

## 3. Eigene Untersuchungen

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Untersuchungsmaterial

Der Probenumfang betrug jeweils insgesamt 58. Jede Gesamtprobe bestand aus 3 Biopaten, 1 Kot- und 1 Pansensaftprobe.

Von den 3 pro Rind entnommenen Biopaten wurde je 1 Biopat für die nachfolgenden Untersuchungen aufgearbeitet und verwendet:

1. bakteriologische Diagnostik
2. Dot blot-Hybridisierung
3. Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung.

22 der insgesamt 53 Biopate wurden Schlachttieren am Schlachthof in Kasel-Golzig, Brandenburg entnommen. Zudem konnten zu diesen 22 Biopaten ebenfalls Kot- und Pansensaftproben von demselben Tier entnommen werden. Bei weiteren 21 Biopaten, die aus Milchviehbetrieben des Berliner Umlandes stammten, konnte neben den Biopaten von demselben Tier auch eine Kotprobe entnommen werden und die fehlenden Pansensaftproben wurden zufällig ausgewählten Schlachttieren entnommen und entsprechend zugeordnet. Von weiteren 15 Tieren aus verschiedenen Betrieben konnten lediglich Biopate ohne Pansensaft- oder Kotproben gesammelt werden, so dass diesen ebenfalls die fehlenden Kot- und Pansensaftproben entsprechend von Schlachttieren zugeordnet wurden.

#### 3.1.2 Geräte

Brutschrank	Heraeus Instruments, Berlin
Hybridisierungsöfen	Biometra, Compact Line OV4
Elektrophoresekammer	Hybaid PS 250, angewandte gentechnologische Systeme
Filme	Kodak Biomax-Cassette, Kodak Company New York
Kühlzentrifuge	3K30, Sigma Laboratory Centrifuges
Lamina	LB-48-C, Lamin Air, Heraeus Instruments, Berlin
PCR-Gerät/ Trio-Block	Biometra, Trio-Thermoblock, Trio Heated Ltd
pH-Meter	Knick Mikroprozessor pH-Meter

Pipetten (2, 5, 10, 100, 1000 µl)	Eppendorf Reference
Vortexer	M 52 Minishaker, IKA
Tiefgefrierer (-20 bzw. -70°C)	Privileg Öko bzw. Hera freeze, Heraeus
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415D
Transilluminator	Herlab Wiesloch, Molare Trenntechnik
Wasserbad	GFL Karow, Berlin
Fluoreszenzmikroskop	DMBL, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
DCC Camera	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
Dunkelfeldmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Fluorometer DyNA Quant 200	Amersham Biosciences, Freiburg
Bioplatzstanze	Roth, Karlsruhe
Mikrotom	Medim, Typ DDM 0036
Spectrophotometer	Ultrospec® 3000 pro, Amersham Pharmacia biotech

### 3.1.3 Chemikalien und Materialien

Antifadinglösung Citifluor	PLANO, Wetzlar
3-Aminopropyltriethoxysilane	Sigma-Aldrich, Deiseshofen
Aceton	Sigma-Aldrich, Deiseshofen
Anerogen 2,5 L	Oxoid, Wesel
AN-IDENT Disks:	Oxoid, Wesel
Kanamycin, 1000 µg/Plättchen	
Vancomycin 5 µg/Plättchen	
Colistin 10 µg/Plättchen	
Penicillin 2 IE/Plättchen	
Galleplättchen 20µl 25%-ige Gallelösung/Plättchen	
Hoechst Dye R3226	Hoechst
Technovit 8100	Heraeus Kultzer, Wehrheim/Ts
Technovit 3040	Heraeus Kultzer, Wehrheim/Ts
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Deiseshofen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol-Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe

rapid ID 32 A-Enzymstreifen	bioMerieux SA
apiZYM-Enzymstreifen	bioMerieux SA
Portagerm	bioMerieux SA
Kodak LX24 Entwickler	PMA Bode GmbH, Berlin
Kodak X-Ray Fixierer AL 4	PMA Bode GmbH, Berlin
Kodak Röntgenfilme, 18x24 cm	PMA Bode GmbH, Berlin
10kDA Protein Ladder	Life Technologies, Eggenstein
100 bp Marker	Life Technologies, Eggenstein
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Life Technologies, Eggenstein
dNTP	Promega, Mannheim
Phosphomycin	Sigma-Aldrich, Deiseshofen
Rifampicin	Sigma-Aldrich, Deiseshofen

### 3.1.4 Nährmedien

modifizierter Columbia Blut-Agar: 1000 ml Columbia-Agar  
0,3 g L-Cysteinhydrochlorid  
5 mg Häminlösung  
50 ml defibriniertes Hammelblut  
5 ml lysiertes Hammelblut

modifizierter Columbia Blut-Agar mit Gentamycinzusatz (40 mg/ L)

OMIZ Pat Medium	nach WYSS (1996)	
Antibiotikazusätze für Nährmedien:	Phosphomycin	1 mg/l
	Rifampicin	100 mg/l
	Gentamycin	40 mg/l

### 3.1.5 verwendete Kits

DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
NucleoSpin®Tissue	Machery&Nagel, Düren
Invisorb Spin Stool DNA Kit	Invitex, Berlin
QUIamp Stool DNA Mini Kit	Quiagen, Hilden
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

