

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
&
Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Universitätsklinikum Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

**Untersuchungen zur Diversität der Treponemen bei der
Dermatitis digitalis des Rindes –
Erstbeschreibung der Spezies *Treponema brennaborensis***

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

vorgelegt von
Kirstin Schrank
aus Quedlinburg

Berlin 1999

Journal-Nr. 2382

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. L.H. Wieler
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. U.B. Göbel
Tag der Promotion:	28.04.2000

**Meinen Eltern
und
meiner Großmutter**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1 Klinik der Dermatitis digitalis	2
2.2 Vorkommen und allgemeine Charakterisierung von Bakterien der Gattung <i>Treponema</i>	4
2.3 Isolierung von <i>Treponema</i> -Spezies	8
2.4 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Treponemen aus Mischkulturen	9
2.5 Bedeutung der Spirochäten bei der Dermatitis digitalis	12
3. Eigene Untersuchungen	14
3.1 Material	14
3.1.1 Untersuchungsmaterial	14
3.1.2 Geräte	14
3.1.3 Chemikalien, Nährmedien und Lösungen	15
3.1.3.1 Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA	16
3.1.3.2 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese (DNA)	17
3.1.3.3 Lösungen für die Gelelektrophorese (Proteine)	17
3.1.3.4 Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
3.1.3.5 Lösungen für die Dot blot-Hybridisierung	19
3.1.3.6 Lösungen für die DNA-Sequenzanalyse	20
3.1.3.7 Lösungen für die Fluoreszenz <i>In situ</i> -Hybridisierung (FISH)	20
3.1.3.8 Weitere verwendete Lösungen und Puffer	20

3.1.4	Verwendete Bakterienstämme	21
3.1.5	Oligonukleotid-Sonden und -Primer	23
3.2	Methoden	24
3.2.1	Aufbereitung des Untersuchungsmaterials	24
3.2.2	DNA-Isolierung	25
3.2.3	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	27
3.2.4	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	27
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
3.2.6	DNA-Elutions- und Reinigungstechniken	29
3.2.6.1	Elution von DNA-Fragmenten mittels QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN)	29
3.2.6.2	DNA-Reinigung mittels Dynabeads®	30
3.2.7	Klonierung amplifizierter rRNA-Genfragmente	31
3.2.8	Nichtradioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin sowie Fluoreszenzfarbstoffen	32
3.2.9	Hybridisierungstechniken	34
3.2.9.1	Dot blot-Hybridisierung	34
3.2.9.2	Fluoreszenz <i>In situ</i> -Hybridisierung (FISH)	36
3.2.10	DNA-Sequenzanalyse	38
3.2.11	Sequenzauswertung	39
3.2.12	Isolierung von Treponemen aus Klauenbioptaten	40
3.2.13	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.2.14	Mikroskopische Untersuchungen	42
3.2.14.1	Dunkelfeldmikroskopie	42
3.2.14.2	Elektronenmikroskopie	42
3.2.15	Bestimmung der Enzymaktivität	43
3.3	Ergebnisse	44
3.3.1	Charakterisierung einer bislang unbekanntes <i>Treponema</i> -Spezies	44
3.3.1.1	Kulturmorphologie	44
3.3.1.2	Licht- und Elektronenmikroskopie	45
3.3.1.3	Biochemie und phylogenetische Einordnung	50

3.3.2	Analyse der 16S rDNA-Genbank	54
3.3.2.1	Analyse der 16S rDNA-Genbank durch Dot blot-Hybridisierung und DNA-Sequenzanalyse	56
4.	Diskussion	62
4.1	<i>T. brennaborensis</i> , eine neue <i>Treponema</i> sp.	63
4.2	16S rDNA-Genbank	68
5.	Zusammenfassung	75
6.	Literaturverzeichnis	79
	Danksagung	95
	Lebenslauf	96

