

# 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. Hämolsin .....	- 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 -

## Inhaltsverzeichnis

---

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