### 3.1.6 Lösungen

#### 3.1.6.1 Lösungen für die DNA-Extraktion

Lysispuffer	500 mM Tris-HCl, pH 9,0
	20 mM EDTA pH 8,0
	10 mM NaCl
	1 % SDS
TE-Puffer	10mM Tris-HCL
	1 mM EDTA
	pH 7,4

#### 3.1.6.2 Lösungen für die DNA-Messung

10x TNE-Puffer	
Hoechst Dye R3226	
DNA-Standard, Calf thymus DNA	100 ng/μl

#### 3.1.6.3 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

- 10x TBE	108	g	Tris-Base
	55	g	Borsäure
	40	ml	0,5M EDTA pH 8,0
	ad	1000	ml Aqua bidest.
- 1x TBE	100	ml	10x TBE
	ad	1000	ml Aqua bidest.
- Stop-Puffer	5	ml	Glyzerin
	2	ml	0,5 M EDTA
	0,1	ml	10mM TRIS, pH 8

		10	mg	Bromphenolblau
		2,9	ml	Aqua bidest.
- Agarose		1,2	g	Agarose
	ad	100	ml	1x TBE
-Ethidiumbromidlösung		1,2	%	

### 3.1.6.4 Lösungen für Dot blot-Hybridisierung

Zusammensetzung der Lösungen unter Verwendung des DIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)

- Maleinsäure-Puffer, pH 7,5		0,1	M	Maleinsäure
		0,15	M	NaCl
- Blocking stock solution (10 %ig)		20	g	Blocking Reagenz
	ad	200	ml	Maleinsäure-Puffer
- 10 %iges SDS		20	g	SDS
	ad	200	ml	Aqua bidest.
- 20x SSC		300	ml	1 M Na-Citrat
	ad	1000	ml	NaCl
- Standardhybridisierungspuffer		1,0	%	Blocking Reagenz
		0,1	%	10 % N-Lauroylsarkosin
		0,02	%	10 % SDS
		5x		SSC
- Waschpuffer 0		5	x	SSC
		0,2	%	SDS
- Waschpuffer 1		2	x	SSC
		0,1	%	SDS

- Waschpuffer 2	0,1	x	SSC
	0,1	%	SDS
- Waschpuffer 3	6	x	SSC
	0,2	%	SDS
- Blocking Working Solution	2,5	ml	Blocking Stock Solution
	10,0	ml	Maleinsäure-Puffer
- Detektions-Puffer, pH 9,5	0,1	M	Tris-HCl      pH 8,0
	0,1	M	NaCl
	(anschließend mit NaOH auf pH 9,5)		
- Substratlösung	2	ml	Detektions-Puffer
	13	µl	CSPD
- Stripping-Puffer	0,2	M	NaOH
	0,1	%	SDS

### 3.1.6.5 Lösungen für Fluoreszenz in situ Hybridisierungen

- Fixierlösung für Bioplate	4% Formaldehyd in PBS, pH 7,2		
- Fixierlösung für Kontrollstämmen	1 v(t) Ethanol, 96%		
	1 v(t) PBS, pH 7,2		
	1/20 v(t) Formaldehyd 40%		
- Hybridisierungspuffer	0,9 M NaCl		
	20,0 mM Tris-HCl, pH 7,2		
	0,01 % SDS		
	0-30 % Formamid		
- Antifadinglösung Citifluor	PLANO, Wetzlar		

### 3.1.6.6 Lösungen für SDS-Page

- 4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCL, pH 8,8		
---------------------	------------------------	--	--

- 4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCL, pH 6,8
- 10x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 2% SDS
- 2x Probenpuffer	0,5 M Tris/HCL, Ph 6,5 8 M Harnstoff 10% SDS 22% Glycerin 10% $\beta$ -Mercaptoethanol 0,25% Bromphenolblau
- Coomassie-Färbelösung	0,2% Coomassie R250 45% Methanol 10% Eisessig
- Entfärberlösung	5% Methanol 7,5% Eisessig

### 3.1.7 Zusammensetzung des Polyacrylamid-Gels

	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid (30%)	5 ml	0,85 ml
Trenngelpuffer 4x	3,8 ml	/
Sammelgelpuffer 4x	/	1,26 ml
10% SDS	150 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l
25% APS	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Aqua bid.	6,1 ml	2,9 m

### 3.1.8 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidsonden und Primer sowie eingesetzte Referenzstämme

#### Verwendete Oligonukleotidsonden

	Sequenz 5`-3`	16SrRNA-Position ( <i>E. coli</i> )
TRE I	ACG CAA GCT CAT CCT CAA G	220-238
TRE II	GCT CTT TTC CTC ATT TAC CTT TAT	216-239
TRE III	CCC CAT CTT AAA GGT AGA TCA C	126-147
TRE IV	CGG TCA CAT TCG GTATTA CCT ACT	152-186
TRE V	CCT TTA TTC CGT GAG ACC TTA TC	170-192
TRE VI	GTG GGC GCG TCG TCC ACG CGT TAC	108-139
TRE VII	CCC ATC CGA GAG GTA CGT CAT CCA	109-132
DDK 3	CCC TTA TTC ACA TGA TTA CCG T	481-501
DDK 4	ACA GTC TCG CTT CAC TTT GTA G	1245-1266
DDK 12	ACC CTC TCC ACA AGA ATA TAA	173-194
DDK 20	GGG CTC CTA TCT AGG CGA AG	215-234
DDK 5/3	CCT CAC AGC TCT CTA ACC TC	188-204
TSOC	CATTGCTGCCTGCCGCTCGACTTG	53-81