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Klinisches Bild der Dermatitis digitalis des Rindes (akutes Stadium).	3
Abb. 2	Anatomischer Aufbau von Spirochäten mit den wichtigsten morphologischen Charakteristika (nach HOLT, 1978).	6
Abb. 3	Darstellung einer typischen Spirochäte. Die Endoflagellen befinden sich zwischen der Außenhülle und dem Protoplasmazyylinder und inserieren in der Insertionspore (nach HOLT, 1978).	7
Abb. 4	Isolat DD5/3 ^T - Plattenausstrich nach 3-tägiger anaerober Inkubation bei 37 °C.	44
Abb. 5	Isolat DD5/3 ^T - einzelne Kolonien im Impfausstrich nach 3-tägiger Inkubation bei 37 °C in den Agar penetriert.	45
Abb. 6	Raster-Elektronenmikroskopische Abbildung einer Flüssigkultur von DD5/3 ^T . Darstellung verschiedener unterschiedlich stark helikal gewundener Morphotypen. Bei einigen Treponemen ist eine Schleifenbildung sichtbar, die den Beginn der Rundformenbildung darstellt.	46
Abb. 7	Transmissions-Elektronenmikroskopie von DD5/3 ^T . Darstellung einer einzelnen Treponeme mit den zwei Endoflagellen im periplasmatischen Raum und den Insertionsstellen am Polende.	46
Abb. 8 a,b,c	Darstellung 3 verschiedener Stadien der Rundformenbildung von DD5/3 ^T unter Verwendung der Transmissions-Elektronenmikroskopie.	47/48
Abb. 9	Darstellung einer Rundform in einer Ansammlung von helikalen Formen und verschiedener Stadien der Rundformenbildung von DD5/3 ^T unter Verwendung der Transmissions-Elektronenmikroskopie.	48
Abb. 10 a,b	FISH einer Flüssigkultur von DD5/3 ^T unter Verwendung der Cy3-markierten Oligonukleotidsonde DDK5/3.	49
Abb.11	Proteinanalyse. Elektropherogramm des Gesamtproteinextraktes des Isolates DD5/3 ^T und acht anderen Treponemen (12 µg, Coomassie blue, 10%).	50
Abb.12	Dendrogramm zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft von <i>T. brennaborensis</i> mit weiteren Spezies der Gattung <i>Treponema</i> , basierend auf den 16S rDNA-Sequenzen (16S rRNA <i>E. coli</i> Position von 67-1467). Der Algorithmus wurde nach JUKES u. CANTOR (1969) berechnet und nach der Neighbor-Joining-Methode korrigiert (SAITOU u. NEI, 1987).	53
Abb. 13	Restriktionsanalyse rekombinanter Plasmide. Elektropherogramm verdauter Plasmide mit den Restriktionsendo-nukleasen <i>Bam</i> HI und <i>Sal</i> I (1,2% Agarose).	54

