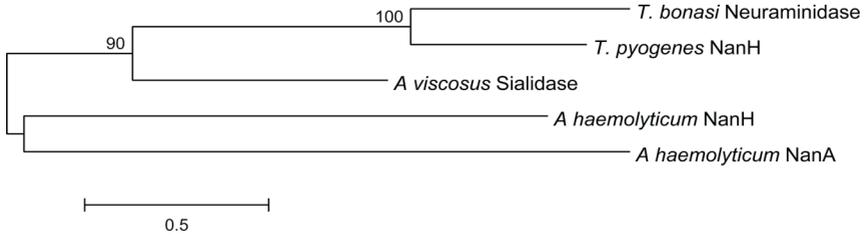


Abb. 5.9.: Aminosäuresequenz-Verwandtschaften der *T. bonasi*-Neuraminidase unter Verwendung des Modells WAG+I+G; **use all sites** (= Erstellung des Modells unter Verwendung aller Positionen). Maximum likelihood = 100 bootstraps. I = invariable sites. G = Gamma distribution shape parameter: α . Die Phylogenie wurde mit Hilfe des Programms MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) erstellt.

5.1.5.3. Protein-Strukturmodell der *T. bonasi*-Neuraminidase

Mit Hilfe des online-Programmes „i-Tasser“ wurden räumliche Protein-Strukturmodelle der *T. bonasi*-Neuraminidase erstellt (Abb. 5.10.). Bakterielle und virale Neuraminidasen besitzen ähnliche Faltblattstrukturen, die aus sechs tetrameren, antiparallel angeordneten β -Faltblättern bestehen (Schenkman et al., 1994). Die aktiven Zentren und strukturellen Motive von humanen, bakteriellen und viralen Neuraminidasen weisen ebenfalls große Übereinstimmungen auf (Schauer, 1985, Roggentin et al., 1993, Monti et al., 1999). Das erstellte Proteinstrukturmodell der *T. bonasi*-Neuraminidase zeigt die erwartete räumliche Struktur.

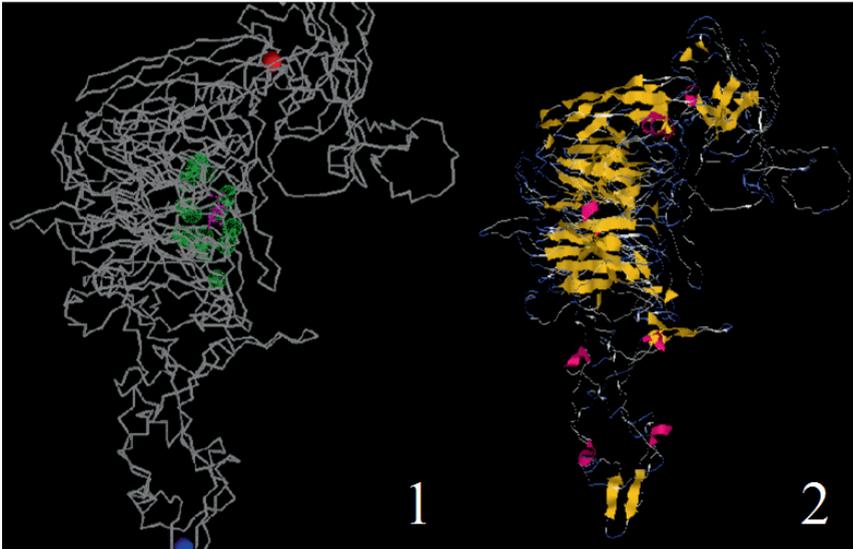


Abb. 5.10.: Mit Hilfe von i-Tasser (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/>) erstelltes räumliches Modell der *T. bonasi*-Neuraminidase mit farbig markierten Proteinbindungsstellen (1) und die Sekundärstruktur (2) mit α -helikaler Struktur (rot) und β -Faltblattstruktur (gelb).

5.1.6. Das *Trueperella bonasi* „UPF-ähnliche Protein“

Auf dem Neuraminidase-positiven *T. bonasi*-Plasmid-Klon bon/cos6A/pJET4A befand sich, gemeinsam mit dem ORF der *T. bonasi*-Neuraminidase, der ORF eines „UPF-ähnlichen Proteins“ (Abb. 5.12.). Dieses Ergebnis stellte einen überraschenden Befund dar, der näher untersucht wurde. Das *T. bonasi* „UPF-ähnliche Protein“ wurde nach den Proteinen der „UPF0027-Gruppe“ (UPF = Unknown Protein Function/RtcB-Proteine), mit denen es am nächsten verwandt ist, benannt. Aufgrund konservierter Domänen besteht zudem Verwandtschaft zu Vertretern der „Hint superfamily“ (Hint = Hedgehog intein domain) (Abb. 5.11.). Proteine dieser Art finden sich u. a. bei diversen Vertretern der Spezies *Corynebacterium* (bis zu 71%-ige Aminosäuresequenz-Übereinstimmung) sowie bei *Rhodococcus equi* (bis zu 65%-ige Aminosäuresequenz-Übereinstimmung) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ob das „UPF-ähnliche Protein“ eine Rolle bei der Ausbildung der vollen Aktivität der *T. bonasi*-Neuraminidase spielt, sollte im Rahmen weiterführender Untersuchungen geklärt werden (siehe 5.1.7.) Die Nukleotidsequenz (Abb. 5.12.) des *T. bonasi*-„UPF-ähnlichen Proteins“ wurde unter der accession-Nummer

KC492508 in die Gendatenbank der NCBI eingetragen. Für das *T. bonasi*-„UPF-ähnliche Protein“ wurde ein Molekulargewicht von 42.98 kDa (http://web.expasy.org/compute_pi/) und eine isoelektrischer Punkt von pH 6,78 errechnet (<http://isoelectric.ovh.org/>). Das räumliche Proteinstrukturmodell des *T. bonasi*-„UPF-ähnlichen Proteins“ wird in Abb. 5.13. dargestellt. Die Abbildung lässt die Sekundärstruktur des Proteins mit seiner α -helikalen Struktur (rot) und der β -Faltblattstruktur (gelb) erkennen (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/>).

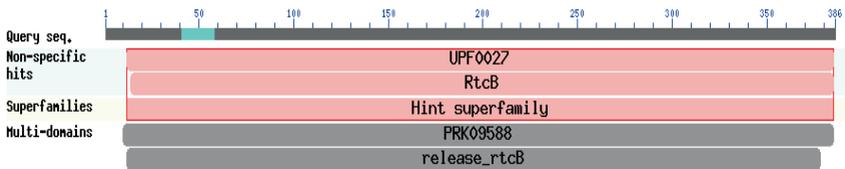


Abb. 5.11.: Ergebnis der „BLAST“ Suche mit der Aminosäuresequenz des *T. bonasi*-„UPF-ähnlichen Proteins“: Ähnlichkeiten mit den UPF0027- und RtcB-Proteinen sowie der „Hint Superfamily“ anhand konservierter Motive (Quelle: NCBI).

ORF „bon-UPF“, *T. bonasi*-„UPF-ähnliches Protein“ (1162 bp):

Position

```

1   atggctgtagaactcaaaaatttcgcctcccagattgatgaacagacctggaacag
   M A V E L K N F A S Q I D E Q T L E Q
58  gcgcgcatggtagcgcgtttaccggttgatatccgcacgtggccctcatgccggac
   A R M V A R L P F V Y P H V A L M P D
115 gcgcacttcggcttgggctcatcggtaggaacggtggttgggacggtgggcgcggtt
   A H F G L G S S V G T V F G T V G A V
172 ttgccagccgcgcgtcggcgtagatatcggtgcggaatgatcggcgtgcgcacgcaa
   L P A A V G V D I G C G M I G V R T Q
229 tttagtgcagcggatcttgcaggcaaggacttgcgcgcctacgtgatcgcgacgtg
   F S A A D L A G K D L R R L R D A I V
286 gattcgattccgctttcgcccggaaattacaacaggaaagtgcgtgggcagtcgcc
   D S I P L S P G N Y N R K V A G Q S A
343 aaggaacgcatagcggagctggaagcgttagcgaagacaacgcagctcgatttatcc
   K E R I A E L E A L A K D N D V D L S
400 cactccccgaagtggcacatgcaattgggctcgcttggcggcggcaatcacttcatt
   H S P K W H M Q L G S L G G G N H F I
457 gaactgtgcttagacgaatcggaagccgatggatgtttctacattccggatcgcgc
   E L C L D E S E A V W M F L H S G S R
514 ggggtgggcaataaaatcgctaaaaaacatatctgggagggccaaaattattgcsrr
   G V G N K I A K K H I W E A Q N Y C G
571 atgaatggcatcgagcttgaacatcgcgaccttgccctatctggaacagggcacggaa
   M N G I E L E H R D L A Y L E Q G T E
628 agctttgccgtctatatgcgcgatctcgagtgggcccaacgctttgcgctggctgac
   S F A V Y M R D L E W A Q R F A W L N

```

```

685  cggaagaaatgatagaccggttttcggccaggctcgggtaatttggggccgcag
    R E E M I D R F S A R L G E F V G R Q
742  gtgctgtaggaagagcgcattaactgccaccataactacaccgtcgaagaacgacac
    V R E E E R I N C H H N Y T V E E R H
799  ggagaaaagacgtgtggctgacgcgcaagggtgcaatccgagcagacgcgggagtc
    G G K D V W L T R K G A I R A D A G V
856  aagggtcttatcccgggttcgatgggtacggcgtcgtacgtggttgaaggtttgggc
    K G L I P G S M G T A S Y V V E G L G
913  aacgacgacggcctgcgctcgccccgcacggcgcggggaaggcgctactcacgcaac
    N D D G L R S A P H G A G R R Y S R N
970  gaggccaaacgacggtttaccgaacatgatttagacagacggatgaaggggatcgta
    E A K R R F T E H D L D R R M K G I V
1027  tatcggcctggaaaagcctgggtggatgagattcctgacgcctataaggatcgcgat
    Y R P G K A W V D E I P D A Y K D I D
1084  caggctatggaagatgctgccccgctggtgcgaacattgcacaaactgcccagatt
    Q V M E D A A P L V R T L H K L R Q I
1141  gtgaacgtgaagggcacgtag
    V N V K G T *

```

Abb. 5.12.: Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe, Einzelbuchstaben-Code) des *T. bonasi*-„UPF-ähnlichen Proteins“.

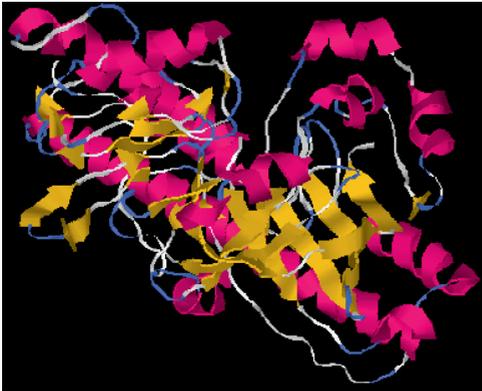


Abb. 5.13.: Mit Hilfe von i-Tasser (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/>) erstelltes räumliches Modell der Sekundärstruktur des *T. bonasi*-„UPF-ähnlichen Proteins“ mit α -helikaler Struktur (rot) und β -Faltblattstruktur (gelb).

5.1.7. Überprüfung der Ergebnisse

Um die Neuraminidase-Aktivität der *T. bonasi*-Neuraminidase zu bestätigen (siehe 4.2.7.6.), wurden PCR-Primer entwickelt, welche die beiden ORFs des Neuraminidase-positiven *T. bonasi*-Klons (Abb. 5.6.) flankieren. Das Ergebnis der PCR findet sich in Abb. 5.14. Da sich die *T. bonasi*-Neuraminidase und das *T. bonasi*-„UPF-ähnliche Protein“ auf demselben Klon befinden, sollte geklärt werden, (1) ob das *T. bonasi*-„UPF-ähnliche Protein“ für die

volle Ausbildung der Neuraminidasefähigkeit der *T. bonasi*-Neuraminidase notwendig ist oder (2) die *T. bonasi*-Neuraminidase bzw. (3) das *T. bonasi*-„UPF-ähnliche Protein“ allein zur Ausbildung der Neuraminidase-Aktivität fähig sind.



Abb. 5.14.: Long-PCR mit *T. bonasi*-UPF-spezifischen (2-6) und *T. bonasi*-Neuraminidase-spezifischen (7-11) Primern. Um die Spezifität der Primer für *T. bonasi*-UPF und *T. bonasi*-Neuraminidase zu überprüfen, wurden neben genomischer *T. bonasi*-DNA (Bahn 2 und 7) auch *T. bialowiezensis*-DNA (Bahn 3 und 8), *T. pyogenes*-DNA (Bahn 4 und 9) und *A. haemolyticum*-DNA (Bahn 5 und 10) in die Long-PCR eingesetzt.

Bahn	DNA/ Primer
1	Standard (Ladder Mix, Fermentas)
2	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ Primer bon_UPF_F+_R
3	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ Primer bon_UPF_F+_R
4	<i>A. haemolyticum</i> DSM 20595/ Primer bon_UPF_F+_R
5	<i>T. pyogenes</i> DSM 20630/ Primer bon_UPF_F+_R
6	Negativkontrolle UPF
7	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ Primer bon_Sialidase_2F+3R
8	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ Primer bon_Sialidase_2F+3R
9	<i>A. haemolyticum</i> DSM 20595/ Primer bon_Sialidase_2F+3R
10	<i>T. pyogenes</i> DSM 20630/ Primer bon_Sialidase_2F+3R
11	Negativkontrolle Sialidase (Neuraminidase)

Die Produkte dieser PCR (Abb. 5.14., Bahn 2 und 7) wurden in den Plasmid-Vektor pJET 1.2. kloniert. Je drei Klone aus jeder Transformation wurden plasmidextrahiert und mittels Gelelektrophorese auf das Vorhandensein des korrekten Inserts überprüft (Abb. 5.15.).

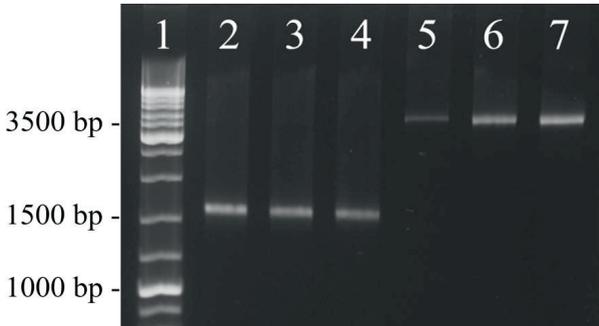


Abb. 5.15.: Plasmidextrahierte und nach PCR-Amplifikation in die Gelelektrophorese eingesetzte Inserts von drei *T. bonasi*-Plasmidklonen mit UPF-Insert (Bahn 2-4) und Neuraminidase-Insert (Bahn 5-7).

Bahn	DNA
1	Standard (Ladder Mix, Fermentas)
2	Insert Plasmidklon b/c/pUPF 2
3	Insert Plasmidklon b/c/pUPF 3
4	Insert Plasmidklon b/c/pUPF 5
5	Insert Plasmidklon Sia 4P-9
6	Insert Plasmidklon Sia 4P-11
7	Insert Plasmidklon Sia 7G-6

Um zu untersuchen, ob beide Leserahmen (ORF „bon-NEU“ & ORF „bon-UPF“) für die volle Ausbildung der Neuraminidase-Aktivität notwendig sind (siehe Klon bon/cos6A/pJET4A, Abb. 5.16., Nr. 1), oder ob allein der ORF „bon-NEU“ (Neuraminidase) ausreicht, wurden zwei der oben genannten Klone, b/c/pUPF 2 und Sia 7G-6, mittels MUAN-Filterpapier-Test auf ihre Neuraminidase-Aktivität untersucht (Abb. 5.16.).

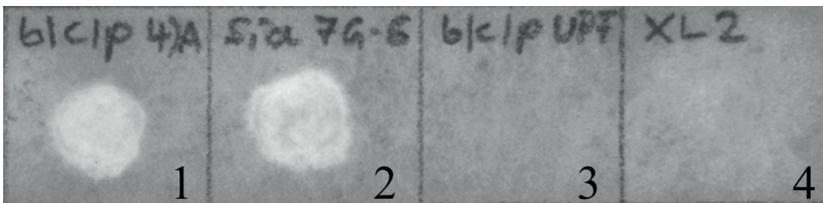


Abb. 5.16.: MUAN-Filterpapier-Test mit *T. bonasi*-Klonen unterschiedlicher Leseraster

Feld	Klon/ Zellen
1	Plasmidklon bon/cos6A/pJET4A (Positivkontrolle)
2	Plasmidklon Sia 7G-6 (ORF „bon-NEU“)
3	Plasmidklon b/c/pUPF 3 (ORF „bon-UPF“)
4	<i>E.coli</i> XL2 Ultrakompetente Zellen (Negativkontrolle)

Der Klon mit dem *T. bonasi*-Neuraminidase-Gen (Sia 7G-6; ohne ORF für UPF; Abb. 5.16., Nr. 2) erwies sich als Neuraminidase-positiv, wohingegen der Klon mit dem *T. bonasi*-UPF-Gen (b/c/pUPF 3; Abb. 5.16., Nr. 3) keine Neuraminidase-Aktivität zeigte. Somit wurde nachgewiesen, dass das *T. bonasi*-Neuraminidase-Gen (ORF Neuraminidase) für eine eigenständig funktionsfähige Neuraminidase kodiert und dass das *T. bonasi*-„UPF-ähnliche Protein“ keine Neuraminidase-Aktivität besitzt.

5.2. Hämolyisin

5.2.1. Hämolyse von *Trueperella bonasi* DSM 17163 und *Trueperella bialowiezensis* DSM 17162 auf Tierblut-Agarplatten

Trueperella bonasi DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 wurden bislang nur von Wisenten isoliert. Deshalb sollte die Anzucht dieser Bakterien auf 5% Wisentblut-Agarplatten zeigen, ob die Hämolyse von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 auf Wisentblut-Agarplatten im Vergleich zum Wachstum auf Schaf-, Ziegen-, Rinder-, Pferde- oder Kaninchenblut-Agarplatten ausgeprägter ist. Beide Bakterienspezies bildeten auf Wisent- und Schafblut feine, 1 mm breite, und entgegen der Beobachtung von Lehnen (2005) nicht durchweg vollständige Hämolysezonen aus. Auf Rinder-, Pferde- und Kaninchenblut-Agarplatten waren nur sehr feine Zonen unvollständiger Hämolyse von bis zu 0,5 mm Breite feststellbar (Abb. 5.17.). Nur auf Ziegenblut wurde eine deutliche Zone vollständiger Hämolyse von 1-2 mm Breite beobachtet (Abb. 5.17.). Bei *T. bialowiezensis* DSM 17162 war die Hämolyse nach 48 h (Abb. 5.18.) und bei *T. bonasi* DSM 17163 nach 72 h Bebrütung bei 37°C deutlich erkennbar. Entgegen früheren Aussagen (Lehnen, 2005) lassen sich beide Spezies demnach anhand ihres Wachstumsverhaltens voneinander unterscheiden.

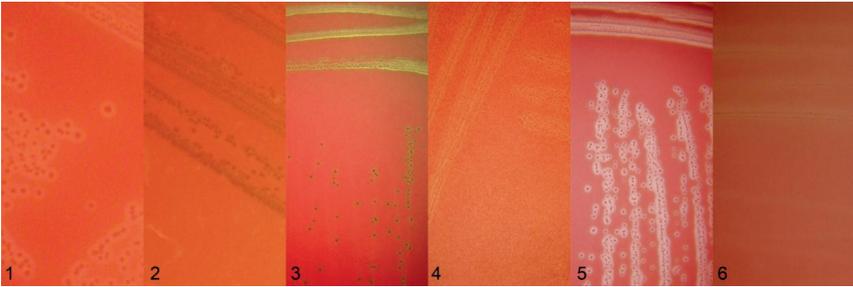


Abb. 5.17.: Hämolyse von *T. bialowiezensis* DSM 17162 auf unterschiedlichen Tierblutagarplatten nach 48 h Inkubation bei 37°C. 1= Wisent, 2 = Rind, 3 = Schaf, 4 = Pferd, 5 = Ziege, 6 = Kaninchen

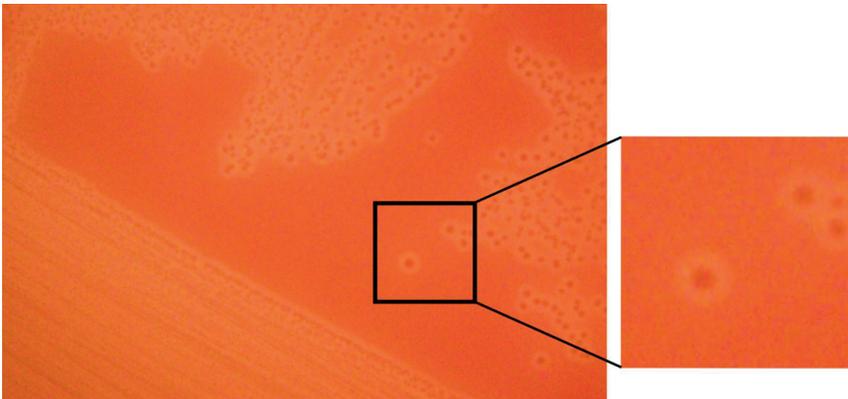


Abb. 5.18.: *T. bialowiezensis* DSM 17162 auf Wisentblut-Agarplatte nach 48 h bei 37°C

Verglichen mit der Größe der Hämolysehöfe von *T. pyogenes* DSM 20630 und *A. haemolyticum* DSM 20595 auf Wisentblut- und Schafblut-Agarplatten waren die Höfe von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 wesentlich schmaler, aber – insbesondere auf Ziegenblut-Agarplatten – dennoch deutlich erkennbar (siehe Abb. 5.17. und 5.19.). Es bestand deshalb hinreichender Verdacht auf das Vorhandensein eines Hämolysefaktors bei beiden Bakterienspezies.

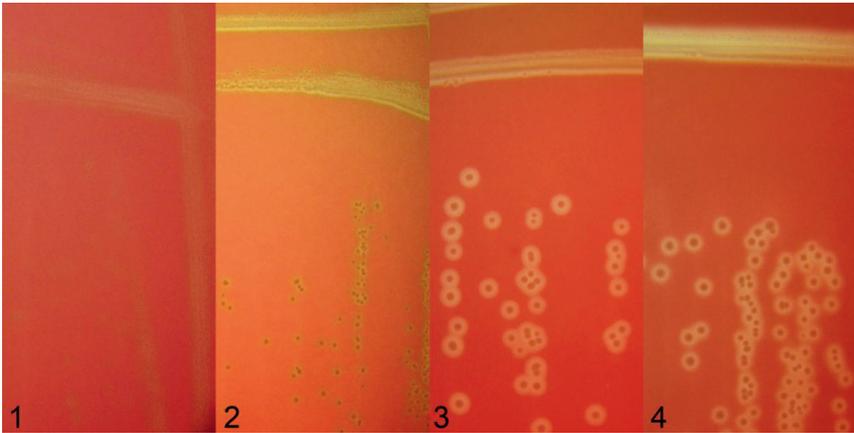


Abb. 5.19.: Hämolyse von *T. bonasi* DSM 17163 (1) und *T. bialowiezensis* DSM 17162 (2) nach 48-stündiger Bebrütung sowie *T. pyogenes* DSM 20630 (3) und *A. haemolyticum* DSM 20595 (4) nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C auf Columbia-Schafblutagar.

5.2.2. Hämolyseaktivität-Assay

Um zu klären, ob a) für die hämolytische Aktivität der untersuchten Bakterienspezies zwingend Gesamtblut erforderlich ist oder aufgereinigte Erythrozyten ausreichend sind, und um b) eine eventuell wirtsartübergreifende Spezifität der vermuteten hämolytischen Faktoren zu untersuchen, wurde der Hämolyseaktivität-Assay durchgeführt. Hierfür wurden a) Schaf-Erythrozyten gewählt, da deren Eignung als geeignetes Substitut für Wisentblut bereits gezeigt worden war (Lehnen, 2005), sowie b) Blut von Pferden, die als Art der Ordnung Perissodactyla als nicht mit dem Wisent (Ordnung Artiodactyla) verwandt gelten.

Nach achtstündiger Inkubation bei 37°C (Abb. 5.20.) war deutlich zu erkennen, dass die in der Suspension befindlichen Schaf- und Pferde-Erythrozyten von *T. pyogenes* DSM 20630 (Positivkontrolle) lysiert worden waren (Einheitliche Trübung der Flüssigkeit), während *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 der Negativkontrolle glichen. Die alleinige Anwesenheit von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 führte zu keiner Lyse der Zellen und es kam zum Absinken der Erythrozyten und zur Knopfbildung am Gefäßboden. Eine verlängerte Inkubation auf bis zu 48 h änderte dieses Ergebnis nicht. Die auffallende, milchige Trübung der *T. bonasi* DSM 17163- und *T. bialowiezensis* DSM 17162-

Suspensionen ist möglicherweise auf von den Bakterien abgesonderte Stoffe oder die Anwesenheit von Erythrozytentrümmern zurückzuführen.

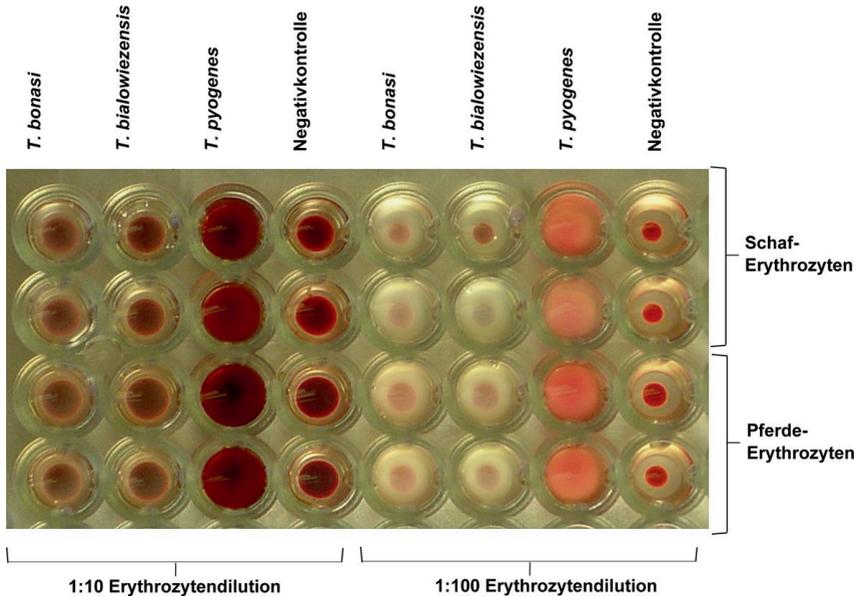


Abb. 5.20.: Hämolyseaktivität-Assay nach 8 Stunden bei 37°C

5.2.3. DotBlot und Southern Blot-Hybridisierungen

Die DotBlot-Technik (4.2.11.3.) ist eine molekulargenetische Methode, die sich zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen sowie zur Identifizierung und Analyse von Proteinen eignet. Im Gegensatz zum Southern Blot (4.2.11.2.) wird die verwendete DNA jedoch nicht mittels Agarosegelelektrophorese chromatographisch aufgetrennt und nach Größe der Fragmente selektiert, sondern direkt auf eine geeignete Membran aufgetragen. Nach dem Transfer auf die Membran wird die zu untersuchende DNA bei beiden Blotting-Techniken mit der gewünschten Probe hybridisiert. Das Ergebnis ist als Farbreaktion sichtbar.