#### PCR-Primer:

Primer	Sequenz 5`-3`	16SrRNA Position ( <i>E. coli</i> )
RTU 8	AAG GAG GTG ATC CAK CCR CA	1521-1540
TPU 1	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	8-27
RTU 3	GWA TTA CCG CGG CKG CTG	518-535
SPU 1	GTY TTA AGC ATG CAA GTC G	46-64
TPU 1-m13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGA GTT TGA TCM TGG CTC	-----

## Rekombinante Klone

Klon	Registrierungsnummer
DDKL-3	Y08893 ( <b>Choi et al. 1997</b> )
DDKL-4	Y08894 “
DDKL-12	Y08895 “
DDKL 13	Y08896 “
DDKL-20	Y08897 “
TRE I Klon 16, 142, 147	<b>Choi et al. 1994</b>
TRE II Klon 114, 158	“
TRE III Klon 32, 145	“
TRE IV Klon 30, 122	“
TRE V Klon 124, 155	“
TRE VII Klon 21	“

## Referenzstämme:

Stamm	Registrierung
<i>Treponema vincentii</i>	ATCC 35580
<i>Treponema medium</i>	HA1B7
<i>Treponema denticola</i>	ATCC 33521 <sup>T</sup>
<i>Treponema maltophilum</i>	X 87140
<i>Treponema lecithinolyticum</i>	ATCC 700332 <sup>T</sup>
<i>Treponema phagedenis</i>	Biotype Reiter
<i>Treponema brennaborensense</i>	DSM 12168 <sup>T</sup>
<i>Treponema socranskii</i> ssp. <i>socranskii</i>	ATCC 35536 <sup>T</sup>
<i>Treponema socranskii</i> ssp. <i>buccale</i>	ATCC 35534 <sup>T</sup>
<i>Treponema socranskii</i> ssp. <i>paredis</i>	ATCC 35535 <sup>T</sup>
<i>Treponema pectinovorum</i>	ATCC 33768 <sup>T</sup>

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Entnahme des Probenmaterials

Insgesamt wurden jeweils 58 Biopate, Kot- und Pansensaftproben untersucht. Je 3 Biopstatstanzen pro Tier wurden aus erkrankten Klauenarealen nach oberflächlicher Reinigung durch Wasser mit einer Biopstatstanze herausgestanzt. Für die spätere DNA-Aufarbeitung wurde eine Stanze in Lysispuffer gelagert, für die bakteriologische Untersuchung wurde eine Stanze in das Transportmedium Portagerm verbracht und gekühlt gelagert. Eine Stanze wurde in 4% Formaldehyd-Lösung, pH 7,4 für die spätere Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung fixiert.

### 3.2.2 Bakteriologische Untersuchung

Die Biopate wurden steril aus dem Portagerm-Medium entnommen und mit einer sterilen Schere angeschnitten. Die frischen Schnittflächen wurden jeweils auf einer mod. Columbia-Blut-Platte mit und ohne Gentamicin-Zusatz fraktioniert ausgestrichen und anschließend für 4-6 Tage anaerob bei 37° C inkubiert. Von den unterschiedlichen Einzelkolonien wurde jeweils eine aerobe Subkultur angelegt, um eventuelle aerobe Keime auszuschließen, sowie ein diagnostisches Antibioogramm zur Differenzierung angelegt. Dabei diente das in Tab.3 aufgeführte Resistenzverhalten zur Differenzierung (nach Mast-Diagnostica, Rheinfeld).

Tabelle 3: Differenzierungsschema anhand des Resistenzverhalten.

<i>Organismus</i>	<i>Antibiotikum</i>						
	Erythromycin	Rifampicin	Colistin	Pen.G	Kanamycin	Vancomycin	Galle
<i>Bacteroides fragilis</i> -Gruppe	S	S	R	R	R	R	R
<i>Prevotella melaninogenica/ oralis</i>	S	S	S*	S*	R	R	R
<i>Porphyromonas</i> spp.	S	S	S	S*	R	R	S
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	S	V	S	S	S	R	S
<i>Fusobacterium mortiferum/ varium</i>	R	R	S	S	S	R	R
andere <i>Fusobacterium</i> spp.	R*	R*	S	S	S	R	S
Gram-positive Kokken	S	S	R	S*	V	S	S
<i>Clostridium</i> spp.	S	S	R	S*	V	S	S
Gram-positive Bacilli (NSGPA)	S	S*	R	S*	V	S	S
Gram-positive Kokken	S	S	S	S	S	R	S

S = sensibel, S\* = meistens sensibel, R = resistant, R\* = meistens resistant, V = variable, NSGPA = nicht sporulierende gram-positive Art (Angaben entsprechend des Herstellers).