Abb. 14	Flußdiagramm.	55
Abb. 15	Ergebnisse der Dot blot-Hybridisierung der 16S rDNA-Genbank mit der Oligonukleotidsonde DDK12 (A1, A2).	57
Abb. 16	Ergebnisse der Dot blot-Hybridisierung der 16S rDNA-Genbank mit der Oligonukleotidsonde TREIV (B1, B2).	59
Abb. 17	Prozentuale Verteilung der Insertsequenzen der 16S rDNA-Genbank (n = 104 Klone) nach Auswertung der Dot blot-Hybridisierung (DDK2, DDK12, TREII, TREIV) und DNA-Sequenzanalyse.	60
Abb. 18	Vergleichende 16S rRNA-Matrix von <i>T. brennaborensis</i> und 14 anderen Spirochäten und 3 rekombinanten Klonen. Berechnung der vergleichenden Matrix durch paarweisen Sequenzvergleich. Der Algorithmus wurde nach JUKES u. CANTOR (1969) berechnet und nach der Neighbor-Joining-Methode korrigiert (SAITOU u. NEI, 1987).	65
Abb. 19	Dendrogramm zur Darstellung von Klonsequenzen auf der Basis von 500 bp (16S rRNA <i>E. coli</i> -Position 100-600). Der Algorithmus wurde nach JUKES u. CANTOR (1969) berechnet und nach der Neighbor-Joining-Methode korrigiert (SAITOU u. NEI, 1987).	72
Tabelle 1	<i>Treponema</i> -Referenzstämme.	21
Tabelle 2	EMBL-Registrierungsnummer der 16S rRNA-Sequenzen.	22
Tabelle 3	Oligonukleotidsequenzen für die Dot blot-Hybridisierung.	23
Tabelle 4	Oligonukleotid-Primer für die DNA-Sequenzanalyse.	23
Tabelle 5	Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation.	24
Tabelle 6	Spezifität der verwendeten Oligonukleotidsonden.	34
Tabelle 7	Hybridisierungsbedingungen der verwendeten Oligonukleotidsonden.	36
Tabelle 8	Vergleich der Enzymaktivitäten kultivierbarer Treponemen unter Verwendung des API ZYM- System.	52
Tabelle 9	Einordnung der 104 Klone der 16S rDNA-Genbank nach den Ergebnissen der Dot blot-Hybridisierung und der DNA-Sequenzanalyse.	61

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATCC	„American Type Culture Collection“
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	chromosomale DNA
Cy	Indocarbocyanin
dATP	Desoxyadenosin-5´-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5´-triphosphat
DD	Dermatitis digitalis
dGTP	Desoxyguanosin-5´-triphosphat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosid-5´-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5´-triphosphat
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz <i>In situ</i> -Hybridisierung
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
IPTG	Isopropylthio-b-Galactopyranosid
IR	infrarot
kDa	Kilodalton
m	milli
M	molar
MCP	magnetischer Partikelkonzentrator
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
OMIZ	Oral Microbiology and Immunology, Zürich
p	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RE	Restriktionsenzyme
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrat (Natriumchloridnatriumcitrat)

T	Tymin
T.	<i>Treponema</i>
TB	Terrific Broth
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tm.	Schmelztemperatur des Oligonukleotids
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
T4	<i>Escherichia coli</i> -Phage T4
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Danksagung

Die Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. U.B. Göbel im Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Charité der Humboldt-Universität durchgeführt.

Mein Dank gilt besonders Herrn PD Dr. H. Nattermann für die Einführung in die oben genannte Arbeitsgruppe, für die Vergabe des Themas und die ausgezeichnete Betreuung.

Ich danke insbesondere Herrn Prof. Dr. Dr. U.B. Göbel für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe die Dissertation anzufertigen, für die Organisation der nötigen finanziellen Mittel und für die ständige Betreuung in fachlichen Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. L.H. Wieler, für die spätere Übernahme des Themas und die fachliche Betreuung bis zur Fertigstellung der Dissertation.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene für die hervorragende Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit. Besonders möchte ich in diesem Zusammenhang Herrn M. Kachler danken, der mich in die neuen Arbeitsmethoden mit viel Geduld eingearbeitet hat.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. S. Grund und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie die mich in der ganzen Zeit moralisch und finanziell unterstützte.

Lebenslauf

Name: Kirstin Schrank

Geburtsdatum: 09.05.1971

Geburtsort: Quedlinburg

Familienstand: ledig

1977-1987 Polytechnische Oberschule Karl Marx, Wittenberg

1987-1989 Lucas-Cranach-Oberschule, Wittenberg

1989-1990 Tierpfleger, praktisches Jahr, HU Berlin, FB Veterinärmedizin

1990-1996 Studium der Veterinärmedizin, FU Berlin

März 1996 Approbation als Tierärztin

1996-1999 Anfertigung der Dissertation, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Charité, HU Berlin

seit April 1999 Tierärztin, Tierarztpraxis Dres. med. vet. Schrank, Wittenberg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ich habe die Promotionsordnung des Fachbereichs der Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zur Kenntnis genommen.

Berlin, den 22.12.1999

Kirstin Schrank