5.2.3.1. DotBlot Hybridisierung

DotBlot-Hybridisierungen mit genomischer Bakterien-DNA und spezifischer Arcanolsin (*aln*; 281 bp) bzw. Pyolysin-Sonde (*plo*; 272 bp) sollten zeigen, ob die für die Hämolyse verantwortlichen Faktoren von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162

Nukleotidsequenz-Ähnlichkeiten mit den *A. haemolyticum-ahn* und *T. pyogenes-plo* Genen haben. Die Ergebnisse des DotBlots zeigten, dass das vermutete Hämolysin-Gen von *T. bonasi* etwa den gleichen Grad an Nukleotidsequenz-Übereinstimmung mit *T. pyogenes* und *A. haemolyticum* hat, wie *A. haemolyticum* und *T. pyogenes* untereinander. Bei *A. haemolyticum* und *T. pyogenes* beträgt diese lediglich 67% („BLAST“ Vergleich). Die Reaktion in der DotBlot Hybridisierung von *T. bialowiezensis* war weniger ausgeprägt als die von *T. bonasi* (Abb. 5.21). Bei beiden Bakterien waren positive Reaktionen nur bis zu einer Verdünnung von 1:100 erkennbar, während die jeweilige Positivkontrolle bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:200 mit der Sonde reagierte. Die mitgeführten Kontrollen (*E. coli* und Aqua dest.) waren bei beiden DotBlots negativ.

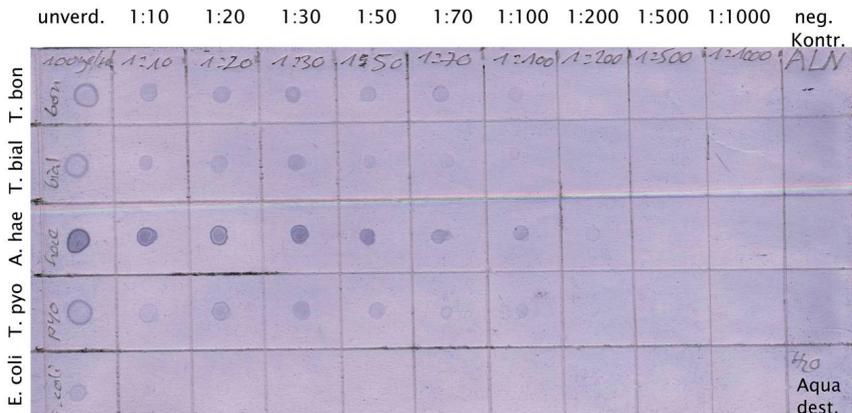


Abb. 5.21. (a) DotBlot-Verdünnungsreihe mit Arcanolysin- (*aln*-) Sonde. Für die DotBlots wurde genomische Bakterien-DNA der Konzentration von 100 ng/μl (Ausgangskonzentration) verwendet, die schrittweise verdünnt wurde (Verdünnungsfaktor 1:10; 1:20; 1:30; 1:50; 1:70; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1000). Abkürzung der Bakterien-Spezies: *E. coli* = *Escherichia coli*; *T. pyo* = *T. pyogenes* DSM 20630; *A. hae* = *A. haemolyticum* DSM 20595; *T. bial* = *T. bialowiezensis* DSM 17162; *T. bon* = *T. bonasi* DSM 17163; unverd. = unverdünnt; neg. Kontr. = Negativkontrolle (Aqua dest.)

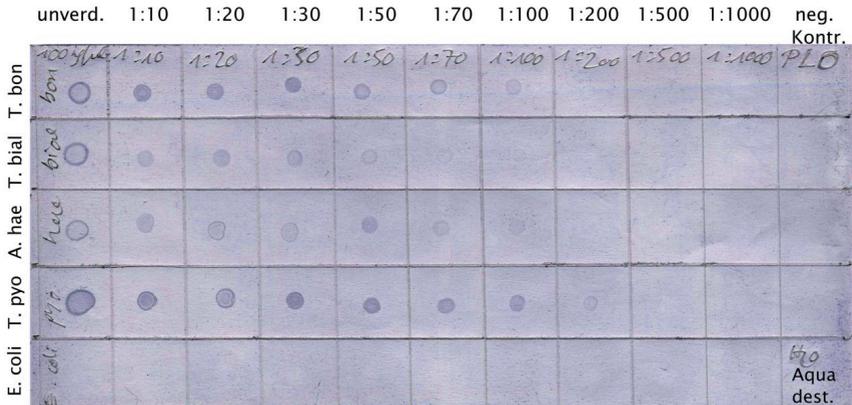


Abb. 5.21. (b): DotBlot-Verdünnungsreihe mit Pyolysin- (*pl*-) Sonde (b). Für die DotBlots wurde genomische Bakterien-DNA der Konzentration von 100 ng/µl (Ausgangskonzentration) verwendet, die schrittweise verdünnt wurde (Verdünnungsfaktor 1:10; 1:20; 1:30; 1:50; 1:70; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1000). Abkürzung der Bakterien-Spezies: *E. coli* = *Escherichia coli*; *T. pyo* = *T. pyogenes* DSM 20630; *A. hae* = *A. haemolyticum* DSM 20595; *T. bial* = *T. bialowiezensis* DSM 17162; *T. bon* = *T. bonasi* DSM 17163; unverd. = unverdünnt; neg. Kontr. = Negativkontrolle (Aqua dest.)

Um die Spezifität dieser Ergebnisse zu überprüfen, wurden mit derselben bakteriellen Ausgangs-DNA sowie denselben *aln*- und *pl*-spezifischen Sonden Southern Blots durchgeführt (siehe 5.2.4.2.).

5.2.3.2. Southern Blotting

Restriktionsenzymatisch aufgetrennte *T. bonasi* DSM 17163- als auch *T. bialowiezensis* DSM 17162-DNA zeigte im Southern Blot mit unterschiedlichen *aln*- (exemplarisch dargestellt am Beispiel von Abb. 5.22.) bzw. mit *pl*-Sonden keine Farbreaktion. Die jeweiligen Positivkontrollen – genomische *A. haemolyticum* DSM 20595- bzw. *T. pyogenes* DSM 20630-DNA sowie die *aln*- bzw. *pl*-Sonde – färbten sich dagegen deutlich blau. Da die genomische DNA in eine Vielzahl einzelner Fragmente aufgetrennt wird, ist die Gefahr einer unspezifischen Bindung von DNA mit der Sonde beim Southern Blot-Verfahren wesentlich geringer als beim DotBlot, bei dem genomische Gesamt-DNA zum Einsatz kommt.

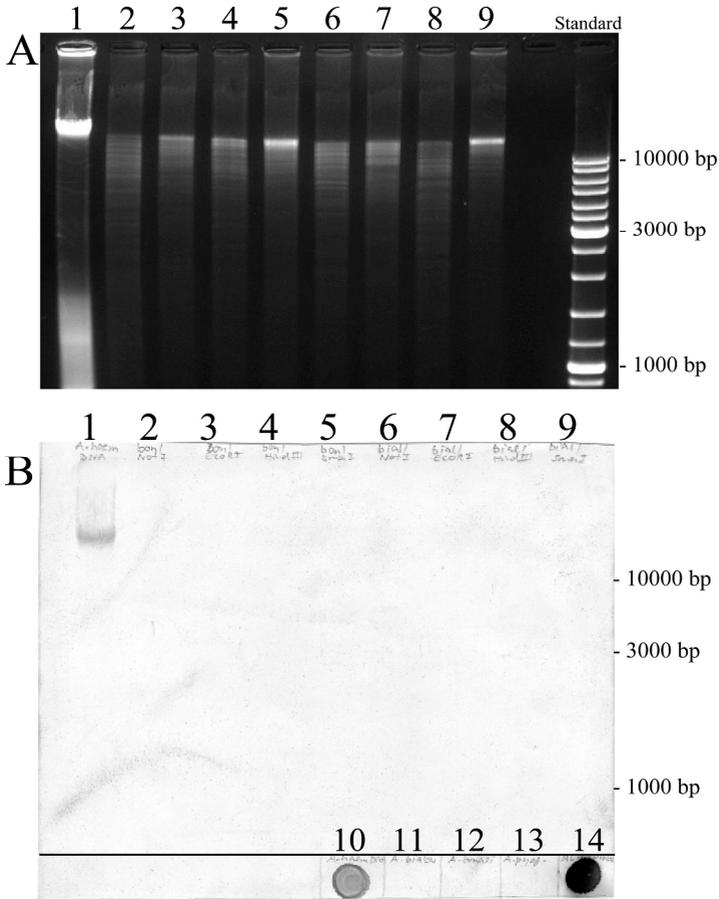


Abb. 5.22.: A = Restriktionsenzymverdauer genomischer *T. bonasi* DSM 17163- und *T. bialowiezensis* DSM 17162-DNA. Die Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese für den Einsatz im Southern Blot aufgetrennt. B = Southern Blot mit *T. bonasi* DSM 17163, *T. bialowiezensis* DSM 17162 und ALN-Sonde. Positivkontrolle = genomische *A. haemolyticum* DSM 20595-DNA

Bahn	Bakterien-DNA (o.g. Typstämme)/ Restriktionsenzym
1	genomische <i>A. haemolyticum</i> -DNA/ -
2	<i>T. bonasi</i> / <i>Not</i> I
3	<i>T. bonasi</i> / <i>Eco</i> R I
4	<i>T. bonasi</i> / <i>Hind</i> III

Bahn	Bakterien-DNA (o.g. Typstämme)/ Restriktionsenzym
5	<i>T. bonasi</i> / <i>Sma</i> I
6	<i>T. bialowiezensis</i> / <i>Not</i> I
7	<i>T. bialowiezensis</i> / <i>Eco</i> R I
8	<i>T. bialowiezensis</i> / <i>Hind</i> III
9	<i>T. bialowiezensis</i> / <i>Sma</i> I
10	genomische <i>A. haemolyticum</i> -DNA/ -
11	genomische <i>T. bialowiezensis</i> -DNA/ -
12	genomische <i>T. bonasi</i> -DNA/ -
13	genomische <i>T. pyogenes</i> -DNA/ -
14	ALN-Sonde7/ -

5.2.4. PCR

5.2.4.1. Spezifische PCR mit *aln*- und *plo*-Primern

Unter Verwendung von jeweils zwei *plo*- bzw. *aln*-spezifischen Primerpaaren (siehe 4.2.10.) wurden Standard-PCR-Reaktionen mit genomischer *T. bonasi* DSM 17163- und *T. bialowiezensis* DSM 17162-DNA durchgeführt. Als Positivkontrolle diente genomische *T. pyogenes* DSM 20630-DNA und *A. haemolyticum* DSM 20595-DNA. Die Längen der erwarteten Fragmente betragen für Primerpaar PLO_1 1329 bp, für Primerpaar PLO_2 964 bp, für Primerpaar ALN_1 1385 bp und für Primerpaar ALN_2 784 bp. In Abbildung 5.23. sind die Ergebnisse der PCR dargestellt. Weder für *T. bonasi* noch für *T. bialowiezensis* konnten Amplifikate mit *plo*- und *aln*-spezifischen Primern erzielt werden. Die Positivkontrollen ergaben dagegen durchweg spezifische Amplifikate in den erwarteten Größen (Abb. 5.23.).

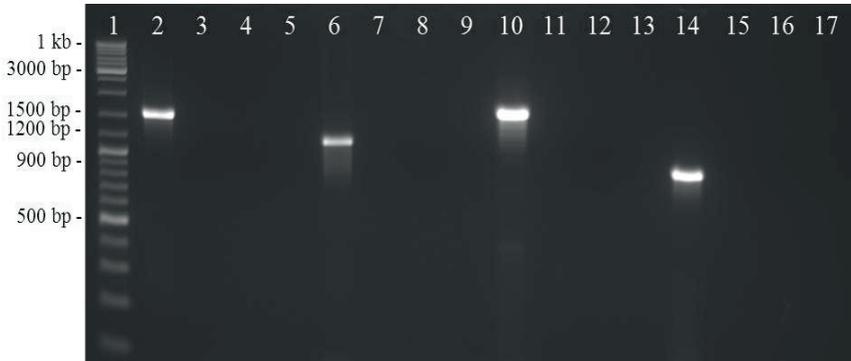


Abb. 5.23.: Standard-PCR (Long PCR) mit jeweils spezifischen *plo*- und *aln*-Primern

Bahn	DNA/ Primer-Paar
1	Standard (Ladder Mix, Fermentas)
2	<i>T. pyogenes</i> DSM 20630/ Primer PLO_1
3	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ Primer PLO_1
4	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ Primer PLO_1
5	Negativkontrolle
6	<i>T. pyogenes</i> DSM 20630/ Primer PLO_2
7	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ Primer PLO_2
8	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ Primer PLO_2
9	Negativkontrolle
10	<i>A. haemolyticum</i> DSM 20595/ Primer ALN_1
11	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ Primer ALN_1
12	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ Primer ALN_1
13	Negativkontrolle
14	<i>A. haemolyticum</i> DSM 20595/ Primer ALN_2
15	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ Primer ALN_2
16	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ Primer ALN_2
17	Negativkontrolle

5.2.4.2. Uneven PCR

Alle bekannten Cholesterol-abhängigen Zytolysine verfügen über eine für diese Gruppe spezifische konservierte Region (Tweten, 2005). Die Methode der „Uneven PCR“ (Chen und Wu, 1997) wurde angewendet, um bei *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis*

DSM 17162 Nukleotidsequenzen detektieren zu können, die Übereinstimmungen mit der konservierten Region des *aln*-Gens von *A. haemolyticum* oder des *plo*-Gens von *T. pyogenes* aufweisen. Hierfür wurden PCR-Fragmente mithilfe eines spezifischen und eines unspezifischen Primers (10-mer) amplifiziert. Insgesamt wurden acht spezifische Primer, die aus den konservierten Regionen der Hämolysin-Gene von *T. pyogenes* bzw. *A. haemolyticum* abgeleitet wurden, mit insgesamt zehn unspezifischen Primern in allen möglichen Kombinationen eingesetzt ($n = 2 \times 160$ RCR-Reaktionen). Da 10-merer potentiell mehr Bindungsstellen haben als längere Primer, wurden sie in Kontroll-PCRs auch einzeln (d.h. ohne zweiten Primer) eingesetzt. Nachdem festgestellt wurde, dass sie bei alleiniger Verwendung keine Banden produzieren, konnten sie in der eigentlichen „Uneven PCR“ eingesetzt werden. In jeder PCR wurden multiple Fragmente (siehe Beispiele in den Abb. 5.24. und 5.25.) amplifiziert, von denen insgesamt 15 Fragmente im Bereich von etwa 450 - 550 bp Länge gewählt wurden. Diese wurden nach wiederholtem Einsatz in die PCR reamplifiziert (siehe Beispiele in den Abb. 5.26. A-F) und, falls Einzelbanden zu sehen waren, im Anschluss sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit *aln*- und *plo*-Gensequenzen in der GenBank verglichen. In keinem Fall wurden Übereinstimmungen der *T. bonasi* DSM 17163- und *T. bialowiezensis* DSM 17162-Sequenzen mit den Vergleichssequenzen in der GenBank festgestellt.

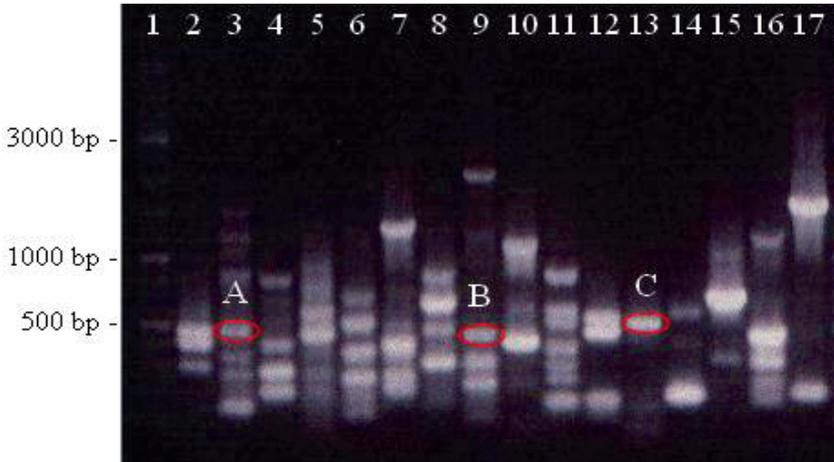


Abb. 5.24.: Uneven PCR mit *T. bonasi* DSM 17163 im Einsatz mit wechselnden spezifischen Primern und dem unspezifischen Primer „10-mer 1“. Die markierten Fragmente (A-C) wurden ausgeschnitten und reamplifiziert (siehe Abb. 5.26.).

Bahn	DNA/ Primer-Paar
1	Standard (Ladder Mix, Fermentas)
2	<i>T. bonasi</i> / DSM 17163 10-mer 1 + Pyo_2F
3	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 1 + Pyo_ECT_F
4	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 1 + Pyo_2R
5	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 1 + Pyo_AF
6	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 1 + Pyo_AR
7	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 1 + Pyo_BR
8	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 1 + Alv_AF
9	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 1 + Alv_AR
10	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 2 + Pyo_2F
11	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 2 + Pyo_ECT_F
12	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 2 + Pyo_2R
13	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 2 + Pyo_AF
14	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 2 + Pyo_AR
15	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 2 + Pyo_BR
16	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 2 + Alv_AF
17	<i>T. bonasi</i> DSM 17163/ 10-mer 2 + Alv_AR



Abb. 5.25.: Uneven PCR mit *T. bialowiezensis* DSM 17162 im Einsatz mit wechselnden spezifischen Primern und dem unspezifischen Primer „10-mer 1“. Die markierten Fragmente (D-F) wurden ausgeschnitten und reamplifiziert (siehe Abb. 5.26.).

Bahn	DNA/ Primer-Paar
18	Standard (Ladder Mix, Fermentas)
19	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 1 + Pyo_2F
20	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 1 + Pyo_ECT_F
21	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 1 + Pyo_2R
22	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 1 + Pyo_AF
23	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 1 + Pyo_AR
24	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 1 + Pyo_BR
25	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 1 + Alv_AF
26	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 1 + Alv_AR
27	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 2 + Pyo_2F
28	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 2 + Pyo_ECT_F
29	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 2 + Pyo_2R
30	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 2 + Pyo_AF
31	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 2 + Pyo_AR
32	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 2 + Pyo_BR
33	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 2 + Alv_AF
34	<i>T. bialowiezensis</i> DSM 17162/ 10-mer 2 + Alv_AR
35	Positivkontrolle (<i>T. pyogenes</i> + Pyo_2F + Pyo_AR)
36	Negativkontrolle (Pyo_2F + 10-mer 1)



Abb. 5.26.: Reamplifizierte DNA-Fragmente aus Abbildung 5.24. und 5.25. (rot markierte Banden A-F). Die Banden C, D und E wurden sequenziert und mit den Nukleotidsequenzen des *aln*- und *plo*-Gens verglichen. Hierbei konnten keinerlei Nukleotidsequenz-Übereinstimmungen festgestellt werden.

Bahn	DNA/ Primer-Paar	Bahn	DNA/ Primer-Paar
37	Standard (Ladder Mix, Fermentas)	E	Bande E aus Abb. 5.25., Bahn 26
A	Bande A aus Abb. 5.24., Bahn 3	F	Bande F aus Abb. 5.25., Bahn 30
B	Bande B aus Abb. 5.24., Bahn 9	38	Positivkontrolle (<i>T. pyogenes</i> DSM 20630 + Pyo_2F + Pyo_AR)
C	Bande C aus Abb. 5.24., Bahn 13	39	Negativkontrolle (Pyo_2F + 10-mer 1)
D	Bande D aus Abb. 5.25., Bahn 25	40	Standard (Ladder Mix, Fermentas)

Die bisherigen Ergebnisse ließen annehmen, dass sich die Hämolyse verursachenden Faktoren bei *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 stärker von *A. haemolyticum* (*aln*) und *T. pyogenes* (*plo*) unterscheiden, als ursprünglich vermutet. Mit dem folgenden Ansatz sollte geprüft werden, ob *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 einen hämolytischen Faktor besitzen, der nicht wie bei *A. haemolyticum* und *T. pyogenes* in die Gruppe der Cholesterol-abhängigen Zytolysine einzuordnen ist.

5.2.5. Screening der Cosmid-Bibliotheken auf Selektivplatten, Subklonierung in Plasmidvektor pJET 1.2. und Sequenzierung

Die *T. bonasi* (DSM 17163)- und die *T. bialowiezensis* (DSM 17162)-Cosmid-Bibliotheken bestanden aus jeweils 8×10^3 Kolonien/Bibliothek mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 32.500 bp/Kolonie (siehe 4.2.5.6). Vergleicht man diese Zahl ($2,6 \times 10^8$ bp) mit der Genomgröße von *A. haemolyticum* (1.986.154 bp; Yasawong et al., 2010), würde dies einer

etwa 131-fachen Abdeckung entsprechen. Geht man bei *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* von einer ähnlichen Genomgröße aus, müsste die Abdeckung ausreichend für das Auffinden des Hämolyse-Gens sein. Das Screening der kompletten *T. bonasi*- und *T. bialowiezensis*-Cosmid-Bibliotheken auf ampicillinhaltigen LB-Wisentblut-Platten ergab insgesamt 160 hämolysierende *T. bonasi*- und *T. bialowiezensis*-Klone. Aus den acht am stärksten hämolysierenden Klonen (siehe Abb. 5.27.) wurde das Cosmid extrahiert und mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* I verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden in den Plasmid-Vektor pJET 1.2. subkloniert und im Anschluss erneut auf ampicillinhaltigen LB-Wisentblut-Platten auf Hämolyse untersucht. Etwa 60% der insgesamt $1,6 \times 10^4$ Subklone verursachten eine Hämolyse. Dieser Befund bestätigte die Grundannahme, dass diese Klone Inserts mit einem hämolytischen Faktor aufgenommen hatten. Die Sequenzierung der Inserts von 12 hämolysierenden Sub-Klonen (Klone bon/c/p 1)H, 1)K, 1)M, 2)A, 3)B und bial/c/p 1)A, 1)J, 2)C, 2)I, 2)J, 3)B, 3)D) ergab jedoch keine vollständigen Gene. Bei der „BLAST“-Suche (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) konnte keine Ähnlichkeit der erhaltenen Sequenzen (Daten nicht gezeigt) zu den wenigen Sequenzen bisher bekannter Hämolysin-Gene festgestellt werden. Auch zu anderen bekannten Genen waren keine Ähnlichkeiten feststellbar.

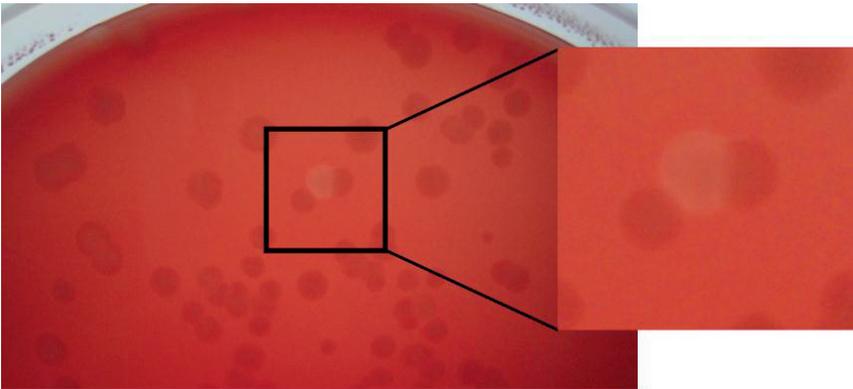


Abb. 5.27.: Hämolysierender Klon aus der Cosmid-Bibliothek von *T. bialowiezensis* DSM 17162 auf einer ampicillinhaltigen LB-Wisentblut-Platte nach 24 h bei 37°C.

Parallel zu jeder Klonierung wurden Negativkontrollen mit kompetenten Zellen (Cosmidklonierung: *E.coli* XL1-Blue MR Superkompetente Zellen, Agilent Technologies; Plasmidklonierung: XL2-Blue MRF' Ultrakompetente Zellen, Agilent Technologies) auf LB-

Wisentblut-Platten mitgeführt. Hierbei fiel auf, dass vereinzelte Kolonien hämolytische Eigenschaften besaßen. Zur Überprüfung wurden einige dieser hämolysierenden Kolonien probeweise einer Insert-Extraktion und Ansequenzierung unterzogen. Alle untersuchten Klone waren jedoch erwartungsgemäß Insert-frei. Dieser Befund ließ vermuten, dass die bei den Cosmid- und Plasmid-Klonen beobachtete Hämolyse nicht auf ein Insert zurückzuführen war, sondern eine andere Ursache hatte. Um zu überprüfen, ob diese Befunde auf unbekannte Eigenschaften des Wisentblutes zurückzuführen waren, wurden verschiedene kompetente Zellen des Herstellers (Agilent Technologies) auf Agarplatten mit Blut unterschiedlicher Tierarten angezüchtet und auf ihr hämolytisches Verhalten hin untersucht. Rinder- und Schafblut wurden gewählt, da diese Blutsorten als leicht zugänglicher Ersatz für Wisentblut verwendet werden können. Darüber hinaus wurde Ziegenblut (Wiederkäuer) und Kaninchen- und Pferdeblut (Nicht-Wiederkäuer) gewählt. Die Hämolyse der Cosmid- und Plasmid-Klone beruhte auf der Tatsache, dass sowohl die kompetenten Host-Zellen der Cosmid-Bibliotheken (XL1-Blue MR-Zellen, Agilent Technologies) als auch die kompetenten Host-Zellen der Plasmid-Klone (XL2-Blue MRF'-Zellen, Tetrazyklin- und Chloramphenicol-resistent, Agilent Technologies) auf LB-Platten jeweils mit Wisent-, Rinder-, Pferde- und Schafblut eine Hämolyse ausbildeten (Tabelle 5.1.). Auf LB-Agarplatten mit Kaninchen- oder Ziegenblut erzeugten die eingesetzten *E. coli*-Zellen dagegen keine Hämolyse. Die zur Kontrolle mitgeführten XL1-Blue Superkompetente MRF'-Zellen (Tetrazyklin-resistent, Agilent Technologies) dagegen waren auf keiner der getesteten Blutplatten zur Ausbildung von Hämolyse in der Lage. Weshalb zwei der drei untersuchten Zelllinien – zumindest auf drei der sechs getesteten Blutarten – hämolytische Eigenschaften besaßen, konnte nicht geklärt werden.

Tab. 5.1.: Hämolyse verschiedener kompetenter Zellen auf LB-Agarplatten mit unterschiedlichen Blutzusätzen.