Anhand des diagnostischen Antibiogramms, der Koloniemorphologie sowie des Gramverhaltens wurde die bakteriologische Diagnose gestellt. Waren diese Kriterien nicht ausreichend für eine Diagnose, wurde zusätzlich die Biochemie mit Hilfe eines rapid ID 32 A-Streifens (bioMerieux) überprüft.

*Peptostreptococcus anaerobicus* wurde von anderen Gram-positiven Kokken durch seine SPS-Resistenz (Sodium-Polyethanol-Sulfonat) unterschieden und *Porphyromonas levii* wurde von anderen *Porphyromonas* spp. durch fehlende Indolbildung differenziert.

### **3.2.3 Anzucht und Charakterisierung von Isolaten**

#### **3.2.3.1 Anzucht**

Nach Herausstanzen der Biopate wurden diese für den Rücktransport zum Labor sofort in ein Anaerobier-Transportmedium (Portagerm, bioMerieux) verbracht. Die Biopate wurden anschließend aus dem Transportmedium entnommen und mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und in vorreduziertes und mit Rifampicin und Phosphomycin supplementiertem OMIZ-Pat-Medium überführt. Hiervon wurden 100 µl im Rahmen des Limit-dilution-Verfahrens mit 200 µl neuer OMIZ-Pat-Lösung in der ersten Verdünnungsstufe überführt. Zusätzlich wurden von der ersten Verdünnung ausgehend fünf weitere 1:10-Verdünnungen angelegt. Der ganze Vorgang des Limit-dilution-Verfahrens wurde in 96-er Mikrotiterplatten durchgeführt. Nach anaerober Inkubation für 3-5 Tage fand eine mikroskopisch Beurteilung jeder einzelnen Verdünnungsstufe in einem Dunkelfeldmikroskop statt. Waren spiralförmige Bakterien mikroskopisch zu sehen, wurde von dieser Verdünnungsstufe ein Verdünnungsausstrich auf 1,3%igem OMIZ-Pat-Agar angelegt und diese wurden für weitere 3-5 Tage anaerob inkubiert. Einzelkolonien wurden erneut in flüssiges OMIZ-Pat-Medium überführt und nach ausreichendem Anwachsen mit 20% Glycerin bei -80 °C eingefroren.

#### **3.2.3.2 Biochemische Charakterisierung angezüchteter Isolate**

Isolate wurden in 15 ml OMIZ-Pat-Medium anaerob inkubiert und nach sichtbarer Trübung des Mediums und Beurteilung mittels Dunkelfeldmikroskopie wurden die Isolate in einer Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde auf einen McFarland-Standard von 5-6 eingestellt und das Enzymmuster wurde jeweils mit einem apiZYM- und einem rapid ID 32 A-Streifen überprüft.

### **3.2.3.3 Genotypische Charakterisierung**

DNA wurde von jedem Isolat durch Inkubation mit einem Lysispuffer und Proteinase K (15 mg/ml) bei 53 °C für 30 min aufgeschlossen. Die DNA wurde im Anschluss mit einer Phenol-Chloroform-Aufarbeitung aufgereinigt. Zur Amplifikation der 16S rDNA wurde eine PCR mit den Primern TPU1-m13 und RTU8-m13 durchgeführt und anschließend die korrekte Größe des Amplifikats mittels Gelelektrophorese überprüft. Nach dem Ausschneiden der PCR-Banden aus dem Gel wurden diese mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgereinigt. Die DNA in dem Eluat wurde fluorometrisch gemessen und auf 100 ng/µl eingestellt. Dieses Fragment wurde kommerziell sequenzanalysiert (AGOWA, Berlin).

Die Sequenz der 16S rDNA dieser Isolate wurde mit Hilfe des Programms DNASTAR analysiert und abgeglichen. Ein phylogenetischer Baum wurde mit Hilfe des Programms TREECON (Copyright © 1994-2001, Yves van de Peer) erstellt.

Die genotypische Überprüfung erfolgte an den Isolaten DD49/1, DD52/7 und DD53/1.

## **3.2.4 DNA-Extraktion des Probenmaterials**

### **3.2.4.1 Biopate**

Biopate von 0,8 cm wurden mit einer Biopatstanze aus erkrankten Hautbereichen entnommen, in 1 ml Lysispuffer überführt und bei -20° C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt. Nach dem erneuten Auftauen wurden die Proben mit einem Skalpell zerkleinert und in den gleichen Lysispuffer zurückgeführt. Es erfolgte die Zugabe von Proteinase K (15mg/ml) und die Proben wurden bei 53° C in einem Schüttelinkubator bis zur vollständigen Lyse inkubiert.

Im Anschluss erfolgte eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung, indem jeweils 1 Volumenteil einer Phenol-, einer Phenol-Chloroform- und einer Chloroformlösung dem Lysat zugesetzt wurde. Diese Mischung wurde für 1 Minute mittels eines Vortexers geschüttelt, um eine homogene Mischung zu erhalten. Durch anschließende Zentrifugation bei 13000U/min bei 4° C erfolgte eine Auftrennung der beiden Phasen und die jeweils wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt.