+ = 2-5% der Kolonien hämolysierend; ++ = 50-70% der Kolonien hämolysierend; - = keine Hämolyse

Zelllinie	Hämolyse auf LB-Blutplatten mit Wisentblut/ Rinderblut/ Pferdeblut/ Schafblut	Hämolyse auf LB-Blutplatten mit Ziegenblut/ Kaninchenblut
<i>E. coli</i> XL1-Blue MR-Zellen	+	-
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'-Zellen	-	-
<i>E. coli</i> XL1-Blue Ultrakompetente Zellen	++	-

Weitere Versuche mit auf LB-Wisentblut-Platten hämolysierenden und nicht-hämolysierenden Cosmid- und Plasmid-Klonen beider Bibliotheken auf den in Tabelle 5.1. genannten LB-Blutagarplatten zeigten, dass sich die Plasmid- und Cosmid-Klone auf den dort genannten Blutarten so verhielten, wie die plasmid- bzw. cosmidfreien kompetenten Zellen, die zu ihrer Klonierung verwendet wurden: auf Wisent-, Rinder-, Pferde- und Schafblutplatten hämolysierten die Klone; auf Ziegen- und Kaninchenblutplatten war keine Hämolyseaktivität zu vermerken (Tabelle 5.2.).

Tabelle 5.2.: Hämolyse verschiedener Klone auf unterschiedlichen LB-Blutplatten (+ = Hämolyse; - = keine Hämolyse)

Klon	Hämolyse auf LB-Agarplatten mit Wisentblut/ Rinderblut/ Pferdeblut/ Schafblut	Hämolyse auf LB-Agarplatten mit Ziegenblut/ Kaninchenblut
hämolytischer Cosmid-Klon	+	-
nicht-hämolytischer Cosmid-Klon	-	-
hämolytischer Plasmid-Klon	+	-
nicht-hämolytischer Plasmid-Klon	-	-

Das Screening der kompletten *T. bonasi* DSM 17163- und *T. bialowiezensis* DSM 17162-Bibliotheken auf Rinder-, Schaf-, Ziegen-, Kaninchen- und Pferdeblutplatten ergab das gleiche Ergebnis. Wie auf den Wisentblutplatten auch, fanden sich auf allen Rinder, Pferde- und Schafblutplatten hämolysierende Klone, während kein einziger Cosmid-Klon auf Kaninchen- oder Ziegenblutplatten eine Hämolysezone ausbildete. Dies zeigt, dass die Hämolyse der Klone auf die hämolysierenden Eigenschaften der kompetenten Zellen auf den o.g. Blutagarplatten zurückzuführen war und nicht wie ursprünglich erwartet auf die Eigenschaften der Inserts. Da sowohl *T. bonasi* DSM 17163 als auch *T. bialowiezensis* DSM 17162 (Abb. 5.17., Nr. 5.) eine deutliche Hämolysezone auf Ziegenblutplatten ausbilden, jedoch keiner der Cosmid-Klone auf Ziegenblutplatten hämolysierte (siehe Abb. 28. = *T. bialowiezensis*-Cosmidklone auf Ampicillin-haltiger Ziegenblutplatte) kann davon ausgegangen werden, dass die hämolysierenden Faktoren von den beiden Cosmidbibliotheken nicht abgedeckt wurden.

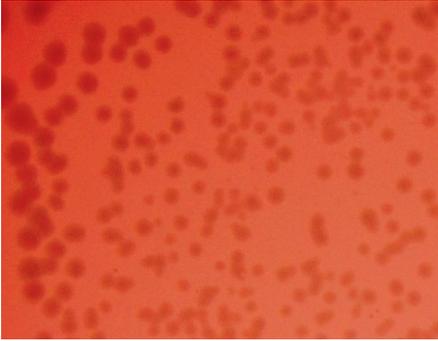


Abb. 5.28.: Klone der *T. bialowiezensis*-Cosmid-Bibliothek auf Ampicillin-haltiger Ziegenblut-Agarplatte.

5.3. Phospholipase D

Die Phospholipasen D (2.3.3. und 6.5.) gehören zur Gruppe der Membranlipide, die bei diversen Gram-positiven Bakterien (u.a. *A. haemolyticum*) als Pathogenitätsfaktoren wirken (Cuevas und Songer, 1993; Lee und Lynch, 2005). Um ihre Aktivität *in vitro* nachzuweisen, macht man sich ihre synergistische Hämolysewirkung mit dem von *Rhodococcus equi* gebildeten „Equi Faktor“ zunutze – auf rinderbluthaltigen Agarplatten (5% Blut) erzeugen PLD-positive Bakterien einen breiten Hämolysehof, der bei PLD-freien Spezies fehlt (Lucas, 2009).

5.3.1. DotBlot Hybridisierung

In DotBlot Hybridisierungen mit genomischer Bakterien-DNA und spezifischer PLD-Sonde (275 bp) sollte untersucht werden, ob Nukleotidsequenz-Ähnlichkeiten zwischen *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 und der *A. haemolyticum*-PLD bestehen. Sowohl *T. bonasi* DSM 17163 als auch *T. bialowiezensis* DSM 17162 produzierten im Verlauf der Verdünnungsreihe nur sehr schwache Signale bis zur Verdünnungsstufe von 1:70, die mit denen von *T. pyogenes* DSM 20630 vergleichbar sind. Die Positivkontrolle (*A. haemolyticum* DSM 20595) zeigte dagegen das erwartete deutlich positive Ergebnis mit starken Farbreaktionen bis zur Verdünnungsstufe 1:100. Da von *T. pyogenes* bislang keine PLD-Aktivität beschrieben ist, ist das Ergebnis des DotBlots sowohl für *T. pyogenes* DSM 20630, *T. bonasi* DSM 17163 als auch für *T. bialowiezensis* DSM 17162 als negativ zu beurteilen. Somit kann die schwach positive Farbreaktion von *T. pyogenes* DSM 20630, *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 auf möglicherweise unspezifische

Bindungen zurückgeführt werden. Beide Kontrollen (*E. coli*-DNA und Aqua dest.) waren negativ (Abb. 5.29.).

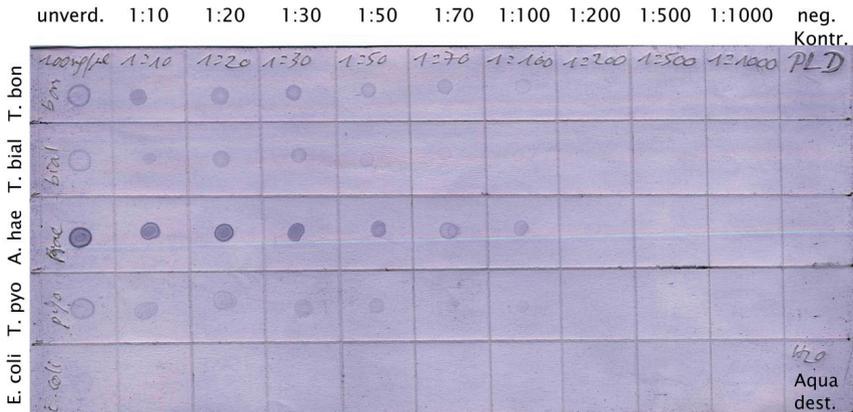


Abb. 5.29.: DotBlot-Verdünnungsreihe mit Phospholipase D (*pld*-) Sonde

Die Ausgangskonzentration der im DotBlot verwendeten genomischen Bakterien-DNA betrug 100ng/µl. Die DNA wurde gemäß Beschriftung schrittweise verdünnt (Verdünnungsfaktor 1:10; 1:20; 1:30; 1:50; 1:70; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1000). Abkürzungen: *E. coli* = *Escherichia coli*; *T. pyo* = *T. pyogenes* DSM 20630; *A. hae* = *A. haemolyticum* DSM 20595; *T. bial* = *T. bialowiezensis* DSM 17162; *T. bon* = *T. bonasi* DSM 17163; unverd. = unverdünnt; neg. Kontr. = Negativkontrolle (Aqua dest.)

5.3.2. Spezifische PCR

Die Standard-PCR mit *A. haemolyticum*-PLD-spezifischen Primern ergab bei *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 keine Bande in der erwarteten Höhe (erwartete Länge = 423 bp) und somit ein negatives Ergebnis (nicht gezeigt).

5.3.3. Screening der Cosmid-Bibliotheken auf PLD-Aktivität

Beim vollständigen Screening der Cosmidbibliotheken von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 auf ampicillinhaltigen LB-Rinderblutplatten mit „Equi Faktor“-Zusatz („PLD-Platten“) traten vereinzelt hämolysierende Klone auf, die jedoch auf ampicillinhaltigen LB-Kaninchen- und Ziegenblutplatten mit „Equi Faktor“-Zusatz keine Hämolysehöfe ausbildeten (nicht gezeigt). Auch hier (vergleiche 5.2.5.) konnte das Phänomen auf die hämolysierenden Eigenschaften der kompetenten Host-Zellen der Cosmid-

Bibliotheken zurückgeführt werden Aufgrund dieser unerwarteter Ergebnisse konnte kein PLD-positiver Klon identifiziert werden.

5.4. Desoxyribonuklease

Die mit *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* verwandten Bakterien *T. pyogenes* und *A. haemolyticum* bilden DNAsen (2.3.4. und 6.6.), die möglicherweise als Virulenzfaktoren wirken (Jost und Billington, 2005; Yasawong et al., 2010).

5.4.1. Untersuchung der Cosmid-Bibliotheken auf DNase-Aktivität

Die Untersuchung von jeweils 3200 Klonen aus den genomischen Cosmid-Bibliotheken von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 auf DNase-Aktivität wurde mit Hilfe von DNase-Test-Agar-Platten durchgeführt. Bei keinem der getesteten Klone war nach Überschichtung der Test-Agar-Platte mit 1M Salzsäure eine Hofbildung um die Kolonie herum zu beobachten; alle Klone waren somit DNase-negativ. Die Positivkontrolle (*Staphylococcus aureus*) hingegen reagierte positiv.

6. Diskussion

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten potentiellen Virulenzfaktoren bei *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162, sämtliche Untersuchungsmethoden sowie die Ergebnisse aller Untersuchungen findet sich in der Einleitung von Kapitel 5. Bei *T. bonasi* konnte mit Hilfe der eigens erstellten genomischen Cosmidbibliothek eine bislang unbekannte Neuraminidase („*T. bonasi*-Neuraminidase NanH“) sowie ein weiteres Protein („*T. bonasi*-UPF-ähnliches Protein“) identifiziert werden. Bei *T. bialowiezensis* wurden keine äquivalenten Proteine gefunden, obgleich das Bakterium ebenfalls Neuraminidase-positiv ist (siehe 5.1.). Ein Hämolyysin (siehe 5.2.), eine Phospholipase D (siehe 5.3.) oder eine DNase (siehe 5.4.) konnten weder bei *T. bonasi* noch bei *T. bialowiezensis* nachgewiesen werden. Die Relevanz dieser Ergebnisse für die Beurteilung der Virulenz von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* sowie deren Bedeutung für die Balanoposthitis beim Wisent werden im Folgenden diskutiert.

6.1. Relevanz der Untersuchungen

Etwa 20% der weltweiten Wisentpopulation lebt im Nationalpark Białowieża in Polen und dem angrenzenden Waldgebiet in Weißrussland (Bunevich, 2010). Im Nationalpark auf der polnischen Seite sind ca. 6,4% der männlichen Wisente von der Balanoposthitis betroffen (Kraśnińska und Kraśniński, 2010). Dies könnte eine ernst zu nehmende Bedrohung des Bestandes darstellen, falls sich die Anzahl betroffener Tiere in Zukunft erhöht. Die erkrankten Bullen können im fortgeschrittenen Stadium der Balanoposthitis nicht mehr am Reproduktionsgeschehen teilnehmen, wodurch der ohnehin kleine genetische Pool weiter eingengt wird (Lehnen, 2005). *Trueperella bonasi* und *T. bialowiezensis* wurden als ursächliche Erreger der Balanoposthitis des Wisents diskutiert (Lehnen et al., 2006). Ausschlaggebend hierfür war die Tatsache, dass *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* in keinem Fall bei gesunden, sondern ausschließlich bei an Balanoposthitis erkrankten männlichen Wisenten bereits im frühen, klinisch unauffälligen Krankheitsstadium nachgewiesen wurden (Lehnen, 2005). Molekulargenetische Untersuchungen möglicher Virulenzfaktoren von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* lagen zu Beginn der vorliegenden Arbeit nicht vor. Ein Nachweis der ätiologischen Bedeutung und möglichen Pathogenität wäre richtungsweisend für die Auswahl der Maßnahmen zur Bekämpfung der Balanoposthitis beim Wisent und könnte zur Erhaltung der Wisentpopulationen sowohl im Nationalpark Białowieża als auch weltweit beitragen.

6.2. Studiendesign: Auswahl der Vergleichsorganismen und prinzipielle Vorgehensweise

Zu den engsten Verwandten von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* zählen neben den wenig erforschten, tierspezifischen Erregern *T. abortus*, *T. bernardiae*, *A. hippocoleae*, *A. phocae* und *A. pluranimalium* (Yassin et al., 2011) zwei weitere tier- und humanpathogene Erreger, die eindeutig mit diversen purulenten, teils nekrotischen Krankheitsprozessen der Haut, Schleimhäute und inneren Organe in Verbindung gebracht werden können: *T. pyogenes* und *A. haemolyticum* (Jost und Billington, 2005; Linder, 1997). Sowohl *T. pyogenes* als auch *A. haemolyticum* verfügen über eine Reihe von Virulenzfaktoren, die eindeutig für die Pathogenität dieser beiden Spezies verantwortlich sind (Jost und Billington, 2005; Jost und Billington, 2006; Lucas, 2009). Unter dem Begriff „bakterielle Virulenz“ werden sämtliche Faktoren zusammengefasst, die es einem Bakterium ermöglichen, Wirtszellstrukturen anzugreifen und/ oder zu zerstören. Hierzu zählen bei *T. pyogenes* und *A. haemolyticum* die hämolytischen Exotoxine der MACPF-Gruppe, eine Phospholipase D (*A. haemolyticum*), sowie zahlreiche extrazelluläre Matrix-bindende Proteine (Kollagen-, Fibrinogen- und Fibronectin-bindende Proteine), Exoenzyme (Neuraminidasen, DNAsen, Proteasen), Fimbrien und die Fähigkeit, in Makrophagen überleben zu können (*T. pyogenes*) (Jost und Billington, 2005; Lucas 2009). Da die Chance höher ist, dass verwandte Bakterien ähnliche Virulenzfaktoren aufgrund gemeinsamer Vorfahren besitzen als nicht-verwandte Bakterien, wurden bei der Suche nach *T. bonasi*- und *T. bialowiezensis*-spezifischen Virulenzfaktoren *T. pyogenes*- und *A. haemolyticum*-spezifische Virulenzfaktoren zum Vergleich herangezogen.

Vor Beginn der molekulargenetischen Untersuchungen wurde bei unterschiedlichen Bedingungen und mit diversen Flüssigmedien (LB-Medium und BHI-Medium mit/ohne Zusatz von 5-15% fötalem Kälberserum und/oder 5% Schaf-/ Rinder-/ Pferde-/ Kaninchenerythrozyten) versucht, *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 anzuzüchten, um logarithmische Wachstumskurven der Bakterien erstellen zu können (Daten nicht gezeigt). Die Versuche mussten jedoch abgebrochen werden, da die Bakteriendichte nach anfänglich sehr langsamem Wachstum am 4.-5. Tag der Inkubation bei 37°C plötzlich stagnierte und alle Bakterien abstarben. Hinzu kam, dass die für *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 in Flüssigmedium generierten Wachstumskurven nicht zuverlässig wiederholbar waren. Somit war die Aufreinigung von Proteinen aus dem

Kulturüberstand und die Analyse der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting – wie beispielsweise für die Extraktion von PLD aus *A. haemolyticum* (Cuevas und Songer, 1993) oder *Corynebacterium pseudotuberculosis*-Flüssigkulturen (Hodgson et al., 1990) beschrieben – nicht möglich. Aufgrund des langsamen und spärlichen Wachstums der untersuchten *Trueperella* spp. erschien daher die für diesen Zweck häufig eingesetzte Methode des Aufbaus genomischer Bibliotheken mit dem Einsatz anschließender phänotypischer Screeningverfahren für die Identifizierung von Virulenzfaktoren bei *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 als besser geeignet. Dieses Verfahren wurde beispielsweise zur Charakterisierung von *Helicobacter pylori*- und *Campylobacter concisus*-Hämolysegenen (Drazek et al., 1995; Istivan et al., 2008) angewendet. Da die genomischen Bibliotheken von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 zur Untersuchung einer Reihe unterschiedlicher Bioassays zur Detektion verschiedener Virulenzfaktoren eingesetzt werden sollten, fiel die Wahl auf die im Vergleich zu Bakteriophagen-Bibliotheken aufwändiger zu erstellenden Cosmid-Bibliotheken. Cosmid-Bibliotheken bieten den Vorteil, keine Plaques sondern Klone zu erhalten, die sich unbegrenzt vermehren, lagern und in Bioassays einsetzen lassen. Cuevas und Songer (1993) gelang die Identifizierung der *A. haemolyticum*-PLD mittels Cosmid-Klonierung und anschließender Subklonierung des *pld*-Gens in einen Plasmidvektor. Litwin und Johnson (2005) charakterisierten mit Hilfe einer SuperCos1-Bibliothek von *Bartonella henselae* ein Co-Hämolysin-Autotransporterprotein. Als Alternative hierzu wäre nur die wesentlich zeit- und vor allem kostenintensivere vollständige Sequenzierung der Bakteriengesamtgenome mit anschließender Identifikation aller potentieller Virulenzfaktoren in Frage gekommen, wie sie beispielsweise bei *A. haemolyticum* (Lucas, 2009) oder *Streptococcus pyogenes* durchgeführt wurde (Ferretti et al., 2001). Lucas (2009) ermittelte über diese Methode u.a. einige Abschnitte der Nukleinsäuresequenzen der *A. haemolyticum*-Neuraminidasen NanH und NanA. Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit stand die Sequenzierung der Genome von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 jedoch aus finanziellen Gründen nicht zur Verfügung.

Für die Charakterisierung von *Listeria monocytogenes*-Virulenzfaktoren dagegen wurde die Methode der Virulenzfaktoren-Analyse auf Proteom-Ebene angewandt. Hierfür wurde die gesamte Zellwandfraktion der Bakterien isoliert, die gewonnenen Oberflächenproteine angereichert und mit Hilfe zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Identifizierung der Virulenzfaktoren erfolgte im Anschluss mittels N-terminaler

Sequenzierung und Massenspektrometrie (Schaumburg, 2003). Aufgrund der mangelnden Anzuchtbarkeit im Flüssigmedium und der schlechten Lysierbarkeit der *Trueperella* spp. wurde in der vorliegenden Arbeit von dieser Methode abgesehen.

Von der Untersuchung weiterer möglicher Virulenzfaktoren, wie beispielsweise der extrazellulären Matrix-bindenden Proteine Cpa und CbpA bei *T. pyogenes* und *A. haemolyticum* (Esmay et al., 2003; Pietrocola et al., 2007; Lucas, 2009), oder Enzymen wie Esterasen/Lipasen und Nukleasen wurde abgesehen. Die Relevanz dieser Faktoren für die Virulenz der mit *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* verwandten Bakterien *T. pyogenes* und *A. haemolyticum* konnte nicht nachgewiesen werden (Lucas, 2009; Jost und Billington, 2005).

6.3. Neuraminidase-Aktivität

In der Literatur wurde eine Reihe von Assays zum Nachweis von Neuraminidase-Aktivität beschrieben. Hierzu gehören quantitative Methoden, die Aktivitätsmessung mit Enzymassays, immunochemische Assays und die Messung über chromogene, chemilumineszente oder radioisotope Reporter (Achyuthan und Achyuthan, 2001). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Gewinnung von Proteinen aus dem Kulturüberstand und deren nachfolgende Analyse mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese (Schaufuss und Lämmler, 1988). Eine relativ einfache Methode ist der Filterpapier-Fluoreszenztest, bei dem 2'-(4-Methyl-umbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminsäure (MUAN) als Substrat eingesetzt wird (Potier et al., 1979). Er gilt als die schnellste, spezifischste und daher gängigste Methode zum Nachweis von Neuraminidase-Aktivität (Myers et al., 1980; Moncla und Braham, 1989) und wurde beispielsweise für die Detektion der *Bacteroides fragilis*-Neuraminidase NanH (Thompson et al., 2009), der *Streptococcus pyogenes*-Neuraminidase NanA (Cámara et al., 1994) und dem Nachweis der Neuraminidase-Aktivität bei *Mycoplasma synoviae* (May et al., 2007) angewendet. Für die Identifikation bakterieller Neuraminidasen eignet sich die Erstellung einer Plasmid-/Cosmid-Bibliothek gut, da das Screening der Klone und Subklone auf Neuraminidase-Aktivität mittels MUAN-Filterpapier-Test effizient gestaltet werden kann. Vergleichbare Verfahren nutzen beispielsweise Vimr et al. (1988) für die Charakterisierung der *Vibrio cholerae*-Neuraminidase NanH oder Yeung und Fernandez (1991), die Neuraminidase-positive Klone ihrer genomischen *Actinomyces viscosus*-Bakteriophagen-Bibliothek selektierten, um sie in den Plasmid-Vektor pBSK+ zu subklonieren und nach erneutem MUAN-Screening zu sequenzieren. Auch die *T. pyogenes*-Neuraminidasen NanH und NanP wurden mit Hilfe von Bakteriophagen-Bibliotheken identifiziert (Jost et al., 2001; Jost et al., 2002). Sowohl

Kolonien von *T. bonasi* DSM 17163 als auch von *T. bialowiezensis* DSM 17162 erwiesen sich in dieser Arbeit im MUAN-Filterpapier-Test als Neuraminidase-positiv. Das Screening der beiden genomischen Cosmid-Bibliotheken auf Neuraminidase-Aktivität ergab jedoch, dass nur in der *T. bonasi*-Bibliothek Neuraminidase-positive Klone vorhanden waren. Trotz der Größe der Bibliotheken, die mit 8×10^3 Klonen mit je 32.500 bp/Klon das *A. haemolyticum*-Genom (Yasawong et al., 2010) etwa 131-fach abdecken würden, muss davon ausgegangen werden, dass die *T. bialowiezensis*-Bibliothek nicht das vollständige Genom des Bakteriums abdeckte oder nur Bruchstücke des Neuraminidase-kodierenden Gens enthielt. Dieses würde erklären, warum *T. bialowiezensis* DSM 17162-Kolonien Neuraminidase-positiv getestet wurden, aber kein positiver Klon detektiert wurde.

Der Leserahmen (open reading frame, ORF) für die in dieser Arbeit erstmals beschriebene *T. bonasi*-Neuraminidase („bon-NEU“, 3.312 bp) wurde zusammen mit einem weiteren ORF eines bislang unbekanntes *T. bonasi*-Gens („bon-UPF“, 1.161 bp) auf den ca. 5.000 bp langen Inserts der Plasmid-Klone bon/cos6A/pJET4A und bon/cos6A/pJET7A gefunden. Die Leserichtungen der beiden ORFs liegen einander entgegengesetzt, überschneiden sich jedoch nicht. Die Aminosäuresequenz der *T. bonasi*-Neuraminidase verfügt über 5 Kopien des bei allen bakteriellen Neuraminidasen in zwei- bis fünffacher Ausführung vorkommenden ASP-Box-Motivs (Roggentin et al., 1989; Vimr, 1994) sowie über das konservierte katalytische RIP/RLP-Motiv (Jost et al., 2002; Lucas, 2009). Zwischen den bakteriellen Neuraminidasen oder Sialidasen besteht nur eine geringe Aminosäuresequenz-Übereinstimmung von 20-30% (Vimr, 1994), was den direkten Vergleich der durchgehenden Aminosäuresequenzen mehrerer bakterieller Neuraminidasen, insbesondere in Hinsicht auf die Erstellung von Stammbäumen, erschwert. Aufgrund ihrer vergleichsweise großen sequenziellen Ähnlichkeit zur *T. pyogenes*-Neuraminidase NanH (44% Nukleinsäuresequenz-Übereinstimmung und 59% Aminosäuresequenz-Übereinstimmung) wird für die hier beschriebene *T. bonasi*-Neuraminidase die Bezeichnung „*Trueperella bonasi*-Neuraminidase NanH“ vorgeschlagen. Die Verwandtschaft mit den Neuraminidasen von *A. haemolyticum* NanH (41% Aminosäuresequenz-Übereinstimmung) und NanA (38% Aminosäuresequenz-Übereinstimmung) sowie der *A. viscosus* Sialidase (41% Aminosäuresequenz-Übereinstimmung) und *T. pyogenes* NanP (38% Aminosäuresequenz-Übereinstimmung) ist wesentlich geringer.

Die Nukleinsäuresequenz-Übereinstimmung des *T. bonasi* Neuraminidase-Gens zu *nanH* und *nanA* bei *A. haemolyticum*, *nanP* bei *T. pyogenes* und dem *A. viscosus* Sialidase-Gen betrug

hingegen nur 2-8%. In der Aminosäuresequenz der *T. pyogenes*-Neuraminidase NanH gibt es die Ankersequenz LVHTG, einen „LPXT-like cell anchor“, der bei zellwandständigen Neuraminidasen vorkommt (Jost et al., 2002; Roggentin et al., 1989; Gaskell et al., 1995). Eine derartige Ankersequenz lässt sich bei diversen Gram-positiven Bakterien finden, wie dem *Staphylococcus aureus*-Virulenzfaktor Protein A, der Wirts-Antikörper (diverse IgG) binden und sich zudem vor Phagozytose-Mechanismen des Wirtes schützen kann. Die LPXT-Region verankert Protein A in der Bakterienzellwand (Schneewind et al., 1993; Ton-That et al., 2000). Bei *Listeria monocytogenes* ist das LPXTG-Protein LapB essentiell für die Virulenz des Erregers. Es vermittelt die Adhäsion an und das Eindringen des Bakteriums in die Wirtszelle und wird nur von pathogenen *Listeria monocytogenes*-Stämmen gebildet (Reis et al., 2010). Auch die Trans-Sialidasen (TS) des parasitären Einzellers *Trypanosoma cruzi*, dem Erreger der Chagas-Krankheit, besitzen je nach Form (epimastigote/trypomastigote TS) ein bzw. drei Zellwandanker (Schenkman et al., 1994). Eine derartige Ankersequenz war bei der *T. bonasi*-Neuraminidase nicht zu finden. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die *T. bonasi*-Neuraminidase vermutlich nicht zellgebunden ist, sondern ins Extrazellulärmedium abgegeben wird.

Das neu beschriebene Neuraminidase-Protein gehört mit einer Größe von 117,80 kDa zur Gruppe der großen Neuraminidasen („large neuraminidasases“; >60 kDa) (Cámara et al., 1994; Abrashev und Dulguerova, 2000). Das ebenfalls auf den Inserts der Neuraminidase-positiven Plasmid-Klone bon/cos6A/pJET4A und bon/cos6A/pJET7A befindliche, 42,98 kDa große „UPF-ähnliche“ Protein (UPF = Unknown Protein Function) ist den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit zufolge nicht für die Ausbildung der vollen Neuraminidase-Aktivität notwendig. Für das Protein wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zu den „UPF0027/RtcB“-Proteinen der Name „*T. bonasi*-UPF-ähnliches Protein“ vorgeschlagen. Entgegen ihres Namens ist die Funktion der UPF0027/RtcB-Proteine mittlerweile bekannt – sie gehören nachweislich zur Gruppe der RNA-Ligasen (Popow et al., 2011; Tanaka et al., 2011b; Tanaka und Shuman, 2011). RNA Ligasen sind in der Lage, t-RNA und m-RNA zu reparieren und Organismen vor den schädlichen Wirkungen zytotoxischer Nukleasen von Hefen, Bakterien und höheren Lebensformen zu schützen (Tanaka und Shuman, 2011; Popow et al., 2012). Sie spielen jedoch auch eine Rolle bei der Vermehrung von Viren, Viroiden, und Viroid-ähnlicher Satelliten-RNAs bei Menschen und Pflanzen. So sind beispielsweise die RNA-Ligasen HSPC117 und DDX1 an dem Prozess der Replikation des Hepatitis-Delta-Virus mitbeteiligt. Es wird angenommen, dass ihre Anwesenheit für die Zyklisierung des viralen RNA-Genoms

erforderlich ist (Flores et al., 2011; Cao et al., 2009). Die Gruppe der RNA-Ligasen ist ungeachtet ihrer Herkunft strukturell und funktional hoch konserviert (Popow et al., 2012). Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass auch das *T. bonasi*-„UPF-ähnliche Protein“ eine Funktion im Rahmen der Vermehrung von *T. bonasi* übernimmt und somit zur Pathogenität des Bakteriums beiträgt.

Zudem weist das „*T. bonasi*-UPF-ähnliche Protein“ Übereinstimmungen mit den Proteinen der „Hint superfamily“ (Hint = Hedgehog in tein domain) auf. Enzyme der „Hint superfamily“ wurden erstmals aus *Drosophila melanogaster* isoliert und kommen bei Bakterien und einer Vielzahl von Eukaryoten vor (Bürglin, 2008). Meist handelt es sich hierbei um Proteine von 400-460 Aminosäuren Länge, deren Funktion vermutlich in der Signaltransduktion zwischen Zellen liegt. Sie setzen sich aus zwei Domänen zusammen, dem Signalmolekül „Hedge“ (HhN) sowie dem autokatalytischen, Carboxy-terminalen „Hog“-Molekül (HcH) (Echelard et al., 1993; Tabata und Kornberg, 1994; Bürglin, 2008). Ob die Proteine der „Hint superfamily“ als Virulenzfaktoren bei Bakterien eine Rolle spielen, ist gegenwärtig nicht bekannt.

6.4. Hämolyse

Lehnen et al. (2006) beschrieben die Ausbildung einer schmalen, vollständigen Hämolysezone sowohl bei *T. bonasi* DSM 17163 als auch bei *T. bialowiezensis* DSM 17162 auf Columbia-Schafblutagarplatten. Eigene Beobachtungen ergaben eine schmale Zone vollständiger Hämolyse auf Ziegenblutagarplatten, eine schwach ausgeprägte Hämolyse auf Schaf- und Wisentblutplatten sowie eine unvollständige Hämolyse auf Platten, die Rinder-, Pferde- und Kaninchenblut enthielten. Diese Ergebnisse decken sich größtenteils mit den Beobachtungen von Ülbegi (2010), die über eine schmale, teilweise unvollständige Hämolysezone der Bakterien auf Schaf- und auf Kaninchenblutagarplatten berichtet. Der Grund für diese voneinander abweichenden Ergebnisse liegt möglicherweise darin, dass Lehnen (2005) für ihre Untersuchungen Erstisolate aus Wisentpräputialgewebe verwendet hat, während Ülbegi (2010) mit mehrfach subkultivierten Bakterienkulturen aus der Stammsammlung der DSMZ-gearbeitet hat, die auch in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden. Zudem stammen die verwendeten Tierblutsorten in den Arbeiten von unterschiedlichen Herstellern, was ebenfalls das Hämolyseverhalten beeinflussen kann. Während sich *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 im Hämolyseaktivitäts-Assay mit Schaf- und Pferdeerythrozyten selbst nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C als negativ erwiesen, hatte *T. pyogenes* DSM 20630 beide eingesetzten

Erythrozytensuspensionen bereits nach 8 h vollständig lysiert. Dieses Ergebnis lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 nicht in der Lage sind, ihre Stoffwechsel- und Zellfunktionen in PBS-gepufferter Erythrozytensuspension voll auszubilden. Diese Annahme wurde durch die eigene Beobachtung untermauert, dass beide Bakterien in Flüssigmedien ebenfalls ein geringgradiges Wachstum zeigten. Da der Kontrollkeim *T. pyogenes* DSM 20630 die Erythrozyten lysierte, ist das angewendete Testverfahren prinzipiell als Hämolyse-Assay geeignet. Erythrozyten verschiedener Säugerspezies reagieren unterschiedlich empfindlich auf diverse Hämolyse (Neter, 1956) – so bildet auch *A. haemolyticum* auf Kaninchenblutagar eine deutliche Hämolysezone, während sie auf Schafblutagar kaum erkennbar ist (Lämmler und Blobel, 1988). Doch es können auch andere Faktoren, wie die Konzentration bestimmter Stoffe im Medium oder die Inkubationstemperatur, die Hämolyse fördern bzw. hemmen. Die Hämolysefähigkeit von *Rhodococcus equi* steigt beispielsweise mit zunehmender Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Medium (Smola et al., 1994). Ebenso wurde eine vermehrte Hämolyse bei einer Inkubation bei 30°C im Gegensatz zu den sonst üblichen 37°C beobachtet. Im Falle der *Staphylococcus*-Sphingomyelinase C (β -Hämolysin) lässt sich eine vollständige Hämolyse erst erzielen, indem das Bakterium zunächst bei 37°C inkubiert und die Inkubationstemperatur nach 18 h auf 4°C herabgesetzt wird (Blobel und Brückler, 1990). Ob solche Faktoren bei der Ausbildung der Hämolyse von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 eine Rolle spielen, wurde nicht untersucht.

Im *plo*-DotBlot reagierten beide *Trueperella* spp. ähnlich wie *A. haemolyticum* DSM 20595 schwach blau und im *aln*-DotBlot ähnlich stark wie *T. pyogenes* DSM 20630. Zur Abklärung, ob die schwach positive Reaktion von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 in den *plo*- und *aln*-DotBlots auf eine unspezifische Bindung der *Trueperella*-DNA zurückzuführen war, wurde Southern Blotting durchgeführt. Im Gegensatz zum DotBlot-Verfahren, in dem genomische Gesamt-DNA eingesetzt wird, wird die genomische DNA für das Southern Blotting fraktioniert, wodurch eine spezifischere Reaktion erfolgt. Sowohl *T. bonasi* DSM 17163 als auch *T. bialowiezensis* DSM 17162 erwiesen sich als negativ im Southern Blot, während bei der jeweiligen Positivkontrolle eine deutlich positive Bande zu beobachten war.

Zur weiteren Abklärung, ob *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 ein Hämolysin besitzen, das wie *T. pyogenes*-PLO und *A. haemolyticum*-ALN zur Gruppe der

MACPFs/CDCs gehört, wurde im nächsten Schritt die Amplifizierung eines Hämolyse-kodierenden Gens angestrebt. Da Cholesterol-abhängige Zytolysine (CDCs) nur eine einzige als konserviert geltende Region von in der Regel 11 Aminosäuren (ECTGLAWEWWR) besitzen (Heuck et al., 2010), wurden zunächst *plo*- und *aln*-spezifische Primer verwendet (siehe 4.2.10.2.). Diese Methode wurde bereits von Ülbegi (2010) angewendet, der es gelang, mittels *plo*-spezifischer Oligonukleotidprimer von *T. pyogenes* das Phocaelysin-Gen (*phe*) von *A. phocae* zu amplifizieren – allerdings erst, nachdem die Primerannealing-Temperatur in der PCR-Reaktion auf 45°C herabgesetzt wurde. Dagegen erwiesen sich *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 in derselben PCR-Reaktion als negativ – keine der beiden *Trueperella* spp. zeigte eine Kreuzreaktion mit den *plo*-spezifischen Primern (Ülbegi, 2010). Auch in eigenen PCR-Reaktionen mit niedrigen Annealing-Temperaturen wurden unter Einsatz von *plo*-, *aln*- und *pld*-spezifischen Primern keine spezifischen Amplifikationsbanden bei *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 erzeugt. Diese Ergebnisse sprechen vor dem Hintergrund der engen Verwandtschaft von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* mit *T. pyogenes* dafür, dass *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 keine CDCs besitzen, oder dass sich ihre CDCs so stark von PLO unterscheiden, dass in der PCR keine Kreuzreaktion feststellbar war. Möglich ist auch, dass ein evtl. vorhandener Hämolysefaktor mit den angewendeten Untersuchungsmethoden nicht identifiziert werden kann. Deshalb wurde nach erfolglosem Einsatz dieses Standard-PCR-Verfahrens eine PCR-Methode gesucht, bei der nur ein spezifischer Primer benötigt wird und als Gegenprimer ein unspezifischer Primer eingesetzt werden kann. Die „Uneven PCR“ (Chen und Wu, 1997) entsprach diesem Anspruch. Die eingesetzten spezifischen Primer waren gegen die o.g., aus 11 Aminosäuren bestehende, konservierte Region gerichtet. Keine der PCRs ergab ein Fragment, dessen Nukleinsäuresequenz Übereinstimmungen mit einem bekannten CDC aufwies. Die Gründe hierfür liegen möglicherweise in der zu geringen Übereinstimmung mit Nukleinsäuresequenzen der konservierten Regionen der Familie der CDCs, so dass die für *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 verwendeten „spezifischen“ Primer nicht ausreichend spezifisch für evtl. vorhandene CDCs waren. Dies beweist nicht, dass *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* kein Hämolyse-Gen besitzen. Da durch den Einsatz von zehn unterschiedlichen unspezifischen, kurzen Primern („10-meren“) in Kombination mit den spezifischen Primern jedoch eine möglichst erschöpfende spezifische Untersuchungsmethode angewendet wurde, sprechen die Ergebnisse der Uneven PCR dafür, dass die genannten Bakterien keine Hämolyse bilden, die eine CDC-typische konservierte Region aufweisen.

Um der Antwort zur Frage, ob *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* ein Hämolysin aus der Gruppe der MACPFs/CDCs besitzen, weiter näher zu kommen, wurde die Suche nach hämolytischen Faktoren mittels Selektion inserthaltiger Cosmid- und Plasmid-Klone auf antibiotikahaltigen LB-Blutagarplatten fortgeführt. Diese Methode wurde in der Vergangenheit bei *T. pyogenes* erfolgreich angewendet (Billington et al., 1997). Die *T. bonasi* und *T. bialowiezensis*-Cosmid-Bibliotheken wurden aus drei Gründen erstellt: zum Ersten, um zügiger und leichter *in vivo*-Versuche durchführen zu können, da *E. coli* weit weniger empfindlich als *Trueperella* ist – sie wachsen schneller und können auch auf nährstoffärmeren Selektivnährmedien oder in Flüssigmedien angezüchtet werden. Zum Zweiten eignet sich die Insertgröße von Cosmid-Vektoren optimal für die Suche nach Virulenzfaktoren. Das gesamte Bakteriengenom kann im Vergleich zu einer Plasmid-Bibliothek in einer relativ kleinen Anzahl von Klonen untergebracht werden. Zudem ist durch die Insertlänge die Wahrscheinlichkeit geringer, dass der Schnitt durch die Restriktionsendonukleasen innerhalb der Gene, die untersucht werden sollen, erfolgt. Zum Dritten lassen sich einmal erstellte genomische Bibliotheken leicht bei -80°C lagern und somit für die Untersuchung vieler unterschiedlicher Virulenzfaktoren nutzen. Virulenzgen-tragende Cosmid-Inserts lassen sich leicht extrahieren, mit Restriktionsendonukleasen schneiden und in Plasmid-Vektoren subklonieren. Bei der Untersuchung von hämolyzierenden Virulenzfaktoren (PLD) von *A. haemolyticum* wurden Cosmid-Klonierungen mit anschließendem Hämolyse-Screening auf antibiotikahaltigen LB-Blut-Equi-Faktor-Platten durchgeführt. Für die Subklonierung wurde, wie in der vorliegenden Arbeit, ein p-Bluescript-Plasmid-Vektor verwendet (Cuevas und Songer, 1993). Auch andere Virulenzfaktoren, wie beispielsweise die Hämolysine von *Actinobacillus pleuropneumoniae* oder *Leptospira interrogans*, wurden über die Selektion hämolytischer Klone auf antibiotikahaltigen Blutagarplatten identifiziert (Lian et al., 1989; del Real et al., 1989).

Beim Screening der *T. bonasi*- und *T. bialowiezensis*-Cosmid-Bibliotheken zeigte sich, dass vereinzelte Kolonien auf ampicillinhaltigen Wisent-, Rinder-, Pferde- und Schafblut-Agarplatten hämolyseartige Veränderungen bewirkten. Dieses Phänomen war jedoch nicht auf die Inserts, sondern auf die Hämolyse-ähnliche Aktivität einiger Zellen aus zwei kompetenten Zelllinien (*E. coli* XL1-Blue MR-Zellen, *E. coli* XL1-Blue Ultrakompetente Zellen) in Kombination mit Blut der o.g. Säugerspezies zurückzuführen. Die Ursache der irreführenden Hämolyseaktivität konnte nur identifiziert werden, weil die aufwändige Erstellung der Cosmid-Bibliotheken nicht extern erfolgt ist, sondern vollständig selbst übernommen wurde. Dies hatte zur Folge, dass jeder Arbeitsschritt nachvollziehbar war und

mehrere kompetente Zelllinien als Kontrolle bei der Fehlersuche zur Verfügung standen. Ob es also tatsächlich eine durch Inserts (also durch *T. bonasi* DSM 17163- und *T. bialowiezensis* DSM 17162-Gene) verursachte Hämolyse auf den oben genannten Medien gab, ist – wie die im nächsten Abschnitt diskutierten Überlegungen zeigen – zwar weiterhin theoretisch möglich, wurde aber konkret nicht weiter untersucht.

Auf Ziegen- und Kaninchenblut-Agarplatten wurde diese Reaktion der kompetenten Zellen nicht beobachtet, weshalb beide Cosmid-Bibliotheken auf ampicillinhaltigen Ziegen- und Kaninchenblut-Platten auf Hämolyse untersucht wurden. Es trat jedoch kein hämolytischer Klon auf. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte sein, dass die für die Hämolyse kodierenden Gene von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 nicht durch die Cosmid-Bibliotheken abgedeckt wurden. Denkbar ist auch, dass für die Expression essentielle Gen-Abschnitte von den zur Herstellung der Cosmid-Bibliothek verwendeten Restriktionsendonukleasen zerschnitten wurden. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass ein Co-Faktor oder zusätzliche bakterielle Gene zur Ausbildung der Hämolyse notwendig sind. Das *plo*-Gen von *T. pyogenes* befindet sich beispielsweise innerhalb einer genomischen Insel, die von Genen flankiert wird, welche für die Ausbildung der Virulenz von *T. pyogenes* essentiell sind (Rudnick et al., 2003).

Die hier verwendeten Untersuchungsverfahren lieferten keinen Hinweis darauf, dass *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* ein Hämolysin aus der Gruppe der CDCs besitzen.

6.5. Phospholipase-Aktivität

Aufgrund der Verwandtschaft von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* mit *A. haemolyticum* wurde angenommen, dass *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* möglicherweise eine *A. haemolyticum*-PLD ähnliche Phospholipase bilden, die mit Hilfe bisher verwendeter Untersuchungsverfahren nicht detektiert wurde (Ülbeği-Mohyla et al., 2009; Ülbeği, 2010). Deshalb wurde als Screeningverfahren für *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 zunächst eine DotBlot-Hybridisierung durchgeführt. Die untersuchten *Trueperella* zeigten im DotBlot eine geringgradig positive Reaktion, die jedoch nicht stärker ausgeprägt war als die von *T. pyogenes* DSM 20630, der keine PLD besitzt. Deshalb sollte das Ergebnis mittels Cosmid-Bibliothek-Screening auf ampicillinhaltigen Ziegen- und Kaninchenblut-Equi-Faktor-Platten (siehe 5.2.5.) verifiziert werden. Dieses Verfahren ergab,

dass keine der beiden Bibliotheken hämolysierende Klone enthielt. Das Ergebnis dieser Versuche bestätigt, dass *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 keine Phospholipase besitzen, die strukturell oder funktional der PLD von *A. haemolyticum* gleicht. Ülbegi (2010) untersuchte in ihrer Arbeit verschiedene Hämolysereaktionen bei *Trueperella* und kommt zu dem Ergebnis, dass *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 weder synergistische (Equi-Faktor) noch antagonistische Hämolysereaktionen zeigten. Das Zusammenwirken des Equi-Faktors von *Rhodococcus equi* z.B. mit der PLD von *A. haemolyticum* und der PLC von *C. pseudotuberculosis* hätte zu einer verstärkten Hämolyse der Erythrozyten verschiedener Spezies *in vitro* führen können (Machang'u und Prescott, 1991; Songer, 1997; Nakazawa und Nemoto, 1980). Das Ausbleiben einer Reaktion bei *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 ist konsistent mit meinen eigenen Untersuchungen und verstärkt die Vermutung, dass *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* keine Phospholipasen ausbilden.

6.6. DNase-Aktivität

Innerhalb der Gattungen *Arcanobacterium* und *Trueperella* wurde das Enzym DNase bisher bei *T. pyogenes* und *A. haemolyticum* nachgewiesen (Jost und Billington, 2005; Yasawong et al., 2010). Der Nachweis der DNase wird durch die Anzucht des Testkeims auf DNA-haltigem DNase-Test-Agar (Fertigmedium) durchgeführt. Nach Überschichtung der Platten mit 1N HCl bildet sich bei abgebauter DNA eine klare Agarzone um die DNase-bildenden Kolonien, während der Rest der Platte trüb bleibt (Jeffries et al., 1957). Bei *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* führte die Verwendung von DNase-Test-Agar jedoch zu einem negativen Ergebnis (Ülbegi, 2010). Grund hierfür könnte das anspruchsvolle Wachstum dieser Bakterien sein, das erythrozytenhaltige Nährböden voraussetzt, der DNase-Nachweis auf bluthaltigen Nährböden aber nicht durchführbar ist. Eine Aufreinigung der DNase aus Kulturüberstand wurde nicht in Erwägung gezogen, da beide *Trueperella* spp. im Flüssigmedium ein geringes Wachstum zeigten und zudem nicht jede DNase in das Extrazellulärmedium sezerniert wird, sondern in einigen Fällen zellmembrangebunden vorkommt (Hasegawa et al., 2010). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die Nutzung der genomischen Bibliotheken gewählt. Je 3.200 Klone aus beiden Cosmid-Bibliotheken wurden auf ampicillinhaltigen DNase-Test-Agarplatten auf DNase-Aktivität untersucht. Dass kein untersuchter Klon DNase-positiv reagierte, unterstützt die Annahme von Ülbegi (2010), dass *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* keine DNase besitzen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Cosmid-Bibliotheken das DNase-kodierende Gen nicht

bzw. nicht vollständig enthielten. Endgültigen Aufschluss darüber würde die Sequenzierung der Gesamtgenome von *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 erbringen.

6.7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Sowohl *T. bonasi* DSM 17163 als auch *T. bialowiezensis* DSM 17162 reagierten Neuraminidase-positiv im MUAN-Filterpapier-Test. In dieser Arbeit wurde bei *T. bonasi* DSM 17163 erstmals ein Enzym aus dieser Gruppe identifiziert und sequenziert. Neuraminidasen, wie beispielsweise NanH von *T. pyogenes*, können als Virulenzfaktoren agieren und unter anderem die Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszellmembran fördern (Jost et al., 2001). Häufig übernehmen sie zentrale Rollen bei der Kapselbildung und der Ernährung der Bakterienzelle sowie bei der Abwehr gegen Faktoren des Immunsystems des Wirtsorganismus (Li et al., 2012; Corfield, 1992; Abrashev und Dulguerova, 2002). Olmstedt et al. (2003) fanden Beweise dafür, dass bakterielle Neuraminidasen die Viskosität von Zervikalschleim herabsetzen und somit die Besiedelung des weiblichen Genitaltraktes mit sexuell übertragbaren Bakterien erleichtern und die Besiedelung tiefer liegender Gewebe ermöglichen – eine ähnliche Funktion könnte *T. bonasi* NanH im Zusammenhang mit der Infektion der Präputialschleimhaut im Rahmen der Balanoposthitis beim Wisent einnehmen. Die *Pseudomonas aeruginosa*-Neuraminidase NanA spielt eine entscheidende Rolle bei der initialen Besiedelung der Respirationsschleimhaut im Rahmen von Atemwegsinfektionen. Neuraminidase-Knockout-Mutanten des Bakteriums führten zu einer verminderten Biofilm-Produktion und damit zur Unfähigkeit des Erregers, Lungengewebe zu besiedeln und Krankheit auszulösen (Soong et al., 2006; Parker et al., 2009). Dies ist auch von der Neuraminidase des Erregers der humanen Parodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, bekannt (Li et al., 2012). Da *T. bonasi* ebenfalls aus eitrigen Schleimhautinfektionen (Balanoposthitis) isoliert wurde, wäre es möglich, dass die *T. bonasi*-Neuraminidase NanH ebenfalls in der Lage ist, die Biofilm-Produktion zu unterstützen und die Besiedelung der Genitalschleimhaut männlicher Wisente mit *T. bonasi* über die lokale natürliche Abwehr hinweg zu ermöglichen. Andere Neuraminidasen, wie beispielsweise NanI und NanJ des Gasbrand-Erregers *Clostridium perfringens* haben keine Auswirkung auf die Pathogenität des Bakteriums (Chiarezza et al., 2009) oder werden von apathogenen Bakterien gebildet (Abrashev und Dulguerova, 2000). Dagegen gilt die *Clostridium perfringens* NanI-homologe Neuraminidase von *Mycoplasma alligatori* zusammen mit einer Hyaluronidase als wichtigster Virulenzfaktor des Erregers von tödlich verlaufenden Infektionen innerer Organe bei Alligatoren und Kaimanen (Brown et al., 2004).

Weitere, gut charakterisierte Virulenzfaktoren, wie sie in verwandten pathogenen Bakterien (*T. pyogenes*, *A. haemolyticum*) auftreten – etwa ein Hämolysin aus der MACPF/CDC-Gruppe oder eine Phospholipase (D) – wurden bei *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 mit den hier angewendeten Methoden nicht nachgewiesen. Aus diesem Grund vermute ich, dass *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 mit großer Wahrscheinlichkeit auch kein strukturell und/oder funktionell unterschiedliches Hämolysin besitzen. Auch die Bildung von DNAsen bei *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 wurde mit den hier beschriebenen molekulargenetischen Testverfahren nicht nachgewiesen, was die Untersuchungsergebnisse anderer Autoren bestätigt (Ülbegi, 2010).

Anhand der bisherigen Ergebnisse ist eine eindeutige Aussage zur Pathogenität der untersuchten Bakterien *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 für die Entstehung der Balanoposthitis beim Wisent nicht abschließend möglich. Dass die *T. bonasi*-Neuraminidase allein ausreicht, um Balanoposthitis beim Wisent zu verursachen, ist unwahrscheinlich, da Bakterien häufig ein breites Spektrum an Virulenzfaktoren besitzen, die zusammen wirken und bei der Infektion von Wirtszellgewebe unterschiedliche Funktionen übernehmen (siehe 2.3.). Denkbar ist, dass *T. bonasi* und *T. bialowiezensis*, wie auch *T. pyogenes* und *A. haemolyticum*, mehrere Neuraminidasen (und auch generell mehrere Pathogenitätsfaktoren) besitzen, die unterschiedlich großen Einfluß auf die Virulenz der Bakterien haben (Jost et al., 2002; Lucas, 2009). Vergleichende Adhäsionstests mit *T. bonasi*-Wildtyp und NanH⁻ *T. bonasi*-Mutanten (= *T. bonasi*-Neuraminidase NanH-Knockout-Mutanten) auf verschiedenen Wirtszelllinien (idealerweise Wisentzelllinien) oder *in vivo*-Infektionsversuche mit Labormäusen könnten Aufschluss über die Rolle der Neuraminidase und die mögliche Virulenz und Pathogenität der Bakterien geben. Die Tatsache, dass viele bakterielle Neuraminidasen eine bedeutende Rolle bei der primären Besiedelung von Weichteilgeweben im Rahmen purulenter Infektionen insbesondere der Respirations-, Intestinal- und Genitalschleimhäute spielen (Corfield, 1992; Taylor, 1996; Lewis und Lewis, 2012), spricht dafür, dass auch der *T. bonasi*-Neuraminidase NanH eine entscheidende Aufgabe bei der Adhäsion der Bakterien an die Präputialschleimhautzellen beim Wisent zukommt. Die Ähnlichkeit der in dieser Arbeit erstmals beschriebenen *T. bonasi*-Neuraminidase NanH zur *T. pyogenes*-Neuraminidase NanH (Jost et al., 2001) unterstützt diese Annahme.