Die Fällung der DNA wurde durch Zugabe von 2 Volumenteilen absolutem Ethanol und 1/10 Volumenteil einer 3 M Natriumacetatlösung nach einer Mindestinkubation von 2 Stunden bei -20° C erreicht. Die ausgefällte DNA wurde bei 13.000U/min abpelletiert, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und schließlich getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer gelöst und bei -20° C gelagert.

### **3.2.4.2 Kot und Pansensaft**

Um eine geeignete Methode für die DNA-Extraktion aus Pansen- und Kotproben zu ermitteln, wurden folgende DNA-Extraktionsmethoden ausgetestet:

- High Pure PCR Template Preparation Kit - Boehringer Mannheim
- QIAamp Tissue Kit - Quiagen
- Master Pure Genomic DNA Purification Kit - Epicentre Technologies
- E.Z.N.A Bacterial DNA Kit - PEQLAB Biotechnologie GmbH
- NucleoSpin Tissue - Macherey & Nagel
- Invisorb Spin Stool DNA Kit - Invitex GmbH
- CTAB-Aufarbeitung
- Hitzelyse

Zuerst wurden diese Extraktionsmethoden bei der Gewinnung von DNA aus Pansensaft überprüft.

Die gewonnene DNA wurde im Anschluss für eine Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt, in welcher die Primer RTU8 und TPU1 Verwendung fanden, um ein ca. 1500 bp langes Fragment der 16S rDNA zu amplifizieren. Die so aufbereitete DNA wurde jeweils in den Verdünnungsstufen 1:1, 1:10 und 1:100 in der PCR-Reaktion eingesetzt.

Die Ergebnisse der PCR-Reaktion wurden mit Hilfe einer Gelelektrophorese hinsichtlich der Intensität und des Vorkommens der entsprechenden Bande verifiziert.

Verwertbare DNA-Extraktionsmethoden wurden schließlich auch an Kotproben evaluiert und die geeignetste Methode dann schließlich für alle Kot- und Pansensaftproben verwendet.

Die Kot- und Pansen-DNA aus den zu untersuchenden Proben wurde schließlich mit Hilfe eines kommerziellen DNA-Aufarbeitungskits der Firma Macherey & Nagel gewonnen. Unter Verwendung des Supportprotokolls für Aufarbeitungen aus Kot wurden ca. 200 mg Kot und Pansensaft der DNA-Aufarbeitung zugeführt und entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgearbeitet. Die eluierte DNA wurde bei -20° C gelagert.

### **3.2.5 Polymerase-Ketten Reaktion**

Folgende Primerpaare wurden für die Amplifikation der 16S rDNA verwendet:

1. TPU1/RTU8
2. SPU1/RTU3.

Insgesamt wurde ein Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  angesetzt. Die einzelnen Reaktionskomponenten wurden wie folgt eingesetzt:

H <sub>2</sub> O	80,5 $\mu\text{l}$
Reaktionspuffer	10 $\mu\text{l}$
MgCl	4 $\mu\text{l}$
dNTP	2 $\mu\text{l}$
Primer 1	1 $\mu\text{l}$
Primer 2	1 $\mu\text{l}$
Taq-Polymerase	0,5 $\mu\text{l}$
DNA-Template	1 $\mu\text{l}$

Das Thermocycler-Programm für beide Primerpaare bestand aus folgenden Zyklen:

Schritt 1: Denaturierung	94° C	5 min
Schritt 2: Denaturierung	94° C	60 sec
Schritt 3: Annealing	56° C	60 sec
Schritt 4: Polymerisation	72° C	120 sec
Schritt 5: Extension	72° C	5 min
Schritt 6: Pause	4° C	~~

### 3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden zur Überprüfung der PCR-Reaktion 1,3 %-ige Gele gegossen. Die Agarose-Gele wurden für die spätere Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht mit 1,3  $\mu\text{l}$  einer 1%-Ethidiumbromidlösung versetzt. Pro aufzutragende Probe wurden 3  $\mu\text{l}$  Stopppuffer mit 7  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt vermischt und auf das Agarose-Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde ein 100 bp-Marker mit aufgetragen. Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde eine Spannung von 120 V für 90 min angelegt. Im Anschluss wurde das Gel in einem Transilluminator überprüft.

### 3.2.7 Dot blot-Hybridisierung

#### 3.2.7.1 DIG-labeling der Oligonukleotidsonden

Unter Verwendung des DIG Oligonucleotide 3'- End Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurden insgesamt 100 pmol mit Digoxigenin entsprechend den

Herstellerangaben gelabelt. Die gelabelte Oligonukleotidsonde wurde mit Ethanol gefällt und in einem Gesamtvolumen von 20 µl resuspendiert. 10 ml Standardhybridisierungslösung wurde mit 5 µl der resuspendierten Sonde versetzt und bei -20° gelagert.

### 3.2.7.2 Beschickung der Dot blot-Membran

Auf die Nylonmembran wurden 1 cm<sup>2</sup> große Quadrate durch die Schutzfolie eingedrückt. Die PCR-Produkte wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Jeweils 5 µl von jedem PCR-Produkt wurden auf die Nylonmembran pipettiert. Nach dem Trocknen der Membran wurden die aufgetragenen PCR-Produkte durch Bestrahlung mit UV-Licht (λ=312 nm) für 3 Minuten von jeder Seite fixiert und die Membran bei 4° C gelagert.