7. Zusammenfassung

Männliche Wisente (*Bison bonasus*) im Waldgebiet von Białowieża in Polen und Weißrussland leiden seit den 1960er (Weißrussland) bzw. 1980er Jahren (Polen) unter der Balanoposthitis, einer chronisch-nekrotisierenden Entzündung des Präputiums und des Penis, die etwa 6,4% der Bullen in Polen betrifft. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass zwei Gram-positive Bakterien der Gattung *Trueperella*, *T. bonasi* und *T. bialowiezensis*, eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese spielen, da sie bereits in frühen Stadien der Erkrankung nachgewiesen wurden und bei gesunden Tieren nicht vorkommen. Um diese Idee zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit nach möglichen Virulenzfaktoren bei *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 gesucht: Neuraminidasen, Hämolsin, Phospholipase D und DNAsen. Hierbei dienten die nahe verwandten human- und tierpathogenen Schleimhaut- und Weichteilinfektionserreger *T. pyogenes* (DSM 20630) und *A. haemolyticum* (DSM 20595) als Vergleichsorganismen. Der MUAN-Filterpapier-Test zum Nachweis von Neuraminidasen ergab für beide Bakterienarten ein positives Ergebnis. Bei der Untersuchung der mit dieser Arbeit zum ersten Mal erstellten genomischen Bibliotheken wurden jedoch nur in der *T. bonasi*-Bibliothek Neuraminidase-positive Cosmidklone gefunden. Dies spricht dafür, dass die *T. bialowiezensis*-Cosmidbibliothek trotz großer Einzelklonzahl (8×10^5 Klone mit durchschnittlichen Insertlängen von 32.500 bp) nicht das vollständige Genom von *T. bialowiezensis* DSM 17162 abdeckt. Um die Größe der Neuraminidase-Domain zu bestimmen, wurden die Inserts der Neuraminidase-positiven *T. bonasi*-Cosmidklone nach Extraktion mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut, in einen Plasmidvektor subkloniert und erneut auf Neuraminidase-Aktivität geprüft. Mittels „primer walking“-Technik wurde der Neuraminidase-positive Plasmid-Klon bon/cos6A/pJET4A sequenziert. Auf dessen Insert befanden sich zwei Gene – zum einen ein 3.312 bp langes Gen, welches die Neuraminidase-Aktivität kodierte und zum anderen ein 1.161 bp langes Gen („bon-UPF“), das für ein Protein mit dem Molekulargewicht von 98.480 kodierte (*T. bonasi*-„UPF-ähnliches“ Protein) und aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten in die Familie der „UPF0027/RtcB“-Proteine, also RNA-Ligasen bzw. der „Hint-Superfamilie“ (Hint = Hedgehog intein domain) eingeordnet wurde und sich in weiteren Subklonierungstests als nicht essentiell für die Neuraminidase-Aktivität erwies. Die Aminosäure (AS)-Sequenz der *T. bonasi*-Neuraminidase enthält, wie die aller bakteriellen Neuraminidasen, die konservierte RIP/RLP-Sequenz (Arg-Ile/Leu-Pro) sowie fünf Ausführungen des ASP-Box-Motives (Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp), von denen zwei bis

fünf Ausführungen erwartet worden wären. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 273.309. Die Sequenz der *T. bonasi*-Neuraminidase weist die größte Ähnlichkeit zur *T. pyogenes*-Neuraminidase NanH auf (44% Nukleotidsequenz-Übereinstimmung und 59% Aminosäuresequenz-Übereinstimmung), weshalb der Name „*T. bonasi*-Neuraminidase NanH“ vorgeschlagen wird. Viele bakterielle Neuraminidasen, so auch *T. pyogenes* NanH, sind als Virulenzfaktoren von Bedeutung und spielen bei der initialen Schädigung der Schleimhautoberfläche und dem somit erleichterten Anhaften der Bakterien an Wirtszellen eine Rolle. So wird vermutet, dass auch *T. bonasi*-Neuraminidase NanH ein Virulenzfaktor ist, der *T. pyogenes* NanH ähnliche Funktionen hat; dies sollte jedoch in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Obwohl *T. bonasi* DSM 17163 und *T. bialowiezensis* DSM 17162 auf Schafblut-Agarplatten eine feine Hämolysezone um die Kolonien ausbildeten, erbrachten die in dieser Arbeit eingesetzten Tests (Hämolysintest, unterschiedliche PCR-Verfahren, DotBlot- und Southern Blot-Hybridisierungen, Screening der genomischen Cosmidbibliotheken auf Wisent- und anderen Tierblutagarplatten) keine Hinweise auf das Vorhandensein eines Hämolsins aus der Familie der MACPFs/CDCs („Membrane attack complex/Perforin-Family“/„Cholesterol dependent Cytolysins“). Tests auf Vorhandensein von Phospholipase D oder einer extrazellulären DNase verliefen gleichfalls negativ. Auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird eine komplette Sequenzierung der Genome von *T. bonasi* und *T. bialowiezensis* für sinnvoll erachtet, da mit dieser Methode auch Virulenzfaktoren identifiziert werden könnten, die keinen bekannten Virulenzfaktoren verwandter Bakterien gleichen, beispielsweise ein neuartiges Hämolsin, das nicht zur MACPF/CDC-Superfamilie gehört. Bis dahin kann eine eindeutige Aussage zur Pathogenität der Bakterien als Auslöser der Balanoposthitis beim Wisent nicht getroffen werden.

Investigations of possible virulence factors in *Trueperella bonasi* and *Trueperella bialowiezensis*

8. Summary

Since the 1960s (Belarus) and the 1980s (Poland), male European bison (*Bison bonasus*) living in the Białowieża forest area suffer from balanoposthitis, a chronically necrotising inflammatory disease of the prepuce and penis, which affects approximately 6.4% of the bulls. The etiology of the disease is unknown, although two gram-positive bacteria from the genus *Trueperella*, *T. bonasi* and *T. bialowiezensis*, have been suspected to play a crucial role in the pathology of balanoposthitis, since they are already present at the early stages of the disease and are absent from healthy animals. The study reported in this thesis was therefore designed to identify possible virulence factors of *T. bonasi* DSM 17163 and *T. bialowiezensis* DSM 17162: neuraminidase, hemolysin, phospholipase D and desoxyribonuclease (DNase). Two closely related bacteria responsible for soft tissue infections and infections of the mucous membranes in humans and animals, *T. pyogenes* (DSM 20630) and *A. haemolyticum* (DSM 20595), were used for comparisons. The MUAN-filter paper test detected neuraminidase activity in both bacteria strains. In this study two genomic cosmid libraries were constructed for the first time but only one of them – the genomic library of *T. bonasi* DSM 17163 – contained neuraminidase-positive cosmid clones. This suggests that the *T. bialowiezensis* DSM 17162 cosmid library, even though it contained 8×10^3 clones with an average insert length of 32,500 bp, did not cover the entire genome of *T. bialowiezensis* DSM 17162. After extracting the neuraminidase-positive *T. bonasi* cosmid clones, fragments of the inserts were subcloned into a plasmid vector and again screened for neuraminidase activity. “primer walking” technique was then used to sequence the neuraminidase-positive clone bon/cos6A/pJET4A which contained an insert with two ORFs. One encoded a gene of 3,312 bp length encoding for the neuraminidase activity; the other one was a gene of 1,161 bp length (“bon-UPF”) which encoded for a protein (*T. bonasi*-„UPF-like“ protein) with the molecular mass of 98,480 and was assigned to the „UPF0027/RtcB“-protein family (RNA ligases) and the “Hint-superfamily” (Hint = Hedgehog intein domain), respectively. Further subcloning to separate the two genes showed that the presence of “bon-UPF” is not essential for neuraminidase activity. Like all bacterial neuraminidases, the amino acid sequence of the *T. bonasi* neuraminidase contains the conserved RIP/RLP (Arg-Ile/Leu-Pro) sequence as well

as five copies of the ASP-Box motif (Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp), for which two to five are customary. The molecular mass of the protein is 273,309. The *T. bonasi* DSM 17163 neuraminidase has its highest sequence similarity to that of *T. pyogenes* neuraminidase NanH – they share 44% of their nucleotide sequence and 59% of their amino acid sequence. I therefore suggest the name “*T. bonasi* neuraminidase NanH” for the newly identified protein. Similar to many bacterial neuraminidases, *T. pyogenes* NanH acts as a virulence factor, playing an important role in the initial damaging of mucosal surfaces and thus facilitating bacterial colonization of host tissues. It is therefore assumed that *T. bonasi* NanH also constitutes a virulence factor with similar functions as *T. pyogenes* NanH although this needs to be investigated further. Although *T. bonasi* DSM 17163 and *T. bialowiezensis* DSM 17162 only showed a thin zone of hemolysis around their colonies when cultivated on domestic sheep-blood-agar plates, all tests applied failed to detect a hemolysin. These included the hemolysin test, different PCR-approaches, DotBlots, Southern blot hybridisations and the screening of the genomic cosmid libraries on blood agar plates of bison and other species. There was no evidence for the existence of a phospholipase D, nor for the presence of an extracellular DNase. Future studies should include a complete genome sequencing of *T. bonasi* and *T. bialowiezensis*, as this would facilitate the detection of virulence factors which lack any similarity to any known virulence factor of related bacteria, for instance a novel hemolysin that does not belong to the MACPF/CDC-superfamily. Until then an unambiguous statement on the pathogenicity or otherwise of *T. bonasi* DSM 17163 and *T. bialowiezensis* DSM 17162 as the causative agent of the balanoposthitis in European bison is not feasible.

9. Literaturverzeichnis

ABRASHEV I., DULGUEROVA G. (2000)

Neuraminidases (sialidases) from bacterial origin

Exp Path Para 4: 35-40

ACHYUTHAN K.E., ACHYUTHAN A.M. (2001)

Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo-alpha-sialidases (neuraminidases)

Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 129(1): 29-64

ALOUF J.E. (2006a)

A 116-year story of bacterial protein toxins (1888-2004): from "diphtheric poison" to molecular toxinology

In: J.E. Alouf, M.R. Popoff (Hrsg.): The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, Third edition

Academic Press, Elsevier Ltd., Burlington, MA, USA, pp. 3-24

ALOUF J.E., BILLINGTON S.J., JOST B.H. (2006b)

Repertoire and general features of the family of cholesterol-dependent cytolysins

In: J.E. Alouf, M.R. Popoff (Hrsg.): The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, Third edition

Academic Press, Elsevier Ltd., Burlington, MA, USA, pp. 643-658

ANUSZ K., KITA J., ZALESKA M., SALWA A., MALICKA E., BIELECKI W., OSIŃSKA B. (2007)

Some morphological, biochemical and immunological blood parameters in European bison with or without lesions in the digestive, respiratory, urinary and reproductive tracts

Pol J Vet Sci 10(3): 137-142

AZAWI O.I., OMRAN S.N., HADAD J.J. (2008)

A study of endometritis causing repeat breeding of cycling iraqi buffalo cows

Reprod Domest Anim 43(6): 735-743

AZUMA R., MURAKAMI S., OGAWA A., OKADA Y., MIYAZAKI S., MAKINO T. (2009)

Arcanobacterium abortusuis sp. nov., isolated from a placenta of a sow following an abortion

Int J Syst Evol Microbiol 59(6): 1469-1473

BANCK G., NYMAN M. (1986)

Tonsillitis and rash associated with *Corynebacterium haemolyticum*

J Infect Dis 154(6): 1037-1040

BARKER A.P., VASIL A.I., FILLOUX A., BALL G., WILDERMAN P.J., VASIL M.L. (2004)

A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis

Mol Microbiol 53(4): 1089-1098

- BARKSDALE L., LINDER R., SULEA I.T., POLLICE M. (1981)
Phospholipase D Activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a Distinctive Marker within the Genus *Corynebacterium*
J Clin Microbiol 13(2): 335-343
- BAUMANN C.D., DAVIDSON W.R., ROSCOE D.E., BEHELER-AMASS K. (2001)
Intracranial abscessation in white-tailed deer of North America
J Wildl Dis 37(4): 661-760
- BEMER P., EVEILLARD M., TOUCHAIS S., REDON H., CORVEC S. (2009)
A case of osteitis due to *Staphylococcus aureus* and *Arcanobacterium bernardiae* co-infection
Diagn Microbiol Infect Dis 63(3): 327-329
- BEMIS D.A., BRYANT M.J., KANIA S.A., NEWMAN S.J. (2008)
Isolation of *Arcanobacterium hippocoleae* from a case of placentitis and stillbirth in a mare
J Vet Diagn Invest 20(5): 688-691
- BENNETT G.N., HICKFORD J.G. (2011)
Ovine footrot: new approaches to an old disease (Review)
Vet Microbiol 148(1): 1-7
- BERNHEIMER A.W., LINDER R., WEINSTEIN S.A., KIM K.S. (1987)
Isolation and characterization of a phospholipase B from venom of Collett's snake, *Pseudechis colletti*.
Toxicon 25(5): 547-554
- BILLINGTON S.J., JOST B.H., CUEVAS W.A., BRIGHT K.R., SONGER J.G. (1997)
The *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* Hemolysin, Pyolysin, Is a Novel Member of the Thiol-Activated Cytolysin Family
J Bacteriol 179(19): 6100-6106
- BILLINGTON S.J., SONGER J.G., JOST B.H. (2001)
Molecular characterization of the pore-forming toxin, pyolysin, a major virulence determinant of *Arcanobacterium pyogenes*
Vet Microbiol 82(3): 261-274
- BILLINGTON S.J., SONGER J.G., JOST B.H. (2002a)
The variant undecapeptide sequence of the *Arcanobacterium pyogenes* hemolysin, pyolysin, is required for full cytolytic activity
Microbiology 148(Pt 12): 3947-3954
- BILLINGTON S.J., POST K.W., JOST B.H. (2002b)
Isolation of *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* from cases of feline otitis externa and canine cystitis
J Vet Diagn Invest 14(2): 159-162

BLOBEL H., BRÜCKLER J. (1980)

In: H. Blobel und T. Schließer (Hrsg.): Handbuch der bakteriellen Infektion bei Tieren, Band 2

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 21-160

BORCHERS K., BRACKMANN J., WOLF O., RUDOLPH M., GLATZEL P.,

KRASIŃSKA M., KRASIŃSKI Z.A., FRÖLICH K. (2002)

Virologic investigations on free-living European bison (*Bison bonasus*) from the Białowieża Primeval Forest, Poland

J Wildl Dis 38(3): 533-538

BOROWSKI S., KRASIŃSKI Z.A. MIŁOWSKI L. (1967)

Food and role of the European bison in forest ecosystems

Acta Theriologica 12: 367-376

BRANDER M.A., JOUSIMIES-SOMER H.R. (1992)

Evaluation of the RapID ANA II and API ZYM systems for identification of *Actinomyces* species from clinical specimens.

J Clin Microbiol 30(12): 3112-3116

BRAUN V., FOCARETA T. (1991)

Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins) (Review)

Crit Rev Microbiol 18(2): 115-58

BRINTON M.K., SCHELLBERG L.C., JOHNSON J.B., FRANK R.K., HALVORSON D.A., NEWMAN J.A. (1993)

Description of osteomyelitis lesions associated with *Actinomyces pyogenes* infection in the proximal tibia of adult male turkeys

Avian Dis 37(1): 259-262

BRIONES M.R., EGIMA C.M., EICHINGER D., SCHENKMAN S. (1995)

Trans-sialidase genes expressed in mammalian forms of *Trypanosoma cruzi* evolved from ancestor genes expressed in insect forms of the parasite

J Mol Evol 41(2): 120-131

BROWN D.R., ZACHER L.A., FARMERIE W.G. (2004)

Spreading Factors of *Mycoplasma alligatoris*, a Flesh-Eating Mycoplasma

J Bacteriol 186(12): 3922-3927

BUCHANAN J.T., SIMPSON A.J., AZIZ R.K., LIU G.Y., KRISTIAN S.A., KOTB M., FERAMISCO J., NIZET V. (2006)

DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps

Curr Biol 16(4): 396-400

BÜRGLIN T.R. (2008)

The Hedgehog protein family

Genome Biol 9(11): 241

BUNEVICH A.N. (2010)

Występowanie choroby układu moczowo-płciowego u zubrow samców w białoruskiej części Puszczy Białowieskiej

“Occurrence of uro-genital disease (balanoposthitis) in males of the European bison in the Belorussian part of the Białowieża Forest”

Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody 29(3): 77-87

BUSELMEIER W. (2009)

Biologie für Mediziner, 11. Auflage

Springer Medizin Verlag, Heidelberg, p. 255

BYERS H.L., HOMER K.A., BEIGHTON D. (1996)

Utilization of sialic acid by viridans streptococci

J Dent Res 75(8): 1564-1571

CAI H., ARCHAMBAULT M., PRESCOTT J.F. (2003)

16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria

J Vet Diagn Invest 15(5): 465-469

CÁMARA M., BOULNOIS G.J., ANDREW P.W., MITCHELL T.J. (1994)

A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein

Infect Immun 62(9): 3688-3695

CAO D., HAUSSECKER D., HUANG Y., KAY M.A. (2009)

Combined proteomic-RNAi screen for host factors involved in human hepatitis delta virus replication

RNA 15: 1971-1979

CARLSON P., LOUNATMAA K., KONTIAINEN S. (1994a)

Biotypes of *Arcanobacterium haemolyticum*

J Clin Microbiol 32(7): 1654-1657

CARLSON P., RENKONEN O.V., KONTINAINEN S. (1994b)

Arcanobacterium haemolyticum and streptococcal pharyngitis

Scand J Infect Dis 26(3): 283-287

CHEN X., WU R. (1997)

Direct amplification of unknown genes and fragments by Uneven polymerase chain reaction

Gene 185(2): 195-199

CHIAREZZA M., LYRAS D., PIDOT S.J., FLORES-DÍAZ M., AWAD M.M., KENNEDY

C.L., CORDNER L.M., PHUMONNA T., POON R., HUGHES M.L., EMMINS J.J.,

ALAPE-GIRÓN A., ROOD J.I. (2009)

The NanI and NanJ sialidases of *Clostridium perfringens* are not essential for virulence

Infect Immun 77(10): 4421-4428

CHRISTENSEN R.V., AALBAEK B., JENSEN H.E. (2007)

Pathology of udder lesions in sows

J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 54(9): 491-493

CLARKE T.M., CITRON D.M., TOWFIGH S. (2010)

The conundrum of the gram-positive rod: are we missing important pathogens in complicated skin and soft-tissue infections? A case report and review of the literature (Review)

Surg Infect (Larchmt) 11(1): 65-72

COLLINS M.D., JONES D. (1982)

Reclassification of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) in the Genus *Actinomyces*, as *Actinomyces pyogenes* comb. nov.

J Gen Microbiol 128(4): 901-903

COLLINS M.D., JONES D., SCHOFIELD G.M. (1982)

Reclassification of "*Corynebacterium haemolyticum*" (MacLean, Liebow & Rosenberg) in the Genus *Arcanobacterium* gen. nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom. rev., comb. nov.

J Gen Microbiol 128(6): 1279-1128

CORFIELD T. (1992)

Bacterial sialidases – roles in pathogenicity and nutrition (Review)

Glycobiology 2(6): 509-521

CRENELL S.J., GARMAN E.F., LAVER W.G., VIMR E.R., TAYLOR G.L. (1993)

Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella typhimurium* LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase

Proc Natl Acad Sci USA 90(21): 9852-9856

CUEVAS W.A., SONGER J.G. (1993)

Arcanobacterium haemolyticum Phospholipase D Is Genetically and Functionally Similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* Phospholipase D

Infect Immun 61(10): 4310-4316

CZYKIER E., SAWICKI B., ZABEL M. (1999)

Immunocytochemical localization of S-100 protein in the European bison testis and epididymidis

Folia Histochem Cytobiol 37(2): 83-84

DARAI G., HANDERMANN M., SONNTAG H.-G., ZÖLLNER L. (HRSG.) (2012)

Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe, 4. Auflage

Springer Verlag, Heidelberg, pp. 1-979

DE KRUIF A. (1999)

Kapitel 13: Aborte

In: E. Grunert, A. de Kruif (Hrsg.)

Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind, 3. Auflage

Paul Parey Buchverlag, Berlin, p. 263-286

DEL REAL G., SEGERS R.P., VAN DER ZEIJST B.A., GAASTRA W. (1989)

Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo.

Infect Immun 57(8): 2588-2590

- DIAS C.A.G., CAUDURO P.F., MEZZARI A., CANTARELLI V. (1996)
Actinomyces pyogenes isolated from a subcutaneous abscess in a dairy farmer
Clin Microbiol Newsl 18(5): 38-40
- DING H., LÄMMLER C. (1996)
Purification and further characterization of a haemolysin of *Actinomyces pyogenes*
Zentralbl Veterinaarmed B 43(3): 179-188
- DOBINSKY S., NOESSELT T., RÜCKER A., MAERKER J., MACK D. (1999)
Three cases of *Arcanobacterium haemolyticum* associated with abscess formation and cellulitis
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18(11): 804-806
- DOENECKE D., KOOLMAN J., FUCHS G., GEROK W. (2005)
Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, 15. Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 302-303
- DORÉ E., FECTEAU G., HÉLIE P., FRANCOZ D. (2007)
Liver abscesses in Holstein dairy cattle: 18 cases (1992-2003)
J Vet Intern Med 21(4): 853-856
- DRAZEK E.S., DUBOIS A., HOLMES R.K., KERSULYTE D., AKOPYANTS N.S., BERG D.E., WARREN R.L. (1995)
Cloning and characterization of hemolytic genes from *Helicobacter pylori*
Infect Immun 63(11): 4345-4349
- ECHELARD Y., EPSTEIN D.J., ST-JACQUES B., SHEN L., MOHLER J., MCMAHON A.P. (1993)
Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity
Cell 75(7): 1417-30
- EDWARDS J.L., APICELLA M.A. (2006)
Neisseria gonorrhoeae PLD directly interacts with Akt kinase upon infection of primary, human, cervical epithelial cells
Cell Microbiol 8(8): 1253-1271
- EDWARDS J.L., SHAO J.Q., AULT K.A., APICELLA M.A. (2000)
Neisseria gonorrhoeae elicits membrane ruffling and cytoskeletal rearrangements upon infection of primary human endocervical and ectocervical cells
Infect Immun 68(9): 5354-5363
- ERICSSON UNNERSTAD H., LINDBERG A., PERSSON WALLER K., EKMAN T., ARTURSSON K., NILSSON-OST M., BENGTSSON B. (2009)
Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors
Vet Microbiol 137(1-2): 90-97

- ESMAY P.A., BILLINGTON S.J., LINK M.A., SONGER J.G., JOST B.H. (2003)
The *Arcanobacterium pyogenes* Collagen-Binding Protein, CbpA, Promotes Adhesion to Host Cells
Infect Immun 71(8): 4368-4374
- FEINBERG A.P., VOGELSTEIN B. (1983)
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity
Anal Biochem 132(1): 6-13
- FERRETTI J.J., MCSHAN W.M., AJDIC D., SAVIC D.J., SAVIC G., LYON K., PRIMEAUX C., SEZATE S., SUVOROV A.N., KENTON S., LAI H.S., LIN S.P., QIAN Y., JIA H.G., NAJAR F.Z., REN Q., ZHU H., SONG L., WHITE J., YUAN X., CLIFTON S.W., ROE B.A., MCLAUGHLIN R. (2001)
Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*
Proc Natl Acad Sci 98(8): 4658-4663
- FLORES R., GRUBB D., ELLEUCH A., NOHALES M.A., DELGADO S., GAGO S. (2011)
Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: variations on a theme
RNA Biol 8: 200-206
- FRANKHAM R., BALLOU J.D., BRISCOE D.A. (2010)
Introduction to Conservation Genetics
Cambridge University Press, Cambridge, UK, Second Edition, pp. 1-642
- FRASER G. (1964)
The effect on animal erythrocytes of combinations of diffusible substances produced by bacteria
J Pathol Bacteriol 88: 43-53
- FRASER A.G. (1978)
Neuraminidase production by clostridia
J Med Microbiol 11(3): 269-280
- FRONDA C.L., ZENG G., GAO L., YU R.K. (1999)
Molecular cloning and expression of mouse brain sialidase
Biochem Biophys Res Commun 258 (3): 727-31
- FUNKE G., RAMOS C.P., FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL J.F., WEISS N., COLLINS M.D. (1995)
Description of human-derived Centers for Disease Control coryneform group 2 bacteria as *Actinomyces bernardiae* sp. nov.
Int J Syst Bacteriol 45(1): 57-60
- FUNKE G., VON GRAEVENITZ A., CLARIDGE III J.E., BERNARD K. A. (1997)
Clinical Microbiology of Coryneform Bacteria
Clin Microbiol Rev 10(1): 125-159

- GAHRN-HANSEN B., FREDERIKSEN W. (1992)
Human infections with *Actinomyces pyogenes* (*Corynebacterium pyogenes*) (Review)
Diagn Microbiol Infect Dis 15(4): 349-354
- GALEN J.E., KETLEY J.M., FASANO A., RICHARDSON S.H., WASSERMAN S.S.,
KAPER J.B. (1992)
Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin
Infect Immun 60(2): 406-15
- GARCÍA-DE-LA-FUENTE C., CAMPO-ESQUISABEL A.B., UNDA F., RUIZ D.E.,
ALEGRÍA C., BENITO N., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L. (2008)
Comparison of different culture media and growth conditions for recognition of
Arcanobacterium haemolyticum
Diagn Microbiol Infect Dis 61(2): 232-234
- GASKELL A., CRENELL S., TAYLOR G. (1995)
The three domains of a bacterial sialidase: a β -propeller, an immunoglobulin module and a
galactose-binding jelly-roll
Structure 3(11): 1197-1205
- GILBERT R.J. (2010)
Cholesterol-dependent cytolysins
Adv Exp Med Biol 677: 56-66
- GLAGE F. (1903)
Über den *Bazillus pyogenes suis* Grips, den *Bazillus pyogenes bovis* Kunneman und den
Bakteriologischen Befund bei den chronischen abszedierenden Euterenzündungen der
Milchkühe
Zeitschrift für Fleisch und Milchhygiene 13: 166-175
- GOYAL R., SINGH N.P., MATHUR M. (2005)
Septic arthritis due to *Arcanobacterium haemolyticum*
Indian J Med Microbiol 23(1): 63-65
- GRALAK B., KRASIŃSKA M., NIEMCZEWSKI C., KRASIŃSKI Z.A., ŻURKOWSKI M.
(2004)
Polymorphism of bovine microsatellite DNA sequences in the lowland European bison
Acta Theriol 49(4): 449-456
- HAHN H., KAUFMANN S.H.E., SCHULZ T.F., SUERBAUM S. (2008)
Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie
Springer Medizin Verlag, Heidelberg, p.16
- HASEGAWA T., MINAMI M., OKAMOTO A., TATSUNO I., ISAKA M., OHTA M.
(2010)
Characterization of a virulence-associated and cell-wall-located DNase of *Streptococcus*
pyogenes
Microbiology 156(Pt 1): 184-190

- HASSAN A. A., MOHYLA H., KANBAR T., ALBER J., LÄMMLER C., ABDULMAWJOOD A., SPECK S., ZSCHÖCK M., WEISS R. (2008)
Molecular identification of *Arcanobacterium bialowiezense* and *Arcanobacterium bonasi* based on 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequences
Vet Microbiol 130(3-4): 410-414
- HASSAN A.A., ÜLBEGI-MOHYLA H., KANBAR T., ALBER J., LÄMMLER C., ABDULMAWJOOD A., ZSCHÖCK M., WEISS R. (2009)
Phenotypic and Genotypic Characterization of *Arcanobacterium haemolyticum* Isolates from Infections of Horses
J Clin Microbiol 47(1): 124-128
- HATTEL A.L., SHAW D.P., LOVE B.C., WAGNER D.C., DRAKE T.R., BROOKS J.W. (2004)
A retrospective study of mortality in Pennsylvania captive white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): 2000 – 2003
J Vet Diagn Invest 16(6): 515-521
- HATTEL A.L., SHAW D.P., FISHER J.S., BROOKS J.W., LOVE B.C., DRAKE T.R., WAGNER D.C. (2007)
Mortality in Pennsylvania captive elk (*Cervus elaphus*): 1998-2006
J Vet Diagn Invest 19(3): 334-337
- HERMIDA AMEJEIRAS A., ROMERO JUNG P., CABARCOS ORTIZ DE BARRÓN A., TREVIÑO CASTALLO M. (2004)
One case of pneumonia with *Arcanobacterium pyogenes*
An Med Interna 21(7): 334-336
- HEUCK A.P., MOE P.C., JOHNSON B.B. (2010)
The cholesterol-dependent cytolysin family of gram-positive bacterial toxins. Review.
Subcell Biochem 51: 551-577
- HIJAZIN M., HASSAN A.A., ALBER J., LÄMMLER C., TIMKE M., KOSTRZEWA M., PRENGER-BERNINGHOFF E., ZSCHÖCK M. (2012a)
Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for species identification of bacteria of genera *Arcanobacterium* and *Trueperella*
Vet Microbiol 157(1-2): 243-245
- HIJAZIN M., ÜLBEGI-MOHYLA H., ALBER J., LÄMMLER C., HASSAN A.A., TIMKE M., KOSTRZEWA M., PRENGER-BERNINGHOFF E., WEISS R., ZSCHÖCK M. (2012b)
Identification of *Arcanobacterium (Trueperella) abortusuis*, a novel species of veterinary importance, by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)
Berl Munch Tierarztl Wochenschr 125(1-2): 32-37
- HIRSCH-KAUFMANN M., SCHWEIGER M., SCHWEIGER M.-R. (2009)
Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler
Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 7. Auflage, pp. 6-8

- HIRSH D.C., MACLACHLAN N.J., WALKER R.L. (2004)
Veterinary Microbiology, Second Edition
Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, pp. 168-169
- HIRST G.K. (1941)
The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus
Science 94(2427): 22-23
- HODGSON A.L.M., BIRD P., NISBET I.T. (1990)
Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
J Bacteriol 172(3): 1256-1261
- HOLM B.A., KEICHER L., LIU M.Y., SOKOLOWSKI J., ENHORNING G. (1991)
Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases
J Appl Physiol 71(1): 317-321
- HOYLES L., FALSEN E., FOSTER G., ROGERSON F., COLLINS M.D. (2002)
Arcanobacterium hippocoeleae sp. nov., from the vagina of a horse
Int J Syst Evol Microbiol 52(Pt 2): 617-619
- ISTIVAN T.S., SMITH S.C., FRY B.N., COLOE P.J. (2008)
Characterization of *Campylobacter concisus* hemolysins
FEMS Immunol Med Microbiol 54(2): 224-235
- JAKOB W., SCHRÖDER H.-D., RUDOLPH M., KRASIŃSKI Z.A., KRASIŃSKA M., WOLF O., LANGE A., COOPER J.E., FRÖLICH K. (2000)
Necrobacillosis in free-living male European bison in Poland
J Wildl Dis 36(2): 248-256
- JEFFRIES C.D., HOLTMAN D.F., GUSE D.G. (1957)
Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids
J Bacteriol 73(4): 590-591
- JENKINS E.J., VEITCH A.M., KUTZ S.J., BOLLINGER T.K., CHIRINO-TREJO J.M., ELKIN B.T., WEST K.H., HOBERG E.P., POLLEY L. (2007)
Protostrongylid parasites and pneumonia in captive and wild thinhorn sheep (*Ovis dalli*)
J Wildl Dis 43(2): 189-205
- JENSEN T.K., MACKEY D.R. (1971)
Necrotic posthitis
In: T.K. Jensen und D.R. Mackey (Hrsg.) Diseases of feedlot cattle
Verlag Lea und Febiger, Philadelphia, Pennsylvania, USA, pp. 114-117
- JERMYN W.S., BOYD E.F. (2002)
Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nanH) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates
Microbiology 148(Pt 11): 3681-3693

JOHNSON S.P., JANG S., GULLAND F.M., MILLER M.A., CASPER D.R., LAWRENCE J., HERRERA J. (2003)
Characterization and clinical manifestations of *Arcanobacterium phocae* infections in marine mammals stranded along the central California coast
J Wildl Dis 39(1): 136-144

JOST B.H., SONGER J.G., BILLINGTON S.J. (1999)
An *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* Mutant Deficient in Production of the Pore-Forming Cytolysin Pyolysin Has Reduced Virulence
Infect Immun 67(4): 1723-1728

JOST B.H., SONGER J.G., BILLINGTON S.J. (2001)
Cloning, Expression, and Characterization of a Neuraminidase Gene from *Arcanobacterium pyogenes*
Infect Immun 69(7): 4430-4437

JOST B.H., SONGER J.G., BILLINGTON S.J. (2002)
Identification of a Second *Arcanobacterium pyogenes* Neuraminidase and Involvement of Neuraminidase Activity in Host Cell Adhesion
Infect Immun 70(3): 1106-1112

JOST B.H., BILLINGTON S.J. (2005)
Arcanobacterium pyogenes: molecular pathogenesis of an animal opportunist (Review)
Antonie van Leeuwenhoek 88(2): 87-102

JOST B.H., BILLINGTON S.J. (2006)
Actinomyces and *Arcanobacterium* spp.: Host-Microbe Interactions
In: Gram-Positive Pathogens, Second edition
V. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, J.I. Rood, ASM Press, Washington DC, USA, pp. 738-749

JOST, B.H., LUCAS, E.A., BILLINGTON, S.J., RATNER, A.J., MCGEE, D.J. (2011)
Arcanolysin is a cholesterol-dependent cytolysin of the human pathogen *Arcanobacterium haemolyticum*
BMC Microbiol 11: 239

KARNS G.R., LANCIA R.A., DEPERNO C.S., CONNER M.C., STOSKOPF M.K. (2009)
Intracranial abscessation as a natural mortality factor for adult male white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Kent County, Maryland, USA
J Wildl Dis 45(1): 196-200

KAVITHA K., LATHA R., UDAYASHANKAR C., JAYANTHI K., OUDEACOMAR P. (2010)
Three cases of *Arcanobacterium pyogenes*-associated soft tissue infection
J Med Microbiol 59(6): 736-739

KEHOE M.A., MILLER L., WALKER J.A., BOULNOIS G.J. (1987)
Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) gene: structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins
Infect Immun 55(12): 3228-3232

- KIDANEMARIAM A., GOUWS J., VAN VUUREN M., GUMMOW B. (2005)
Ulcerative balanitis and vulvitis of Dorper sheep in South Africa: a study on its aetiology and clinical features
Jl S Afr Vet Ass 76(4): 197-203
- KIRCHHOFF H. (1982)
Die Bedeutung der Mykoplasmen in den Genitalorganen von Rind, Pferd und Schwein
Berl Münch Tierärztl Wochenschr 95(7): 121-5
- KITA J., DZIABA K., PIUSIŃSKI W., ANUSZ K., LENARTOWICZ Z., KOWALSKI B., KRASIŃSKI Z.A., KRUPA J., LESNIEWSKI S. (1990)
Male genital disease of wild European bison in the Białowieża forest, Poland
Medycyna Weterynaryjna 46: 474-476
- KITA J., DZIABA K., PIUSIŃSKI W., KOWALSKI B., LENARTOWICZ Z., KINGSTON N., DROZDZ J., RUTKOWSKA M., KRASIŃSKI Z.A., KRUPA J., LESNIEWSKI S. (1994)
Preliminary studies on the diagnosis of a disease of the genital organs of male European bison in the Białowieża Forest of Poland
IUCN Species Survival Commission, Veterinary Specialist Group, Newsletter 8: 8–9
- KITA J., ANUSZ K., ZALESKA M., MALICKA E., BIELECKI W., OSIŃSKA B., KOWALSKI B., KRASIŃSKI Z., DEMIASZKIEWICZ A., RHYAN J., KOLIPINSKI M. (2003)
Relationships among ecology, demography and diseases of European bison (*Bison bonasus*)
Pol J Vet Sci 6(4): 261-6
- KLÖS H.G. (1968)
Der Wisent
In: Grzimeks Tierleben, Enzyklopädie des Tierreiches, Band 13, Säugetiere 4, Kandler, Zürich, pp. 394-398
- KOCH W. (1956)
Jahreszeitliche Schwankungen der Fruchtbarkeit bei Wildrindern
Dtsch Tierärztl Wschr Beilage Fortpfl Zuchthyg Haustierbes 6: 85-87
- KOTRAJAS R., TAGAMI H. (1987)
Corynebacterium pyogenes – Its Pathogenic Mechanism in Epidemic Leg Ulcers in Thailand
Int J Dermatol 26(1): 45-50
- KOWALCZYK R., TABERLET P., COISSAC E., VALENTINI A., MIQUEL C., KAMINSKI T., WOJCIK J.M. (2011)
Influence of management practices on large herbivore diet – Case of European bison in Białowieża Primeval Forest (Poland)
For Ecol Manage 261(4): 821-828
- KOZLO P. (2011)
European bison (*Bison bonasus*) in Belarus: the state and problems of management
European Bison Conservation Newsletter 4: 37-44

- KRASIŃSKA M., KRASIŃSKI Z.A., BUNEVICH A.N. (2000)
Factors affecting the variability in home range size and distribution in the Polish and Belarussian parts of the Białowieża Forest
Acta Theriol 45: 321-334
- KRASIŃSKA M., KRASIŃSKI Z.A. (2007)
The European bison: a nature monograph
Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, Verlag, Ort, pp.
- KRASIŃSKA M., KRASIŃSKI Z.A. (2010)
Przebieg i dyspersja choroby nekrotycznego zapalenia napletka samców żubrów na terenie polskiej części Puszczy Białowieskiej
Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody 29(2): 107-128
- KRASIŃSKI Z.A., RACZYŃSKI J. (1967)
The reproduction biology of European bison living in reserves and in freedom
Acta Theriol 12: 407-444
- KRASIŃSKI, Z.A. (1978)
Dynamics and structure of the European bison population in the Białowieża Primeval Forest
Acta Theriol 23: 3-48
- KRASIŃSKI, Z.A., BUNEVICH A.M., KRASIŃSKA M. (1994)
Characteristics of the European bison populations in the Polish and Belarussian parts of the Białowieża Forest
Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody 13: 25-67
- KRASIŃSKI, Z.A., KRASIŃSKA M., BUNEVICH A.M. (1999)
Free-ranging populations of lowland European bison in the Białowieża Forest
Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody 18: 23-75
- KRASIŃSKI Z.A., KRASIŃSKA M. (2007)
European bison the nature monograph
Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, Białowieża, Polen, pp: 1-317
- KRASIŃSKI Z.A., KRASIŃSKA M. (2010)
Course and dispersion of the posthitis/balanoposthitis in males of the European bison in the Polish part of Białowieża Forest
Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody 29(2): 107-128
- KRASOCHKO P.A., KRASOCHKO I.A. (2004)
Ecological and veterinary aspects of European bison in Belarus
Biznesofset, Minsk, 294 pp.
- KUROIWA A., HISATSUNE A., ISOHAMA Y., KATSUKI H. (2009)
Bacterial neuraminidase increases IL-8 production in lung epithelial cells via NFkappaB-dependent pathway
Biochem Biophys Res Commun 379 (3): 754-759

LÄMMLER C. (1990)

Untersuchungen zu möglichen Pathogenitätsfaktoren von *Actinomyces pyogenes* –
Übersichtsreferat

Berl Münch Tierarztl Wochenschr 103(4): 121-125

LÄMMLER C., BLOBEL H. (1988)

Comparative studies on *Actinomyces pyogenes* and *Arcanobacterium haemolyticum*
Med Microbiol Immunol 177(2): 109-114

LAWSON P.A., FALSEN E., FOSTER G., ERIKSSON E., WEISS N., COLLINS M.D.
(2001)

Arcanobacterium pluranimalium sp. nov., isolated from porpoise and deer
Int J Syst Evol Microbiol 51(1): 55-59

LEE, S., LYNCH K.R. (2005)

Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates
lysophosphatidic acid (LPA)

Biochem J 391(2): 317-323

LEHNEN A., SPECK S., WIBBELT G., SPERGSER J., NORDHOFF M., WIELER L.,
ROSENGARTEN R., FRÖLICH K. (2003)

Bacteriological Aspects of Balanoposthitis in European Bison (*Bison bonasus*) in Białowieża,
Poland

Verh ber Erkrgr Zootiere 41: 161-164

LEHNEN A. (2005)

Bakteriologische Aspekte der Balanoposthitis beim Wisent (*Bison bonasus*) –
Erstbeschreibung der Spezies *Arcanobacterium bialowiezense* und *Arcanobacterium bonasi*
Dissertation, Freie Universität Berlin, Mensch & Buch Verlag, Journal-Nr.: 2939

LEHNEN A., BUSSE H.J., FRÖHLICH K., KRASINSKA M., KÄMPFER P., SPECK S.
(2006)

Arcanobacterium bialowiezense sp. nov. and *Arcanobacterium bonasi* sp. nov., isolated from
the prepuce of European bison bulls (*Bison bonasus*) suffering from balanoposthitis, and
emended description of the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1983.

Int J Syst Evol Microbiol 56(4): 861-866

LEVY C.E., PEDRO R.J., VON NOWAKONSKI A., HOLANDA L.M., BROCCHI M.,
RAMO M.C. (2009)

Arcanobacterium pyogenes sepsis in farmer, Brazil

Emerg Infect Dis 15(7): 1131-1132

LEWIS A.L., LEWIS W.G. (2012)

Host sialoglycans and bacterial sialidases: a mucosal perspective

Cell Microbiol (8):1174-1182

LI C., KURNIYATI, HU B., BIAN J., SUN J., ZHANG W., LIU J., PAN Y., LI C. (2012)

Abrogation of neuraminidase reduces biofilm formation, capsule biosynthesis, and virulence
of *Porphyromonas gingivalis*

Infect Immun 80(1): 3-13

- LIAN C.-J., ROSENDAL S., MCINNES J.I.(1989)
Molecular Cloning and Characterization of a Hemolysin Gene from *Actinobacillus*
(*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*
Infect Immun 57(11): 3377-3382
- LINDER R. (1997)
Rhodococcus equi and *Arcanobacterium haemolyticum*: Two “Coryneform“ Bacteria
Increasingly Recognized as Agents of Human Infection
Emerg Infect Dis 3(2): 145-153
- LITWIN C.M., JOHNSON J.M. (2005)
Identification, cloning, and expression of the CAMP-like factor autotransporter gene (cfa) of
Bartonella henselae
Infect Immun 73(7): 4205-4013
- LOÏEZ C., TAVANI F., WALLET F., FLAHAUT B., SENNEVILLE E., GIRARD J.,
COURCOL R.J. (2009)
An unusual case of prosthetic joint infection due to *Arcanobacterium bernardiae*
J Med Microbiol 58(6): 842-843
- LUCAS E.A. (2009)
Identification and characterization of *Arcanobacterium haemolyticum* virulence factors
Dissertation, The University of Arizona, Tucson, Microbiology, ProQuest, USA
- LUCAS E.A., BILLINGTON S.J., CARLSON P., MCGEE D.J., JOST B.H. (2010)
Phospholipase D promotes *Arcanobacterium haemolyticum* adhesion via lipid raft remodeling
and host cell death following bacterial invasion
BMC Microbiol 10:270
- LUENSER K., FICKEL J., LEHNEN A., SPECK S., LUDWIG A. (2005)
Low level of genetic variability in European bison (*Bison bonasus*) from Białowieża
National Park in Poland
Eur J Wildl Res 51(2): 84-87
- LUENSER K., LUDWIG A. (2005)
Variability and evolution of bovine beta-defensin genes
Genes Immun 6(2): 115-122
- LUKONG K.E. , ELSLIGER M.-A., CHANG Y. RICHARD C., THOMAS G., CAREY W.,
TYLKI-SZYMANSKA A., CZARTORYSKA B., BUCHHOLZ T., CRIADO G.R.,
PALMERI S., PSHEZHETSKY A.V. (2000)
Characterization of the sialidase molecular defects in sialidosis patients suggests the structural
organization of the lysosomal multienzyme complex
Hum Mol Genet 9(7): 1075-1085
- LUNDBLOM K., JUNG K., KALIN M. (2010)
Lemierre syndrome caused by co-infection by *Arcanobacterium haemolyticum* and
Fusobacterium necrophorum
Infection 38(5): 427-429

- MACHANG U R.S., PRESCOTT J.F. (1991)
Purification and properties of cholesterol oxidase and choline phosphohydrolase from *Rhodococcus equi*
Can J Vet Res 55(4): 332-340
- MACFARLANE M.G., KNIGHT B.C.J.G. (1941)
The biochemistry of bacterial toxins: the lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins
Biochem J 35: 884-902
- MACLEAN P.D., LIEBOW A.A., ROSENBERG A.A. (1946)
A haemolytic corynebacterium resembling *Corynebacterium ovis* and *Corynebacterium pyogenes* in man
J Infect Dis 79: 69-90
- MAY M., KLEVEN S.H., BROWN D.R. (2007)
Sialidase activity in *Mycoplasma synoviae*
Avian Dis 51(4): 829-833
- MCKEAN S.C., DAVIES J.K., MOORE R.J. (2007)
Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death
Microbiology 153(7): 2203-2211
- MCCULLERS J.A., BARTMESS K.C. (2003)
Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*
J Infect Dis 187(6): 1000-1009
- MCNAMARA P.J., CUEVAS W.A., SONGER J.G. (1995)
Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology
Gene 156 (1): 113-118
- MENGAUD J., VICENTE M.F., COSSART P. (1989)
Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes* hlyA region reveal structural features that may be involved in regulation
Infect Immun 57(12): 3695-3701
- MONCLA B.J., BRAHAM P. (1989)
Detection of sialidase (neuraminidase) activity in *Actinomyces* species by using 2'-(4-methylumbelliferyl) alpha-D-N-acetylneuraminic acid in a filter paper spot test
J Clin Microbiol 27(1): 182-184
- MOORE R., MIYOSHI A., PACHERO L.G.C, SEYFFERT N., AZEVEDO V. (2010)
Chapter 8: *Corynebacterium* and *Arcanobacterium*
In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition
C.L. Gyles, J.F. Prescott, G. Songer, C.O. Thoen (Hrsg.)
Blackwell Publishing, Ames, IA, USA, pp. 133-148

MORRISON J.R.A., TILLOTSON G.S. (1988)

Identification of *Actinomyces (Corynebacterium) pyogenes* with the API 20 Strep System
J Clin Microbiol 26(9): 1865-1866

MOUSTAFA I., CONNARIS H., TAYLOR M., ZAITSEV V., WILSON J.C., KIEFEL M.J.,
VON ITZSTEIN M., TAYLOR G. (2004)

Sialic acid recognition by *Vibrio cholerae* neuraminidase
J Biol Chem 279(39): 40819-40826

MÜLLER M., PLATZ S., EHRLEIN J., EWRINGMANN T., MÖLLE G., WEBER A.
(2005)

Bacterially conditioned thromboembolism in dairy cows – a retrospective study of 31
necropsy cases with special consideration of the causative complex
Berl Münch Tierarztl Wochenschr 118(3-4): 121-127

MYERS R.W., LEE R.T., LEE Y.C., THOMAS G.H., REYNOLDS L.W., UCHIDA Y.
(1980)

The synthesis of 4-methylumbelliferyl α -ketoside of N-acetylneuraminic acid and its use in a
fluorometric assay for neuraminidase
Anal Biochem 101(1): 166-174

NAKAZAWA M., NEMOTO H. (1980)

Synergistic hemolysis phenomenon of *Listeria monocytogenes* and *Corynebacterium equi*
Nihon Juigaku Zasshi 42(5): 603-607

NARAYANAN S., NAGARAJA T.G., WALLACE N., STAATS J., CHENGAPPA M.M.,
OBERST R.D. (1998)

Biochemical and ribotypic comparison of *Actinomyces pyogenes* and *A. pyogenes*-like
organisms from liver abscesses, ruminal wall, and ruminal contents of cattle
Am J Vet Res 59(3): 271-276

NETER E. (1956)

Bacterial Hemagglutination and Hemolysis
Bacteriol Rev 20(3): 166-188

NETTLES V.F., QUIST C.F., LOPEZ R.R., WILMERS T.J., FRANK P., ROBERTS W.,
CHITWOOD S., DAVIDSON W.R. (2002)

Morbidity and mortality factors in key deer (*Odocoileus virginianus clavium*)
J Wildl Dis 38(4): 685-692

O'BRIAN S.J., EVERMAN J.F. (1988)

Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations
Trends Ecol Evol 3(10): 254-259

OLECH W. (1987)

Analysis of inbreeding in European Bison
Acta Theriol 32: 337-387

OLECH W., PERZANOWSKI K. (2002)

A genetic background for reintroduction program of the European bison (*Bison bonasus*) in the Carpathians

Biol Conserv 108(2): 2221-2228

OLIVEIRA D.G., TOYOMA M.H., NOVELLO J.C., BERIAM L.O., MARANGONI S. (2002)

Structural and functional characterization of basic PLA2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom

J Protein Chem 21(3): 161-168

OLMSTEDT S.S., MEYN L.A., ROHAN L.C., HILLIER S.L. (2003)

Glycosidase and proteinase activity of anaerobic gram-negative bacteria isolated from women with bacterial vaginosis

Sex Transm Dis 30(3): 257-261

PARKER D., SOONG G., PLANET P., RATNER A.J., PRINCE A. (2009)

The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation

Infect Immun 77(9): 3722-3730

PETIT T., SPERGSEER J., ROSENGARTEN R., AURICH J. (2009)

Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle

Reprod Domest Anim 44(1): 88-91

PIETROCOLA G., VALTULINA V., RINDI S., JOST B.H., SPEZIALE P. (2007)

Functional and structural properties of CbpA, a collagen-binding protein from *Arcanobacterium pyogenes*

Microbiology 153: 3380-3389

PIUSIŃSKI W., BIELECKI W., MALICKA E., KITA J., DZIABA K., OSIŃSKA B.,

ANUSZ L., KOWALSKI B., LENARTOWICZ-KUBRAT Z., (1997)

Pathomorphology and pathogenesis of diseased genital organs (prepuce and penis) of Bisons in the Białowieża Primeval Forest

Medycyna Weterinarna 53: 569-600

PLAMONDON M., MARTINEZ G., RAYNAL L., TOUCHETTE M., VALIQUETTE L. (2007)

A fatal case of *Arcanobacterium pyogenes* endocarditis in a man with no identified animal contact: case report and review of the literature (Review)

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26(9): 663-666

POPOW J., ENGLERT M., WEITZER S., SCHLEIFFER A., MIERZWA B., MECHTLER

K., TROWITZSCH S., WILL C.L., LÜHRMANN R., SÖLL D., MARTINEZ J. (2011)

HSPC117 is the essential subunit of a human tRNA splicing ligase complex

Science 331(6018): 760-764

POTIER M., MAMELI L., BÉLISLE M., DALLAIRE L., MELANCON S. B. (1979)

Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic) substrate

Anal Biochem 94(2): 287-296

POLEKHINA G., FEIL S.C., TANG J., ROSSJOHN J., GIDDINGS K.S., TWETEN R.K., PARKER M.W. (2006)

Comparative three-dimensional structure of cholesterol-dependent cytolysins

In: J.E. Alouf, M.R. Popoff (Hrsg.): The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, Third edition

Academic Press, Elsevier Ltd., Burlington, MA, USA, pp. 659-670

POPOFF M.R. (2005)

Bacterial Exotoxins

Contrib Microbiol Basel, Karger 12: 28-54

POPOW J., SCHLEIFFER A., MARTINEZ J. (2012)

Diversity and roles of (t)RNA ligases

Cell Mol Life Sci 69(16): 2657-2670

PORTAS T.J., BRYANT B.R. (2005)

Morbidity and mortality associated with *Arcanobacterium pyogenes* in a group of captive blackbuck (*Antilope cervicapra*)

J Zoo Wildl Med 36(2): 286-289

PRASAD B.N., KEMPARAJU K., BHATT K.G., GOWDA T.V. (1996)

A platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 from Russell's viper (*Vipera russelli*) venom: isolation and characterization

Toxicon 34(10): 1173-1185

PRESCOTT J.F. (1991)

Rhodococcus equi: an animal and human pathogen

Clin Microbiol Rev 4(1): 20-34

PRIEMEL K. (1923)

Einleitendes Referat. Berichte der Internationalen Gesellschaft zur Erhaltung des Wisents.

Band 1, Heft 1: 3-10

PUCEK, Z. (1986)

Bison bonasus (Linnaeus, 1758) – Wisent

In: Handbuch der Säugetiere Europas 2/II Paarhufer. J. Niethammer, F. Krapp (Hrsg.)