### 3.2.7.3 Dot blot-Hybridisierung

Die Dot blot-Hybridisierung erfolgte in mehreren nachfolgend aufgelisteten Schritten:

<i>Arbeitsschritte</i>	<i>Dauer</i>	<i>Lösung</i>
1. Prähybridisierung	30 min	Standardhybridisierungslsg.
2. Hybridisierung	90 min	Standardhybridisierungslsg. + 25 pmol Sonde
3. Waschen	2 x 15 min	Waschpuffer 0, 1 oder 2
4. Blocken	30 min	Blocking working solution
5. Detektion	30 min	Blocking working solution + 2 µl Anti-Dig-Lsg.
6. Waschen	2 x 15 min	Maleinsäurepuffer
7. Waschen	5 min	Detektionpuffer
8. Detektion	5 min	Detektionspuffer + 12µl CSPD
9. Stripping	2 x 15 min	Strippingpuffer

Die Wahl der Hybridisierungstemperaturen und der Waschpuffer richtete sich nach der jeweiligen Sonde. Die notwendige Stringenz wurde durch die entsprechende Hybridisierungs- und Waschttemperatur sowie der Verwendung des entsprechenden Waschpuffers erreicht.

Tabelle 4: Hybridisierungs- und Waschttemperaturen sowie Art der verwendeten Waschpuffer.

Sonde	Hybridisierungstemperatur	Waschtemperatur	Waschpuffer1	Waschpuffer2
DDK4	59° C	59° C	WP 0	WP 0
DDK3	55° C	58° C	WP 0	WP 0
DDK12	55° C	57° C	WP 0	WP 0
DDK20	60° C	62° C	WP 0	WP 0
DDK5/3	54° C	56° C	WP 0	WP 0
TREI	54° C	60° C	WP 0	WP 0
TREII	54° C	62° C	WP 0	WP 0
TREIII	54° C	63° C	WP 0	WP 1
TREIV	54° C	59° C	WP 0	WP 0
TREV	54° C	63° C	WP 0	WP 1
TREVI	54° C	60° C	WP 0	WP 2
TREVII	54° C	60° C	WP 0	WP 1
T.soc	54° C	56° C	WP 1	WP 2

### 3.2.7.4 Nachweis gebundener Oligonukleotidsonden

Durch Zugabe von 2 µl Anti-Dig-Antikörper-Lösung zu 10 ml Blocking working-Lösung bindet der Antikörper an die mit Digoxigenin markierte Oligonukleotidsonde und das Chemilumineszenz-Substrat CSPD kann durch die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase umgesetzt werden. Die Membran wird zum Schluss in Klarsichtfolie eingeschlagen und mit einem Röntgenfilm inkubiert. Die Inkubationsdauer beträgt zwischen 2 und 12 Stunden.

Nach dem Entwickeln wurde die gebundene Oligonukleotidsonde durch Waschen mit Strippingpuffer von der Membran entfernt und die Membran wurde für weitere Hybridisierungen verwendet.

### **3.2.8 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)**

#### **3.2.8.1 Fixierung der Kontrollstämme**

Kontrollstämme wurden mit 7.000 U/min in einer Kühlzentrifuge bei 4° C pelletiert und 2x mit PBS-Puffer, pH 7,2 gewaschen. Das Bakterienpellet wurde anschließend mit Fixierlösung für Bakterienstämme versetzt und bei – 20° C gelagert.

#### **3.2.8.2 Fixierung der Bioptate**

Nach Entnahme der Bioptate mit einer Hautstanze wurden diese sofort in Fixierpuffer verbracht und bei 4° C bis zur weiteren Einbettung gelagert.

#### **3.2.8.3 Einbettung der Bioptate**

Die gesamte Einbettung der Bioptate erfolgte in Kunststoff unter Verwendung von Technovit 8100, Heraeus Kultzer. Die Bioptate wurden zunächst mit einem Skalpell halbiert und über Nacht in PBS mit 6,8% Saccharose gewaschen. Die Entwässerung des Gewebes erfolgte in 100%igem Aceton. Während der ersten Minuten wurde das Aceton so häufig gewechselt, bis keine Trübung des Acetons mehr sichtbar war. Die Infiltration des Gewebes mit einer Mischung aus Technovit 8100 plus Härter I erfolgte für 6-10 Stunden bei 4° C und im Anschluss hieran wurden die Bioptathälften zunächst entsprechend der Schneiderichtung in die Einbettungsform (Histoform S, Heraeus Kultzer) orientiert und die Aushärtung des Kunststoffes erfolgte durch Zugabe der Infiltrationslösung plus Härter II bei 4° C. Schließlich wurden die eingebetteten Bioptate mit Hilfe von Technovit 3040 auf Histoblöcke geklebt und aus der Einbettungsform entfernt. Die Lagerung erfolgte bei 4° C.