Aula Verlag, Wiesbaden, Germany, pp. 278-315

PUCEK, Z. (1989)

Die Rettung des Wisents – Probleme der Erhaltung einer Art

In: Die Illusion der Arche Noah. Gefahren für die Arterhaltung durch Gefangenschaftszucht

E. Schneider, H. Oelke, H. Grog (Hrsg.), Echo-Verlag, Göttingen, pp. 249-268

PUCEK Z., BELOUSOVA I.P., KRASIŃSKA M., KRASIŃSKI Z.A., OLECH W. (2004)

European Bison. Status survey and Conservation Action Plan

In: Z. Pucek (Hrsg.) IUCN/SSC Bison Specialist Group. Gland IUCN, p. 55

QIAO X., WU F.F., SU P., LI Q.W. (2010)

Research progress on the MACPF/CDC family of pore-forming toxins (Review)

Yi Chuan 32(11): 1126-1132

- RACZYNSKI J. (1981)
Wiedereinbürgerung des Wisents in Europa
Natur und Landschaft 65(4): 115-117
- RADWAN J., KAWAŁKO A., WÓJCIK M., BABIK W. (2007)
MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*
Mol Ecol 16(3): 531-540
- RAMACHANDRAN R., HEUCK A.P., TWETEN R.K., JOHNSON A.E. (2002)
Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin
Nature Structural Biology 9(11): 823-827 Zitat im Text nicht gefunden
- RAMOS C.P., FOSTER G., COLLINS M.D. (1997)
Phylogenetic Analysis of the Genus *Actinomyces* Based on 16S rRNA Gene Sequences: Description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov.
Int J Syst Bacteriol 47(1): 46-53
- RATLEDGE C. (2007)
Iron metabolism and infection (Review)
Food Nutr Bull 28(4): 515-523
- REDDY C.A., CORNELL C.P., FRAGA A.M. (1982)
Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Ebersson to the Genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb. nov.
Int J Syst Bacteriol 32(4): 419-429
- REIS O., SOUSA S., CAMEJO A., VILLIERS V., GOUIN E., COSSART P., CABANES D. (2010)
LapB, a novel *Listeria monocytogenes* LPXTG surface adhesin, required for entry into eukaryotic cells and virulence
J Infect Dis 202(4): 551-562
- REINHOLDT J., TOMANA M., MORTENSEN S.B., KILIAN M. (1990)
Molecular aspects of immunoglobulin A1 degradation by oral streptococci
Infect Immun 58(5): 1186-1194
- ROBERTS R.J. (1968)
A study of the haemolysin of *Corynebacterium pyogenes*
Res Vet Sci 9(4): 350-353
- ROBERTS D.S. (1967)
The pathogenic synergy of *Fusioformis necrophorus* and *Corynebacterium pyogenes*
I. Influence of the leucocidal exotoxin of *F. necrophorus*
Br J Exp Pathol 1967 48(6): 665-673

- ROGGENTIN P., ROTHE B., KAPER J.B., GALEN J., LAWRISUK L., VIMR E., SCHAUER R. (1989)
Conserved Sequences in Bacterial and Viral Sialidases
Glycoconjugate J 6(3): 349-353
- ROGGENTIN P., SCHAUER R., HOYER L.L., VIMR E.R. (1993)
The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer
Mol Microbiol 9: 915-921
- ROLLE M., MAYR A. (2006)
Medizinische Mikrobiologie und Seuchenlehre. 8. Auflage
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp. 1-639
- ROPPEL M.K., CAMPERO C.M. (1998)
Acción de *Actinomyces pyogenes* en el tracto reproductor bovino
Revista Therios 27: 14-20
- ROSADO C.J., KONDOS S., BULL T.E., KUIPER M.J., LAW R.H., BUCKLE A.M., VOSKOBOINIK I., BIRD P.I., TRAPANI J.A., WHISSTOCK J.C., DUNSTONE M.A. (2008)
The MACPF/CDC family of pore-forming toxins (Review)
Cell Microbiol 10(9): 1765-1774
- ROSENBAUM A., GUARD C.L., NJAA B.L., MCDONAGH P.L., SCHULTZ C.A., WARNICK L.D., WHITE M.E. (2005)
Slaughterhouse survey of pyelonephritis in dairy cows
Vet Rec 157(21): 652-655
- ROTH J., KEMPF A., REUTER G., SCHAUER R., GEHRING W.J. (1992)
Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*
Science 256(5057): 673-675
- RUDNICK S.T., JOST B.H., SONGER J.G., BILLINGTON S.J. (2003)
The gene encoding pyolysin, the pore-forming toxin of *Arcanobacterium pyogenes*, resides within a genomic islet flanked by essential genes
FEMS Microbiology Letters 225(2): 241-247
- SAMBROOK J., RUSSELL D.W. (Hrsg.) (2001)
Molecular Cloning: A Laboratory manual, Third edition
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp. 729-730
- SANTOS T.M., CAIXETA L.S., MACHADO V.S., RAUF A.K., GILBERT R.O., BICALHO R.C. (2010)
Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Arcanobacterium pyogenes* isolated from the uterus of postpartum dairy cows
Vet Microbiol 145(1-2): 84-89
- SCHAUER R. (1985)
Sialic acids and their role as biological masks
Trends Biochem Sci 10: 375-360

SCHAUFUSS P., LÄMMLER C. (1988)

Characterization of Extracellular Neuraminidase Produced by *Actinomyces pyogenes*
Zbl Bakt 271: 28-35

SCHAUMBURG J. (2003)

Identifizierung und Charakterisierung von Oberflächenproteinen des Gram-positiven
Bakteriums *Listeria monocytogenes*
Dissertation, Journal-Nr.: DOI: oclc/76569132, Technische Universität Braunschweig

SCHENKMAN S., EICHINGER D., PEREIRA M.E., NUSSENZWEIG V. (1994)

Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase
Annu Rev Microbiol 48: 499-523

SCHILDGER B.-J., WEISS R., FRANK H., HERBST W., KREISEL N. (1996)

Investigations on a reproductive disease in male European bison (*Bison bonasus*) in
Bowejskaia-Pusca National Park/CIS
Proceedings of European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians (EAZWV) 1: 247–
252

SCHNEEWIND O., MIHAYLOVA-PETKOV D., MODEL P. (1993)

Cell wall sorting signals in surface proteins of Gram-positive bacteria
EMBO J 12: 4083-4811

SEIMIYA Y.M., TAKAHASHI M., TAMURA T., MURAKAMI R., HARITANI M.,
KIMURA K.M. (2004)

Fibrinonecrotic rhinitis caused by a concurrent infection of *Fusobacterium necrophorum* and
Arcanobacterium pyogenes in a cow
J Vet Med Sci 66(8): 985-987

SHATURSKY O., HEUCK A.P., SHEPARD L.A., ROSSJOHN J., PARKER M.W.,
JOHNSON A.E., TWETEN R.K. (1999)

The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel
paradigm for pore-forming toxins
Cell 99(3): 293-299

SILVA E., GAIVÃO M., LEITÃO S., JOST B.H., CARNEIRO C., VILELA C.L., LOPES
D.A., COSTA L., MATEUS L. (2008)

Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of
dairy cows with normal puerperium or clinical metritis
Vet Microbiol 132(1-2): 111-118

SKOV R.L., SANDEN A.K., DANHELL V.H., ROBERTSEN K., EJLERTSEN T. (1998)

Systemic and deep-seated infections caused by *Arcanobacterium haemolyticum*
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17(8): 578–582

SLATIS H.M. (1960)

An analysis of inbreeding in the European bison
Genetics 45(3): 275-287

- SMOLA J., KATEROV V., SCHALÉN C. (1994)
Haemolytic and phospholipase C (PLC) activities of *Rhodococcus equi*
J Appl Bacteriol 77(3): 325-333
- SONGER J.G. (1997)
Bacterial phospholipases and their role in virulence. (Review)
Trends Microbiol 5(4): 156-161
- SONGER J.G., LIBBY S.J., IANDOLO J.J., CUEVAS W.A. (1990)
Cloning and Expression of the Phospholipase D Gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*
Infect Immun 58(1): 131-136
- SONGER J.G., POST K.W. (2005)
Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease
Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, pp. 1-448
- SOONG G., MUIR A., GOMEZ M.I., WAKS J., REDDY B., PLANET P., SINGH P.K.,
KANETO Y., WOLFGANG M.C., HSIAO Y., TONG L., PRINCE A. (2006)
Bacterial Neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production
J Clin Invest 116(8): 2297-2305
- SOUTHERN E.M. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis
J Mol Biol 98: 503-517
- SPECK S., KRASIŃSKA M., LEHNEN A. (2006)
Normal vaginal micro flora of free-ranging European bison (*Bison bonasus*)
Vet Rec 159(18): 600-601
- STACEY A., BRADLOW A. (1999)
Arcanobacterium haemolyticum and *Mycoplasma pneumoniae* co-infection
J Infect 38(1): 41-42
- SUGITA H., SHINAGAWA Y., OKANO R. (2000)
Neuraminidase-producing ability of intestinal bacteria isolated from coastal fish
Letters in Applied Microbiology 31(1): 10-13
- TABATA T., KORNBERG T.B. (1994)
Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs
Cell 76(1): 89-102
- TAMBOURGI D.V., DE SOUSA DA SILVA M., BILLINGTON S.J., GONCALVES DE
ANDRADE R.M., MAGNOLI F.C., SONGER G., VAN DEN BERG C.W. (2002)
Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial
sphingomyelinases
Immunology 107(1): 93-101

- TAN T.Y., NG S.Y., THOMAS H., CHAN B.K. (2006)
Arcanobacterium haemolyticum bacteraemia and soft-tissue infections: case report and review of the literature
J Infect 53(2): 69-74
- TANAKA N., CHAKRAVARTY A.K., MAUGHAN B., SHUMAN S. (2011a)
Novel mechanism of RNA repair by RtcB via sequential 2',3'-cyclic phosphodiesterase and 3'-Phosphate/ 5'-hydroxyl ligation reactions
J Biol Chem 286(50):43134-43143
- TANAKA N., MEINEKE B., SHUMAN S. (2011b)
RtcB, a novel RNA ligase, can catalyze tRNA splicing and HAC1 mRNA splicing in vivo
J Biol Chem 286(35): 30253-30257
- TANAKA N., SHUMAN S. (2011)
RtcB is the RNA ligase component of an *Escherichia coli* RNA repair operon
J Biol Chem 286(10): 7727-7731
- TAYLOR G. (1996)
Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential
Curr Opin Struct Biol 6(6): 830-837
- TERRIAULT B.L., DANIELS L.M., CARTER Y.L., RAASCH R.H. (2008)
Severe sepsis caused by *Arcanobacterium haemolyticum*: a case report and review of the literature (Review)
Ann Pharmacother 42(11): 1697-1702
- THIEDE S., SPERGSER J., ROSENGARTEN R., JAKOB W., STREICH W.J., KRASINSKA M., FRÖLICH K. (2002)
Antibodies against *Mycoplasma bovis* in free-living European Bison (*Bison bonasus*) with balanoposthitis
J Wildl Dis 38(4): 760-763
- THOMPSON H., HOMER K.A., RAO S., BOOTH V., HOSIE A.H.F. (2009)
An Orthologue of *Bacteroides fragilis* NanH Is the Principal Sialidase in *Tannerella forsythia*
J Bacteriol 191(11): 3623-3628
- TITBALL R.W., BASAK A.K. (2006)
Membrane-damaging and cytotoxic phospholipases
In: J.E. Alouf, M.R. Popoff (Hrsg.), The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, Third edition
Academic Press, Elsevier Ltd., Burlington, MA, USA, pp. 516-534
- TODAR K. (2010)
Todar's online textbook of Bacteriology
University of Wisconsin-Madison, www.textbookofbacteriology.net

- TON-THAT H, MAZMANIAN SK, ALKSNE L, SCHNEEWIND O. (2002)
Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus* – Cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis
J Biol Chem 277(9): 7447-7452
- TRUETT A.P. 3rd, KING L.E. Jr. (1993)
Sphingomyelinase D: a pathogenic agent produced by bacteria and arthropods
Adv Lipid Res 26: 275-291
- TÜRCKE F. (1980)
Erhaltung und Zucht der Wisente in Deutschland
Dtsch Tierärztl Wschr 87(11): 416-419
- TWETEN R.K. (1988)
Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Perfringolysin O (Theta-Toxin) Gene from *Clostridium perfringens* and Characterization of the Gene Product
Infect Immun 56(12): 3228-3234
- TWETEN R. (2005)
Cholesterol-Dependent Cytolysins, a Family of Versatile Pore-Forming Toxins (Minireview)
Infect Immun 73(10): 6199-6209
- TWOMEY D.F., BOON J.D., SAYERS G., SCHOCK A. (2010)
Arcanobacterium pyogenes septicemia in a southern pudu (*Pudu puda*) following uterine prolapse
J Zoo Wildl Med 41(1): 158-160
- TYRRELL K.L., CITRON D.M., JENKINS J.R., GOLDSTEIN E.J. (2002)
Periodontal bacteria in rabbit mandibular and maxillary abscesses
J Clin Microbiol 40(3): 1044-1047
- UCHIYAMA S., CARLIN A.F., KHOSRAVI A., WEIMAN S., BANERJEE A., QUACH G., HIGHTOWER G., MITCHELL T.J., DORAN K., NIZET V. (2009)
The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion
J Exp Med 206(9): 1845-1852
- ÜLBEGI H. (2010)
Phäno- und Genotypisierung von Bakterien des Genus *Arcanobacterium* unter besonderer Berücksichtigung von *Arcanobacterium phocae*
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen, VVB Laufersweiler Verlag
- ÜLBEGI-MOHYLA H., HASSAN A. A., KANBAR T., ALBER J., LÄMMLER C., PRENGER-BERNINGHOFF E., WEISS R., SIEBERT U., ZSCHÖCK M (2009)
Synergistic and antagonistic hemolytic activities of bacteria of genus *Arcanobacterium* and CAMP-like hemolysis of *Arcanobacterium phocae* and *Arcanobacterium haemolyticum* with *Psychrobacter phenylpyruvicus*
Res Vet Sci 87(2): 186-188

ÜLBEGI-MOHYLA H., HIJAZIN M., ALBER J., LÄMMLER C., HASSAN A.A., ABDULMAWJOOD A., PRENGER-BERNINGHOFF E., WEISS R., ZSCHÖCK M. (2010a)

Identification of *Arcanobacterium pyogenes* isolated by post mortem examinations of a bearded dragon and a gecko by phenotypic and genotypic properties
J Vet Sci 11(3): 265-267

ÜLBEGI-MOHYLA H., HASSAN A.A., ALBER J., LÄMMLER C., PRENGER-BERNINGHOFF E., WEISS R., ZSCHÖCK M. (2010b)

Identification of *Arcanobacterium pluranimalium* isolated from a dog by phenotypic properties and by PCR mediated characterization of various molecular targets
Vet Microbiol 142(3-4): 458-460

VASQUEZ-BOLAND J.A., KUHN M., BERCHE P., CHAKRABORTY T., DOMINGUEZ-BERNAL G., GOEBEL W., GONZALEZ-ZORN B., WHLAND J., KREFT J. (2001)

Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants
Clin Microbiol Rev 14(3): 584-640

VIMR E.R. (1994)

Microbial sialidases: does bigger always mean better?
Trends Microbiol 2(8): 271-277

VIMR E.R., LAWRSIUK L., GALEN J., KAPER J.B. (1988)

Cloning and expression of the *Vibrio cholerae* neuraminidase gene *nanH* in *Escherichia coli*
J Bacteriol 170(4): 1495-1504

VOGELSTEIN B., GILLESPIE D. (1979)

Preparative and analytical purification of DNA from agarose
Proc Natl Acad Sci 76(2): 615-619

WAAGE S., MØRK T., RØROS A., AASLAND D., HUNSHAMAR A., ODEGAARD S.A. (1999)

Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers
J Dairy Sci 82(4): 712-719

WALKER J.A., ALLEN R.L., FALMAGNE P., JOHNSON M.K., BOULNOIS G.J. (1987)

Molecular Cloning, Characterization, and Complete Nucleotide Sequence of the Gene for Pneumolysin, the Sulphydryl-Activated Toxin of *Streptococcus pneumoniae*
Infect Immun 55(5): 1184-1189

WALZ T. (2005)

How cholesterol-dependent cytolysins bite holes into membranes
Mol Cell 18(4): 393-394

WHELAN S., GOLDMAN N. (2001)

A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach
Mol Biol Evol 18(5): 691-699

- WINN W.C., ALEN S., JANDA W., KONEMAN E.W., PROCOP G., SCHRECKENBERGER P., WOODS G. (2005)
Chapter 5: Medical Microbiology: Taxonomy, Morphology, Physiology, and Virulence
In: W.C. Winn, E.W. Koneman (Hrsg). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic Microbiology; Sixth Edition
Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, pp. 166-210
- WOLF O., JAKOB H., SCHRÖDER H.-D., NATTERMANN H., RUDOLPH M., LANGE A., BORCHERS K., FRÖLICH K. (2000)
Balanoposthitis bei Wisenten (*Bison bonasus*) im Urwald von Białowieża (Polen)
Tierärztl Prax 28(G): 218-224
- WÓJCIK J.M., KAWAŁKO A., TOKARSKA M., JAAROLA M., VALLENBACK P., PERTOLDI C. (2009)
Post-bottleneck mtDNA diversity in a free-living population of European bison: implications for conservation
Journal of Zoology 277(1): 81-87
- WRÓBLEWSKI K. (1925)
Der Wisent in der Białowies-Heide
Berichte der Internationalen Gesellschaft zur Erhaltung des Wisents, Band 1, Heft 3: 75-84
- XU G., RYAN C., KIEFEL M.J., WILSON J.C., TAYLOR G.L. (2009)
Structural studies on the *Pseudomonas aeruginosa* sialidase-like enzyme PA2794 suggest substrate and mechanistic variations
J Mol Biol 386(3): 828-840
- YASAWONG M., TESHIMA H., LAPIDUS A., NOLAN M., LUCAS S., GLAVINA DEL RIO T., TICE H., CHENG J.F., BRUCE D., DETTER C., TAPIA R., HAN C., GOODWIN L., PITLUCK S., LIOLIOS K., IVANOVA N., MAVROMATIS K., MIKHAILOVA N., PATI A., CHEN A., PALANIAPPAN K., LAND M., HAUSER L., CHANG Y.J., JEFFRIES C.D., ROHDE M., SIKORSKI J., PUKALL R., GOKER M., WOYKE T., BRISTOW J., EISEN J.A., MARKOWITZ V., HUGENHOLTZ P., KYRPIDES N.C., KLENK H.P. (2010)
Complete genome sequence of *Arcanobacterium haemolyticum* type strain (11018)
Stand Genomic Sci 3(2): 126-135
- YASSIN A.F., HUPFER H., SIERING C., SCHUMANN P. (2011)
Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehnen et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*
Int J Syst Evol Microbiol 61(6): 1265-1274
- YEUNG M.K., FERNANDEZ S.R. (1991)
Isolation of a neuraminidase gene from *Actinomyces viscosus* T14V
Appl Environ Microbiol 57(11): 3062-3069
- YOUNUS F., CHUA A., TORTORA G., JIMENEZ V.E. (2002)
Lemierre's disease caused by co-infection of *Arcanobacterium haemolyticum* and *Fusobacterium necrophorum*: a case report
J Infect 45(2): 114-117

- <http://www.bialowieza-info.eu/de/nationalpark.php> (2012)
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- http://web.expasy.org/compute_pi/ (2012)
- <http://www.iucn.org> (2008)
- <http://www.iucnredlist.org/> (2012)
- <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- <http://www.naturschutzrecht-online.de/datenbanken/gesetze/Gesetze/showLawVersion?id=401> (2012)
- <http://www.staff.amu.edu.pl/~zbow/ph/pnp/bial.htm> (2010)
- <http://isoelectric.ovh.org/> (2012)
- <http://whc.unesco.org/en/list/33> (2012)
- <http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/>

ANHANG C:

Nukleotidsequenz des Inserts des Neuraminidase-positiven *T. bonasi*-Klons bon/cos6A/pJET4A

Insert-Länge = 5037 bp; ORF UPF-Protein = 1161 bp; ORF Sialidase = 3312 bp

TTcgatCGCCTTCCCCaCaAggccCGATCTcgccTcTgAcTGGACGGTTGGTTTTCTGGGTcAAAGCCCCAACGGC
 ACACGACAATCAAAACATTCTTGTAGTCTCCGATGGCGTCCGAGCCTTCTCGCAGGAATCAATAGTGAGAAGGG
 CGACAAG **TTGGAAATGTACGTCGGC**CCTGACACCGGTTGGCTTCCTTACTTACGGGTCCACACTTCCGGATAACGA
 GTGGACTCACATCAGTGGACGCAAAAGTTCAACTGAAGGCCTGTCACTTTACGTCGATGGCCAGCTACGCGAAAA
 CAAGACTTGGTCTGTTCAAAACCAATCACGATTCTTCCGCAAGCTCGGAGGCAAAGGTTTTCAGCGGCCTCGT
 CGATGAATAAAAATCTACAAACCGGGCCTCACGGCCGACAGAGTTTCCGGCATCGATCGACGCTCTAGAGCTCCC
 AGAGCTCCCGCCGCCAAAACCTCAACGCAACATTTTCTATCATGAATCCGAAACCCGAAGCGCGAGCCTTCA
 AGTGGGTGAAACTATCCGGTTCGAGCTTAAAGTACGAATGATACCGGCATCGATCGCTCATTGATCCACGGC
 TTCGAACCTCGATAACTGGCGCGGATGCAAAATGGAGCGCGCTACGCGCCGGCGATACGCACTCGTCCGCTTCCC
 CACGACACCGTACTGATGAGGACGTCAGGCGAGCGGATTCACGCCAGCATCACATCCAGATTTACGATCG
 CACCGGCTACTCTGGCCCTGCAACGCGCGCGCACCCCTTCGAGGGTAATCCGGTAGGCGTATCTCCACGCCTCGT
 CACAATCAACAATTTGAGTTCACGGCAGGGACGAATAAGACAAATTACAGCGCCGGGATGAACCTCACTGCCTC
 GCTGACACTCAAATGCTTCGATGAAACGATGAACGTTGACGCTGTCGTCAGTACGCGGCTTAAAGTGTTCGGCGC
 TATCTCCCGGGATCTCTCTCACGTTGATTCATTGACCTACTCGGTGACCCGCGAAGATTTGGAGCGCGGTCA
 AGCCGAGCTGAGCGTCTGATGATGGCTCATCTGGCGAGCTCACTGGAACCTGCAACAGTACCCGCAACCCAGCC
 TACACCACACCGTGGCCGACGCGCACGCCATCTCCCTGCGCCAAACCGGATCTCCGCTTGGCCGCTGAGCATC
 GGATCTGACGAAGGTTGAAACTCACGTGCCGGCGAGATACAACATTCGATTCAGCAATTTGCCGAGCACCCAA
 CGCGACATTCGCGACTGTAGCTTACCTGCGCCCAACTAATGGCGGGGAGCGCGGAGCTCCGCAACGAAAA
 CTCATCGTTTACGCGTGGTCAAAGATGCGCGTAAAACCTTGGGGCTTACGACAAATTCGCAAGTTCGCAAGCCG
 CGCACCCGAAGGACAACGTTATGGTTGGTCTGACCCGTCGTACGTCGTCGATCACGAAACCGGGGAAATCTTCAA
 CTCTCTTTGGGTTCTCTCGACCGGGTTTCCGCAACACCCCTCTCAAGATAGACGAAACCGGACAGGTGGA
 TGAAGCCATTCGCGCAGTGAATTTACCGTCCGCAACTCGACGACAAACCGCTACACCTGGAAGTTGGCCAC
 AATCACGAACGAGCTGCTCGGCGAGCGTGCAGCAGAGCTTACAGGCTGTTTCGCAACGTCGCGTGCAGGCATA
 AAGACACGACGACCCGACAAAGGGCGTCTGCTCCAACAAGCCGCTGTGCGCATAGGATGGCGGATTCGCGCC
 CTTAACGATCTCTCAGATGACCAACGCAAGCCCTGGCAAAGCGGCAATTTCCGCTCTGCCACGAGGGCGCCCA
 GTTTTTCCGCTGGAATATGACGAAAACAAGGTGCGCGAACTTTCCGATGGCCGCTCATGCTCAATTCGCGCAT
 TCCACCGGTTCCACAGCGGCTGGCTACCGCCTCGTCGCAATCTCGGAAGACGGCGCATGAATGGGGAGAGTA
 TCGTATCGATGAGCAATTCAGGATTTCCAGAAATGCAACAATGCTCTCCGCGTTCCCGACGGGACAAAGG
 AACATTTGCGTTCGAAAGTTCTGTGTTCTCGAACAACAAAGAAATCATTTGAAACCCGCTCAACGGTCAAGTGT
 GTCTTACGACGACGGCGGCTTGGCCCGTGTCTAAGCAGGTTGCGACGGCGGAACCGGTTACACCACGATGGC
 TGTTCAACAGGTTGGACAATTTGGTCTGCTGATGGAACCAATATTTGGAACGACATCGGCTACATCAATTTCTC
 TCTCAGCTACCTCGAGCTGAATGCTGCATTCGAAAGTCAAGCTCGGCGATTTGAAAGTGTATCGGCAACTGACGG
 GGTAGCCATTCGAAACCGATTTGAGTTACGACGACGGCAATGATCCCTCTTACGGGATACCTATTTCTGCGAAG
 CTTGCCCTCCGGGCTCGACATCGACCCCGCTACTGGAACGATCTCGGGTACGGCAAGGAAGGCGCTCTGAAAGC
 CGCGAGTTTCGACGTCGCTGTGACAAATTTGAAGAAGCTGAGGATGGCAATTCCTCGTATCTCTTCGACAAC
 CTTCACTCTCACGCTAGCTCCCGCGAGAAAGCGCCGAACTGCACCGAGTCCAGAACTGCAGCCGTCGCGGTT
 GCGGGTGTGGTTCAGCTGGCCGTTGGCGATGTTGATGGTATGGATATCCCGATGTTGGTCTGTGGTCTGGTAG
 TGTGGGGTGGTCCATTTCTATGCTGGTCAATGACGGGGGCAATTTACAGGATGTGATGTTGGTCTGTGGTTTGG
 TGAACGTCGTTGACCAAGGTGAGTGTCAATGGTGTGGGCGCCAGATTTCTGGTCCGGCATGATGATGG
 CGGTTGTTGTCTACCATGTGTCTGCTGATGGTCATATTTGTTCAAGGTGCCAGGTTGGCATGGCTGGAATGG
 GATGTAACATCACCTATGTTGGCCGTTGGGAGCCGTTTACAGGATGTGATGTTGCTGCTGACGTTGGGTTGG
 TGGTATTTGATATCGTTATACCTGACATCTAGTGGTTGACTGCATCGGCCAAGATTTGGCCACGGGTTGGGGAA
 GATGACCCGTTATTTAGCCGTTGGCAACATTTGTTGGTATGACAAATCCGGATCTGGTGGTATTCGATCTGATGG
 GAAGATGTTGGCTTATCAGGGCCATGGCGATGGGACGGTGTCTGCCCTTGGTCAGATTTGGTCAAGGGTGGACCT
 GTTCTGTAACGCTTTCTGTTCCGGGTGATCTCACCAACGATGGCCGGCTGATCTGATTTGGTATTCGTTGGAGATG
 CAAGATGTTCTTCTAATAACTGCGAGGGGCTATTTCAAGCCCGCCGTCGACATCGGTCAGCGCTGGCAAC
CTGAAACACATCAGCCGTCTAAAAGCCAAATGTGCTCCGGTAGTTTGGCCACGAGCACATTTGCACT
 TTCGGATAGCTACAGTCA **ACGTGCCCTTCAC**GTTCAACATCTGGCGAGTTTGTGCAATGTTTCGACCCAGCGG
 GCGAGACTCTTCATGACCTGATCGATCTCTTATAGCGCTCAGGAATCTCATCCCCAGCTTTCCAGGCGG
 ATATACGATCCCCTTACCTCGTCTGTCTAAATCATGTTTCGGTAAACCGCTGTTTGGCCCTGCTTCGCTAGTAGCG

CCTTCCGCGCCGTGCGGGGCCGAGCGCAGGCCGTCGTCGTTGCCAAACCTTCAACCACGTACGACGCCGTACC
 CATCGAACCCGGGATAAGACCCCTTGACTCCCGCGTCTGCTCGGATTGCACCCCTTGCGCGTCAGCCACACGTCTTT
 TCCTCCGTGTCGTTCTTCGACGGTGTAGTTATGGTGGCAGTTAATGCGCTCTTCTCACGCACCTGGCGGCCAC
 AAATTCACCAGCCTGGCCGAAAACCGGTCTATCATTCTTCCCGGTTAGCCACGCAAAGCGTTGGGCCACTC
 GAGATCGCGCATATAGACGGCAAAGCTTCCGTGCCCTGTCCAGATAGGCAAGGTCGCGATGTTCAAGCTCGAT
 GCCATTTCATCCCGCAATAAATTTGGGCTCCAGATATGTTTTTAGCGATTTTATGGCCACCCCGCGGATCC
 GGAATGTAGAAACATCCATACGGCTCCGATTCGTCTAAGCACAGTTCAATGAAGTATTGCCGCCGCAAGCGA
 GCCCAATTGCATGTGCCACTTCGGGGAGTGGGATAAATCGACGTCGTTGTCTTTTCGCTAACGCTTCCAGCTCCGC
 TATGCGTTCCTTGCGGACTGCCAGCGACTTTCCTGTTGTAATTTCCGGGCGAAAGCGGAATCGAATCCACGAT
 CGCATCACGTAGGCGCGCAAAGTCCCTGCTGCAAGATCCGCTGCACTAAATTTGCGTGCGCACGCGGATCATTCC
 GCAGCCGATATCTACGCCGACGGCGGCTGGCAAAACCGCGCCACCCTCCCAAACACCGTTCCCTACCGATGAGCC
 CAAGCCGAAGTGC GCGTCCGGCATGAGGGCCACGTGCGGATATACAAACGGTAAACGCGTACCATGCGCGCTG
 TTCCAGGGTCTGTTTCATCAATCTGGGAGCGAAATTTTGAGTTCTACAGCAGTGGGGCTCCAACGCTACCGGT
 CTACACCAAGTACTATATCCCCAAGAAATCGCGCAAGCTCGGTAATTGCTCCAAGATTTGCAGGCGGCCACGATT
 ATAGTTTCGCGCAGGCGGCTGACGTTGCGTTCCTGGTTACTGACCATCATGTGCCGGGGCCAAAACACCCATGC
 TTTTCCGCTGATTTCGAGCTCGCGTATGCGCTCTCGTGCGGTATTGTAGTTGCGCCATCTGTCAATGGCCGCTTG
 CGCCACCAGCGTAAGTCCGGGAAGCAAGCGTTCGAGAATTATCTTGTGAAAACTCGAGCCATCCGGAAGATCT
 GGGGCGTCCCT

Anfang & Ende ORF Neuraminidase. Leserichtung: →

Anfang & Ende T. bonasi UPF-ähnliches Protein. Leserichtung: ←

ANHANG D:

Alignment Neuraminidasen

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
T_bon_Neur -----
T_pyo_NanH -----
T_pyo_NanP MMRMASRRGE AAILGRINMM GMKRFLMGMA VASIAISGLL AIPFAPPALA
A_hae_NanH -----
A_hae_NanA -----
A_visc_Sia -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90         100
T_bon_Neur -----
T_pyo_NanH -----
T_pyo_NanP EDSALGPLIT IAKWHDDIPG GTKYRIPALT QAPNGDLLAI YDMRPSQDDL
A_hae_NanH -----
A_hae_NanA -----
A_visc_Sia -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
         110         120         130         140         150
T_bon_Neur -----
T_pyo_NanH -----
T_pyo_NanP ASNIGVVMRR SKDDGATWGP VQTIRYETGK RGNGDPSVLV DRKTGRIFVF
A_hae_NanH -----
A_hae_NanA -----
A_visc_Sia -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
         160         170         180         190         200
T_bon_Neur -----
T_pyo_NanH -----
T_pyo_NanP YAGTENQGLS GASAGNKATD PNTMQVLYSY SDDNGATWQH RNITAETKPA
A_hae_NanH -----
A_hae_NanA -----
A_visc_Sia -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
         210         220         230         240         250
T_bon_Neur -----
T_pyo_NanH -----
T_pyo_NanP NWAGIFAASG EGIQLRAPAH EGRLIQQYVV KIDGSLANVS LFSDDAGRTW
A_hae_NanH -----
A_hae_NanA -----
A_visc_Sia -----

```

ANHANG D:

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260      270      280      290      300
T_bon_Neur -----
T_pyo_NanH -----
T_pyo_NanP SFGEPPFRHFG DENKVVVELSD GTLMMSARVG GGMRGVAYSA DGGKTWRD GK
A_hae_NanH -----
A_hae_NanA -----
A_visc_Sia -----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310      320      330      340      350
T_bon_Neur ----MGMYVR PDGGFLTYG STLPDNEWTH ITWTQSSTEG LSLYVDGQLR
T_pyo_NanH -----MKG AKMPPLKSMR
T_pyo_NanP KDGGQIDPTS NGTILRIYPD AKPGDPKAKM LMLLNSDPN IRRNGTAKVS
A_hae_NanH -----
A_hae_NanA -----
A_visc_Sia -----MTSHSFFS

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360      370      380      390      400
T_bon_Neur ENKTFWSVQNP ITIPADKGG KGFSGLVDEL KITYNRALTAA EVSASIDALE
T_pyo_NanH KRFTRVFAGA SAVALLSLC-----MVP AVAGAAPSTA EPPASGTATT
T_pyo_NanP CDDGQTWPGR LTIEPNESEY ITGTPYKGG QATGKVGILV BREAYTTIAY
A_hae_NanH -----MGLITAPALPASA SSEVINKRTL
A_hae_NanA -----MKYQH
A_visc_Sia RR-----RLP ALLGSLPLAA TGLIAAAPPA

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410      420      430      440      450
T_bon_Neur LPEPPP-----APKLNATF STMNPKPEGA AFEVGETIRF ELKVINDTGI
T_pyo_NanH AAPTNTN-----SPVTASSE KILNPKAEGE SFEEGEIRF QVTLKNDTDV
T_pyo_NanP TALDTRRMMN VCAPISAQQE GTESTPAKRI SVVAGEQATL PLTITNQGTO
A_hae_NanH VNHAKT-----VGDAGTAY LAVDNGPEDD VVRVGETISF ESRFQSG---
A_hae_NanA IRKAVL-----AGIASSTL VFSG-----
A_visc_Sia HAVFVTS-----DGLADVTI TQVNPADG- LYSVGDVMTF NITLINTSGE

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      460      470      480      490      500
T_bon_Neur DRSEFESTASN LD-NWRGCKW SALRAGDTQS -CPFFT-HTV TDEDVKAGGF
T_pyo_NanH QRAFAFQSSN LN-DYQCKWK WKVEPGETKE DCKFPH-HKV TADDVATGSF
T_pyo_NanP TLTPAQVSVT G---YDKSEW TTTNSAAVPO IAPGQSVQVD VVLDVDPDTLL
A_hae_NanH -----
A_hae_NanA -----
A_visc_Sia AHSYAPASTN LSGNVSKCRW RNVPAAGTTKT DCTGLATHV TAEDLKAGGF

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      510      520      530      540      550
T_bon_Neur TPTITFQIYD RTGYSGEATP AAPFEGNPVG VSPRLVTINN FEFIDGNTKD
T_pyo_NanH TPRVVTWIMRE STGHASVEK TGEAVGKPVV VTTKLAKLSP ITVTSGEGKA
T_pyo_NanP GERTLVATYD VGGKTSQQLI FVTVTGEAKT PTPKLLVEPY LDAITYEDGSK
A_hae_NanH LSEIVYVKAT SEALGDTQAD KCSWRGVEYN SGAQLRQIP-----AKD
A_hae_NanA LAMAPLGHAA DAEAPHYEA TAPASEETL GTAEAVNLP-----AKE
A_visc_Sia TPQIAYEVKA VEYAGKALST PETIKGATSP VKANSLRVES ITPSS--SQE

```

ANHANG D:

```

.....|.....|.....|.....|.....|
          560      570      580      590      600
T_bon_Neur  NYS----- --AGDELTAS LTLTNVFDET VNVSLNDDDL KCSGAIIPGS
T_pyo_NanH  SYS----- --AGDQFGYD YIVTSLSKDK ISVEGEG--- -CPAKELDPE
T_pyo_NanP  IWRGSGPVKP GPVGDIVVPW VRVTVNGNPV VENVKLNYPK EYCHQDRMDP
A_hae_NanH  GYW----- --CVQKPSYK VKEADLEHPT KTF-----
A_hae_NanA  GLK----- --PQPSAQIG LGFSDITEP-
A_visc_Sia  NYK----- --LGDTVSYT VVRVRSVSDKT INVAATESSF DDLGRQCHWG

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|
          610      620      630      640      650
T_bon_Neur  SL----- ----TCDS LTVSVTREDL ERG--QAELS VVNVASSGEL
T_pyo_NanH  KS----- ----MKCS AKYAVTEEDL ERG--EAELT AKVKVSDGKR
T_pyo_NanP  GTKLLPNSTY NPGICWSRDH MRHEITEQDV ERGYWEQEFY ATFTYEGKTY
A_hae_NanH  -----D ITYNVVKDAN ASGKPFSTIT VKKTVKIQKA
A_hae_NanA  -----IAIQEN- VEG-
A_visc_Sia  GLKPGKGAVY -----NCKP LTHITTQADV DAGRWTPSIT LTATGTDGAT

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|
          660      670      680      690      700
T_bon_Neur  TGAT----- ----AT-AT TPTPTTWPTA
T_pyo_NanH  NVTLT----- ----ET-KS VKTPRVVWPQA
T_pyo_NanP  ESNRGKVRLE LDRESVNPSR IGKDKARVYL PTGDFQSSSF TRMPDDHPNS
A_hae_NanH  IENPG----- ----EKDGP KDVLLAKAND
A_hae_NanA  LQTLT----- ----ATGNP INVVGDHPQA
A_visc_Sia

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|
          710      720      730      740      750
T_bon_Neur  QPFPAPNADP RLAPALSDLT KVETHVPGRY NIRIPAIAAAA P-----
T_pyo_NanH  KAFKTPNADP NLGARLTDLN ILDEKTS-EY NIRIPAIAVA S-----
T_pyo_NanP  WILPTGHNLG LEMAKDNRTS AQLVVVSPKA GTLTAEVSEA AGITWEVSYP
A_hae_NanH  FDFEVH----- ----RIPALAKA P-----
A_hae_NanA  -----I NYRIPAITTA P-----
A_visc_Sia  TEAPAPDAST ELPASMSQAQ HLAANTA-TD NYRIPAITTA P-----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|
          760      770      780      790      800
T_bon_Neur  -----NGD ILASYDLRPT N----- GAGSGG DSPNENS---
T_pyo_NanH  -----NGD ILASYDLRPL N----- GAWHGG DSPNENS---
T_pyo_NanP  DKIVNSDQCK LQTGQTLDPL RTAAPRVEPN KNQAVWFVGR VAPEAKAGVI
A_hae_NanH  -----NGN LLAAWDGRP -----AVYSNN DSPNPNT---
A_hae_NanA  -----KGD LIAAFDERPL SSEKASWTQL FGRRHWNKGG DSPNPNS---
A_visc_Sia  -----NGD LLISYDERPK D----- NGNGGS DAPNPNH---

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|
          810      820      830      840      850
T_bon_Neur  ---IVQRRSK DGGKTWGPLT TIAKGHVAPE GQ---RYGW SDPSYVVDHE
T_pyo_NanH  ---IVQRRST DGGKTWGPRT TVAEGKVAGQ GK---RFGW SDPSYVVDHT
T_pyo_NanP  NQETLTKLDG RVIATYPVSV TVRDVQLLDR SKRPFTLDLW WQPDAIADWY
A_hae_NanH  ---ILLRISK DNGETWEVQK KIASGQLRDK ASGKK-QIGY SDPSFVVDNV
A_hae_NanA  ---IVQYRSV DNGKSWQKEN NICDTVTSD MEK---ISGC SDPSYVVDWD
A_visc_Sia  ---IVQRRST DGGKTWSAPT YIHQG--TET GK---KVGY SDPSYVVDHQ

```

ANHANG D:

```

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      860      870      880      890      900
T_bon_Neur TGEIFN---- FVFGSLDAGL PNNPSYKLE NGQVDES HRR TMNFTVANST
T_pyo_NanH TGEIFN---- FHVFGSLDAGL PNNPSYRL-V NGKVVDDTHRQ TMNEALSSST
T_pyo_NanP GVKPWSPEHF AHMKPYLREI ASAQQEVVNV ATAQDPWYLP DAKHAQTASP
A_hae_NanH SGKVFA---- FVVKSYDQGI AGS----- RSGVDPEDPN VIHAVYVNSE
A_hae_NanA TGKIFN---- FHVRSYRAGL HES----- KSGNDAASHD VVQVEISESI
A_visc_Sia TGTIFN---- FHVKSYDQGW GGS----- RGTDPENRG IIQAEVSTST

```

```

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      910      920      930      940      950
T_bon_Neur DN----- --GYTWKLRIT ITNDVLI---G ERAADVTCGF ATSGA---GI
T_pyo_NanH DN----- --GRTWNSRL ITNDVLI---G THIDEIKGCF ATSGA---GI
T_pyo_NanP YNSTVEWRWD GKNYAFNFDV FDKVYQAHAD AGITGPIHTF AIKGFQKQERL
A_hae_NanH NN----- --GESW SAPK DVTGIL--- AEGYKQHARF ATSGA---GI
A_hae_NanA DD----- --GKTWNSRI ITKNVIT--- PDGNVWKWRF ATSGQ---GI
A_visc_Sia DN----- --GWTWTHRT ITADIT--- KDKPWTARF AASGQ---GI

```

```

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      960      970      980      990      1000
T_bon_Neur QKQHEPHKGR LLQQAACRHK D-----
T_pyo_NanH QKMHEPFKGR LLQQAACKFN T-----
T_pyo_NanP TYVDDTQGGK LVSRTIELGG EDYRQAWGSF LNAFEKHLKE KGWFERTQLF
A_hae_NanH QLKYGDPGRL LIQQYLNVNN GQDGNWG---
A_hae_NanA CLTHRSRHKGW LIQQFTLQGG EP-----
A_visc_Sia QIQHGPHAGR LIVQYTIIRTA G-----

```

```

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1010      1020      1030      1040      1050
T_bon_Neur -----GGFR ALTI FSDDHG KTWQSGNEFAS ATEGAQF---FR-
T_pyo_NanH -----GRFR AITIFSDDHG KTWQGGHFTS DTEGAPA---GKH
T_pyo_NanP LDEPKAEQLA AIESFINDDA PAWQGKLALA ANSVNEANKA DFVAFNYSLL
A_hae_NanH -----SGEHQ AVSLYSDDNG KTWHSCKPVG T-----
A_hae_NanA -----GTKQE AFSFISKDGG TTWNAGDAVG A-----
A_visc_Sia -----GAVQ AVSVYSDDHG KTWQAGTPIG T-----

```

```

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1060      1070      1080      1090      1100
T_bon_Neur WNYDENKVAE LSDG-----RL MLNSRIPRGS HGAGYRLVAI
T_pyo_NanH WNFDENKIAE LSDG-----RL MLNSRIPGNS YGTGYRLVAY
T_pyo_NanP DKLPVEVVAQ RADQGRQSLF YTYYPQRPN VIAASPLHSG RMLGWIAQKR
A_hae_NanH -TMDENKVVE LSDG-----KV LLSS---RQF HHRGGRHYAI
A_hae_NanA -DMDENKVVE LSDG-----RL LLTSR-HKNG KRLGKRIQAF
A_visc_Sia -GMDENKVVE LSDG-----SL MLNS---RAS DSGGFRKVAH

```

```

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1110      1120      1130      1140      1150
T_bon_Neur SEDGGMNWG-----
T_pyo_NanH SADGGETWG-----
T_pyo_NanP NLDGFLRNSF NSWPTDVYAN STYRYHQGDE YLIYPGGTKA KPEAGPVSSM
A_hae_NanH SSDGGIN YQM-----
A_hae_NanA SKNGGFSWE-----
A_visc_Sia STDGGQTSW-----

```

ANHANG D:

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1160      1170      1180      1190      1200
T_bon_Neur  ----- --EYRIDEQL QDSQNNAQLL RFPPTANKGT LRSK----VL
T_pyo_NanH  ----- --GYHELEKQL PDSTNNAQIL RAFPSANNGT LRAK----VL
T_pyo_NanP  RWESFRDGDID DAEIVREATM TEGIDAAEFQ RVLTGFGFGDKD AGSANTWAAM
A_hae_NanH  ----- --DYTNDNRL ADPONNASII RAFPEAKKGS ALAK----VL
A_hae_NanA  ----- --RESVMPDV VDHGTNQILL KVFFGIPSED PRSK----VL
A_visc_Sia  ----- --EPVSDKNL PDSVDNAQII RAFPNAAPDD PRAK----VL

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1210      1220      1230      1240      1250
T_bon_Neur  LFSNTKNH-- --WNRVNGHVS MSYDDG-----
T_pyo_NanH  LFSNTEKP-- --NNRVDGKVK MSYDDG-----
T_pyo_NanP  VAARSIALNA IGAQVDGQPR MTAQASNTRV TPGTPVKVSV KVHAPLADGL
A_hae_NanH  LSSHANSRK- HYDRVNGTIS YSLDDG-----
A_hae_NanA  LFANSTSNIG DNDRRHNGTVW LSCNDG-----
A_visc_Sia  LLSHSPNPR- PWSRDRGTIS MSCDDG-----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1260      1270      1280      1290      1300
T_bon_Neur  ----- ASWP VSKQVRTGGT GYTTMAVQQG GTIGLLMEPN -----
T_pyo_NanH  ----- KSWP IAKQIRNGHT GYTTMAVQPD GSIGLLMEP-----
T_pyo_NanP  DPVTVAASAP QGWQITPATA KTGAIAANRS GTVEFVWANN YGDGEGTIAF
A_hae_NanH  ----- ATWT NGSVFKPGKM QYSVMTALGN DAYGILYEG-----
A_hae_NanA  ----- ENWT -SKEFNKGST GYVTITTQHD GRIGMLSEDG KNGK-----
A_visc_Sia  ----- ASWT TSKVFHEPFV GYTTIAVQSD GSIGLLSED-----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1310      1320      1330      1340      1350
T_bon_Neur  IWNDIGYINF SLSYLEPELP --FEVKLGAI EDVSATDGVA -----
T_pyo_NanH  TSQSVGYVNF TLKTLAENLP --FEVALDKI GDVKATDGTP -----
T_pyo_NanP  TANAAGHKLA AEVTLTASAG ECVPASLVGK PGTNSEEPTK GLPGEGPVAL
A_hae_NanH  NDSTIVYKKV DLNWISPELA KYAEDHKADL GNADSEAAEK -----
A_hae_NanA  KEHGIYRSF GLDWVGTCPG VKEAIELDKA KADLEKAKSE -----
A_visc_Sia  AHNGADYGGI WYR----- --NFTMNRL GEQCQGKPAE -----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1360      1370      1380      1390      1400
T_bon_Neur  -----
T_pyo_NanH  -----
T_pyo_NanP  AFDGDPGTHW HSEWNGHAYP IDAWWRTDAA PGQELCAVITY QSRQTGTGNGH
A_hae_NanH  -----
A_hae_NanA  -----
A_visc_Sia  -----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1410      1420      1430      1440      1450
T_bon_Neur  IEPIEVTTGG NDPSLADTYS --AEGLPSEL DIDPATGTIS GTPKEGLSEA
T_pyo_NanH  IAPIKVTSTG NDPALADTYS --AEGLPAGL KINAETGQIE GTPAVGNTDV
T_pyo_NanP  PSEAKIYTSA DGQDWHEVAT MKPNNSKGVQ RFDLPAGTTG PWVKFSITKA
A_hae_NanH  IKKLEDEIAD LKAKLEAANQ --AKDEAEKA AKKAEEEKRD ADREKVKAET
A_hae_NanA  KAKLEKQVAK QAEGLEKLQQ NLEKAENKAV ALQENVDKLA LDIKAKTEAL
A_visc_Sia  PSEPASPTAA PSAAAPTEKPA --PSAAPSAE PTQAPAPSSA PEPSAAEPS

```

ANHANG D:

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1460          1470          1480          1490          1500
T_bon_Neur ASFDVVRVTE EAEDGTGIPR ISSTTFLLTL APGEKAPEPA FSPELQSPSL
T_pyo_NanH KSEFDVKVTLT EAEDGTGIPR TSSQTFKIFL AEN---PTPA BAPBPKPEPK
T_pyo_NanP TSTVAGKAFG SAAEFGAVKK VASAAPPVIV DTVEDGKSHK SYEIPDNNGIQ
A_hae_NanH AKREVEAKLK KAE GDKADLE KRVAELEGDI AKAEAKKAA DKAVEEANAA
A_hae_NanA DELKADSETT RAEKARLQKE FDSINAKLEV AKAEQRVAS DLAVKEAKLT
A_visc_Sia SAPAPEPTTA PSTEPTTAPA PSSAPEQTDG PTAAPAPETS SAPAAEP TQA

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1510          1520          1530          1540          1550
T_bon_Neur AGVVGSGRFG DVDGDGYADV LAVGSDGVVH FYAGHSGGIY HVGPIGSGFG
T_pyo_NanH PEPTPKPEPK PEPTPKPEPK PTPKPEPKVE VVVPNAP---VFPDAS---
T_pyo_NanP YVVGKVPATP GVHEAKPGQK VEIKMNGLAE HGYSLPKPAD VDMAHTFLG-
A_hae_NanH KKKAAEEAAE LKAKNAELEK KLKEAGKAEI VLPLPTP-
A_hae_NanA ESEKQKAAAE KKVAEQHKQI EDLNAKVKKA ESERDQATES -----
A_visc_Sia PTVAPSVEPT QAPGAQFSSA PKPGATG--- -----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1560          1570          1580          1590          1600
T_bon_Neur GTSLTKVSDV NGDGRPDFLV RHDDGRLVYV HVSADGHIVQ GAQVGHGWNG
T_pyo_NanH -----DPV TCTVKPFVTL QPTKG--VSY SVTVDGKELD WVEGNPSRFE
T_pyo_NanP -VEAPAVTAK IGQSLPATAL KVHGNAGAIT FALGAGAPAW LSVSEDGAIT
A_hae_NanH -----AEPTPAPEP QPAPAISMMS DKVAVG-----
A_hae_NanA -----AK NLEEKAKEDA KSIEGLEGNL SEFADENDAL R-----
A_visc_Sia -----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1610          1620          1630          1640          1650
T_bon_Neur MDNITYVGR L GAGSQEYVIA ROVASGDIYR YTLTSSGLTA SAKIGHGWGK
T_pyo_NanH YD-----YGKTVVVKA KAVEGFELAK GAKTQWSWTA PTLDELGC--
T_pyo_NanP GDVPSDASIG KLSIPVTVTE VLASSAPKTS ALPGFTTATA TLVTDVVDA
A_hae_NanH -----SQVVFTG TGFTPDAAKV VAVHSTAVEL GEYVADKDGK
A_hae_NanA -----SKINKLT KENTDLKAQL EKVKKELEEA KKVQDDVVKP
A_visc_Sia -----RAPSVVN PKATGAATEP GTPSSASAPA PSRN-----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1660          1670          1680          1690          1700
T_bon_Neur MTRILAVGNI VGDSNPDLVG IRSDGKMFAY QGHGDTVSA FGQIGGWTS
T_pyo_NanH -----TTPAP DPKPTDPKP TPDPKPTPEP KPTDPKPTI IAQAKAPKSS
T_pyo_NanP EPAPPEVPG EPAPPEAPVP GPVGPFFPGD EGQHQQDANK TPHLQDPSV
A_hae_NanH ITVTWTVPAG FELGAHKVIF TAGDKTVEKS PTVVAPEKPV PTKPAAPG--
A_hae_NanA KPAPQPAPQP EPAPPEVKVT PHVDGITPDA SDPAACMTP YVKVSPVEGV
A_visc_Sia -----AAPT KPGMEPDEID RPSDGTMAQP TGGASAPSA PTQAAKAGSR

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1710          1720          1730          1740          1750
T_bon_Neur FVNAFVPGDL TNDGRLDLIG IRGDGKMFY ENTGRGYFKP AVQIGHGWQT
T_pyo_NanH LVHTGAT--- -----VVG LSVAAAVLLL AGG-----AIAIIRRRQG
T_pyo_NanP NASAPKSESG LAWTGAAVVG LAVMSLVLELL AGFVLV---- -VRRRKA
A_hae_NanH LAKTGVTLGL VAG---LAT LSIMAGVVAV RRR-----HEV*-
A_hae_NanA TYEVTVDGQV ISPTKDDLFT YEYLYGKTVK VNAILKDGFT LAKGAKTTWS
A_visc_Sia LSRTGTNAL ILG---LAG VAVVGGYLLL RAR-----RSKN*

```

```

      ....|....| ....|
      1760
T_bon_Neur MKHIS*-----
T_pyo_NanH *-----
T_pyo_NanP *-----
A_hae_NanH -----
A_hae_NanA WTAPNRDELK CDTPA
A_visc_Sia -----

```

T_bon_Neur = *T. bonasi*-Neuraminidase NanH
T_pyo_NanH = *T. pyogenes*-Neuraminidase NanH
T_pyo_NanP = *T. pyogenes*-Neuraminidase NanP
A_hae_NanH = *A. haemolyticum*-Neuraminidase NanH
A_hae_NanA = *A. haemolyticum*-Neuraminidase NanA (unvollständig)
A_visc_Sia = *A. viscosus*-Sialidase

Gelbe Markierungen = Aminosäure-Übereinstimmungen mit der *T. bonasi*-Neuraminidase-Aminosäuresequenz

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die freundliche fachliche Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. H. Hofer (Direktor des IZW) bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Stephanie Speck (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München) und Herrn PD Dr. Jörns Fickel (IZW), die mich erstklassig fachlich betreut und menschlich unterstützt haben und mir kompetent und humorvoll auch durch schwierige Arbeitsphasen in Berlin, Białowieża und Tucson hindurch geholfen haben.

Bei der Forschungsgruppe um Prof. B. Helen Jost und Prof. Stephen J. Billington (University of Arizona, Tucson, USA) möchte ich mich für die sehr herzliche, unkomplizierte Aufnahme in ihr Team, ihr Interesse an mir und meiner Arbeit sowie die äußerst kompetente Unterstützung auf fachlicher Ebene bedanken. Die sieben Monate in der Wüste haben mich geprägt und in jeder Hinsicht weiter gebracht.

Katja Pohle möchte ich dafür danken, dass sie ungeachtet von Arbeitszeiten immer ein offenes Ohr für meine Belange hatte. Ich danke ihr für die vielen gemeinsamen Arbeitsstunden im Labor, für ihre Freundschaft, Lebensfreude und die schönen Tierpark-Spaziergänge.

Frau Nadine Jahn danke ich für die Unterstützung bei meiner Arbeit in der Bakteriologie, für ihre Fröhlichkeit und Geduld. Bei Frau Karin Hönig möchte ich mich für ihre pragmatische, unaufgeregte Art und ihre Hilfsbereitschaft bei der Arbeit im Labor bedanken.

Frau Dr. Mirjam Grobbel gebührt Dank für ihre liebe persönliche sowie fachliche Unterstützung meiner Arbeit. Für die Hilfe im Sequenzierlabor bedanke ich mich bei Frau Tanja Noventa, Frau Anke Schmidt und Herrn Dietmar Lieckfeldt. Für die Beschaffung von Literatur für meine Arbeit bedanke ich mich recht herzlich bei Frau C. Greulich und Frau B. Peters.

Alice Borth gebührt besonderer Dank für die Übersetzung der polnischen Literatur.

Bei der GlaxoSmithKline-Stiftung bedanke ich mich für die Gewährung einer finanziellen Reisebeihilfe für meinen Forschungsaufenthalt in den USA.

Herrn Dr. Rafał Kowalczyk vom Mammal Research Institute in Białowieża, Polen möchte ich ganz herzlich für die Gelegenheit danken, bei Wisent-Immobilisationen dabei sein und Proben nehmen zu dürfen. Es war mir eine große Ehre, diese beeindruckenden Tiere aus der Nähe beobachten zu können.

Meinen Eltern sowie meiner gesamten Familie in Deutschland und Ungarn danke ich von ganzem Herzen für Ihr grenzenloses Vertrauen in mich, ihre Stärke und Liebe.

Eine Reihe weiterer Personen hat mich „im Hintergrund“ unermüdlich in meinem Vorhaben bestärkt und unterstützt: meine Mitbewohner Martin Barber, Hilary Granger und Judith Feistner; der Homöopathie-Arbeitskreis Berlin; mein maupfe langjähriges Rudel, der Wildlife-AK der Naturschutzjugend Hessen und Thüringen sowie meine herzallerbesten Freunde Katharina Sames, Julia Grotti, Lukas Schiller (danke für Deine Swagness) und Sebastian Weigand, denen Dank für ihre beständige moralische Unterstützung gebührt.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Hilfen und Quellen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 30.01.2013

Julia Carola Kelemen