#### **3.2.8.4 Schneiden und Aufziehen der Bioptate**

Es wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 2-3 µm mit einem Mikrotom angefertigt und auf silanisierete Objektträger aufgezogen. Zum Silanisieren wurde Aceton mit 2 % 3-Aminopropyltriethoxysilane versetzt und Objektträger für 3 min in diese Lösung getaucht. Anschließend wurden die Objektträger zweimal in purem Aceton gewaschen. Die fertigen Schnitte wurden bei 4° C gelagert.

#### **3.2.8.5 Verwendete Bioptate für die FISH**

Für die Fluoreszenz *n situ*-Hybridisierung wurden insgesamt an sieben Bioptaten durchgeführt: DD 11, DD 14, DD 15, DD 16, DD 27, DD 31, DD 34. Die Auswahl dieser Bioptate erfolgte in Abhängigkeit von der Qualität der Einbettung. Bei vielen Bioptaten zeigte

sich nach erfolgter Kunststoffeinbettung, dass die Bioplate schlecht ausgehärtet waren. Deshalb sind oben aufgeführte Bioplate verwendet worden, da bei diesen die Einbettung optimal verlief und sich geeignete Gewebeschnitte anfertigen ließen.

### **3.2.8.6 Verwendete Oligonukleotidsonden für die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung**

Für die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung wurden die Oligonukleotidsonden TRE I, II, IV und DDK4 verwendet. Die Sonden waren kommerziell erworben (TibMolbiol, Berlin) und am 5'-Ende entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 oder FITC gelabelt.

### **3.2.8.7 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung**

Zur Hybridisierung eines Bioplates wurde ein Endvolumen von 20 µl Hybridisierungslösung verwendet. Um eine ausreichende Stringenz zu erhalten, wurde dem Hybridisierungspuffer Formamid in einer Konzentration von 20% zugesetzt. Bei der Oligonukleotidsonde TRE II wurde Formamid in einer Konzentration von 30% zugesetzt, um die Stringenz zu erhöhen. Zu diesem Endvolumen wurde jede der verwendeten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden in Höhe von 100 ng zugesetzt.

Die mit Hybridisierungslösung beschichteten Objektträger wurden für 2 1/2 Stunden bei 50° C in einer feuchten Kammer inkubiert und im Anschluss mit dem Eindeckmittel Citifluor AF1 überdeckt.

### **3.2.8.8 Mikroskopische Beurteilung**

Die mikroskopische Beurteilung erfolgte mit einem DMBL-Epifluoreszenzmikroskop (Leica Bensheim). Das Epifluoreszenzmikroskop war mit den Fluoreszenzfilterblöcken L5 und Y3 ausgestattet. Bilder wurden mit einer dazu gehörenden digitalen Kamera angefertigt und als Datei digital gespeichert.

## **3.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

### **3.2.9.1 Zell-Lysate**

Reinkulturen der jeweiligen *Treponema*-spp. sowie der Isolate wurden bei 7000 U/min, 4 °C pelletiert und der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 500 µl Lysispuffer aufgenommen.

### **3.2.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Lowry durchgeführt. Das Spectrophotometer wurde gegen folgende BSA-Standards abgeglichen: 1,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 7,50 mg/ml, 3,75 mg/ml und 1,87 mg/ml.

Jeweils 7,5 µl jeder Lysatproben wurden mit 67,5 µl Aqua bidest. 1:10 verdünnt und mit 750 µl Reagenz C und 75 µl Folin-Ciocalteu-Lösung gemischt bei 750 nm gemessen. Nach der Eichung wurden die einzelnen Lysatproben in der gleichen Weise in dem Spektrophotometer gemessen und die Proteinkonzentrationen unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen berechnet.

### **3.2.9.3 Durchführung der SDS-Gelelektrophorese**

Zwei geklammerte Glasplatten wurden vertikal aufgestellt, mit dem 10%igem Trenngel bis ca. 1,5 cm unterhalb des oberen Randes aufgefüllt und mit Wasser während der Polymerisation überschichtet. Nach 1 h wurde das Wasser entfernt und das 5%ige Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen. Nach einstündiger Polymerisation wurde der Gelkamm entfernt und das Gel in die Gelkammer eingespannt.

Von jeder Probe wurden 12 µg für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Das entsprechende Volumen jeder einzelnen Probe wurde mit demselben Volumen eines 2x-konzentrierten Probenpuffers versetzt und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Die Gelelektrophorese begann zunächst mit 27 mA für 15 min und wurde dann bei 36 mA für ca. 50 min weitergeführt.

### **3.2.10 Bestimmung der Nachweisgrenzen (Dot blot-Hybridisierung)**

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze verschiedener kommerziell erhältlicher DNA-Aufarbeitungskits wurde DNA von 4 verschiedenen *Treponema*-Stämmen gewonnen und Rinderkot bzw. Pansensaft in einer Verdünnungsreihe künstlich zugesetzt. Hiervon wurde im Anschluss jeweils eine DNA-Aufarbeitung mit 3 verschiedenen kommerziellen Aufarbeitungskits durchgeführt:

1. NucleoSpin Tissue Kit (Machery&Nagel)
2. Invisorb Spin Stool DNA Kit

Von der aufgearbeiteten DNA wurden Fragmente der 16S rRNA mit dem Primerpaar SPU1/RTU3 in einer PCR amplifiziert und jeweils 5 µl PCR-Produkt wurden auf eine Nylonmembran gespottet.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte beispielhaft an 4 verschiedenen Oligonukleotidsonden, die Fragmente der 16S rRNA der 4 verschiedenen, künstlich zugesetzten *Treponema*-Spezies detektieren.

### **3.2.10.1 DNA-Extraktion der eingesetzten *Treponema*-Stämme**

Von den vier Spezies *T. vincentii*, *T. socranskii socranskii*, *T. lecithinolyticum* sowie *T. brennaborensis* wurde eine Flüssigkultur mit OMIZ-Pat Medium inkubiert. Nach anaerober Anreicherung wurde 1ml des Mediums mittels Zentrifugation pelletiert und das Bakterienpellet mit 0,5 ml Lysispuffer sowie 50 µl Proteinase K (15mg/ml) versetzt und für eine 1 Stunde bei 53 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Das Lysat wurde mit einer Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt und mit Ethanol gefällt. Das DNA-Präzipitat wurde in 100 µl Aqua bidest gelöst und bei –20 °C gelagert.

### **3.2.10.2 DNA-Messung**

Die Messung der DNA wurde fluorometrisch an einem Fluorometer (Dynaquant 200, Amersham Biosciences) durchgeführt. Das Gerät wurde mittels eines DNA-Standards auf 100 ng/µl geeicht. Zu 2 ml Messlösung wurden von jeder zu messenden DNA-Probe 2 µl hinzupipettiert. Der Messvorgang wurde für jede Probe dreimal wiederholt und es wurde hiervon der Mittelwert gebildet.

### **3.2.10.3 Zugabe definierter DNA-Mengen zu Kot- bzw. Pansensaftproben**

Die gemessene DNA von jeder der 4 eingesetzten *Treponema* – Spezies wurde ausgehend von 100 ng in einer dezimalen Verdünnungsreihe bis auf 10 fg verdünnt. Jeweils 200 mg Kot bzw. Pansensaft wurden abgewogen und auf Eis gelagert. Nach der Zugabe des zum Aufarbeitungskit gehörenden Lysispuffers wurde die DNA von jeder einzelnen Verdünnungsstufe zu jeweils einer Kot- bzw. Pansensaftprobe hinzupipettiert. Die DNA-Aufarbeitung wurde gemäß dem Aufarbeitungsprotokoll durchgeführt. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle jeweils eine Kot- und Pansensaftprobe ohne künstliche DNA-Zugabe aufgearbeitet.

#### **3.2.10.4 Zugabe definierter DNA-Mengen zu einer Polymerase-Ketten-Reaktion**

Um die Nachweisgrenze bei direkter Zugabe von spezifischer DNA zu einer PCR-Reaktion zu ermitteln, wurde DNA von *T. lecithinolyticum* in einer Verdünnungsreihe von 10 ng bis 100 fg zusätzlich zu aufgearbeiteter DNA aus Kot- bzw. Pansensaftproben hinzugegeben. Die DNA aus Kot und Pansensaft war mit dem NucleoSpin Tissue Kit gewonnen worden. Dieser Versuch diente dazu, einen Überblick darüber zu erhalten, wie effizient die Polymerase-Ketten-Reaktion selbst ist.

#### **3.2.10.5 Ermittlung der Detektionsgrenze Digoxigenin-gelabelter Oligonukleotidsonden**

Um die Nachweisgrenze der hier eingesetzten, Digoxigenin-gelabelten Oligonukleotidsonden unter den beschriebenen Bedingungen beispielhaft zu ermitteln, wurde zunächst 16S rDNA von *T. lecithinolyticum*, *T. brennaborensis*, *T. vincentii* und *T. socranskii socranskii* in einer PCR amplifiziert. Zur Verifizierung der Reaktion wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die vorhandene Bande wurde aus dem Gel herausgeschnitten und mit einem Aufreinigungskit gereinigt. Im Anschluss wurde die vorhandene DNA-Menge fluorometrisch (Fluorometer DyNA Quant 200 Amersham Biosciences, Freiburg) gemessen und mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurde das PCR-Produkt in einer Größenordnung von 10 ng bis 100 fg pro Feld auf eine Nylonmembran getropft.

#### **3.2.10.6 Feststellung der jeweiligen Nachweisgrenzen mittels Dot blot-Hybridisierung**

Nachdem von jedem PCR-Produkt bzw. der aufgereinigten 16S rDNA von *T. lecithinolyticum* 5 µl auf eine positiv geladene Nylonmembran pipettiert wurden, wurden diese nach dem Trocknen mittels UV-Licht kovalent auf die Membran crossgelinkt. Um die Nachweisgrenzen nach der künstlichen Zugabe von *Treponema*-DNA festzustellen, wurden Dot blot-Hybridisierungen mit folgenden 4 Sonden durchgeführt:

1. TRE I
2. TRE IV
3. DD 5/3
4. TSOC.

Die zugesetzte DNA der 4 verschiedenen *Treponema*-Spezies wurde mittels 4 verschiedener Oligonukleotidsonden detektiert, *T. vincentii* mit TRE I, *T. lecithinolyticum* mit TRE IV, *T. brennaborensis* mit DD 5/3 und *T. socranskii socranskii* mit TSOC.