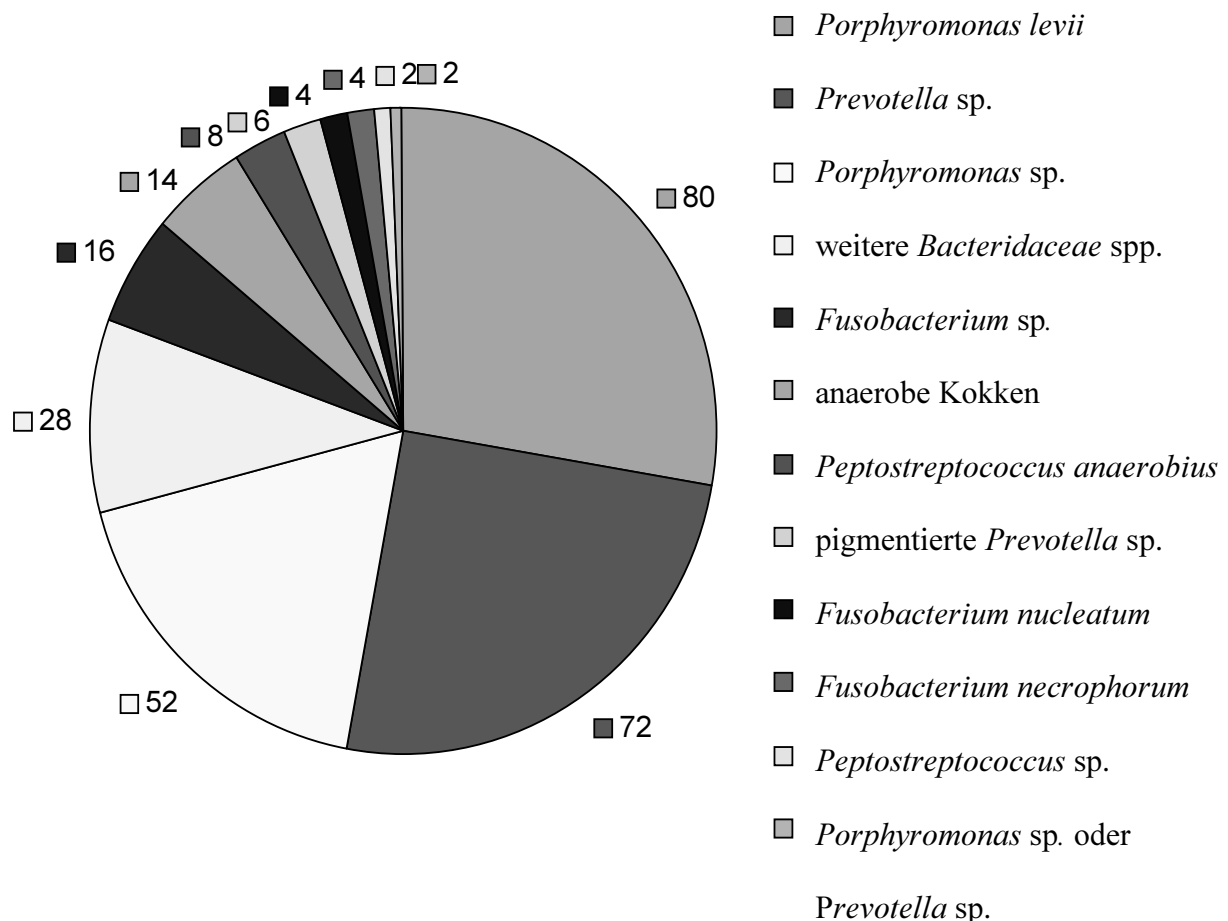


5. Diskussion

Neben der konventionellen Diagnostik wurden in dieser Untersuchung als kulturunabhängige Methode 16S rDNA-basierte Nachweisverfahren eingesetzt. Somit konnte neben dem diagnostischen Nachweis charakteristischerweise vorkommender anaerober Keime auch der kulturunabhängige Nachweis von Treponemen erfolgen, der bei den vorliegenden Untersuchungen den Schwerpunkt bildete. Aufgrund der umfangreichen Auswahl von *Treponema* spezies-spezifischen Sonden konnte mittels verschiedener Hybridisierungsmethoden auch die hohe Biodiversität des Genus *Treponema* beim Krankheitsbild der Dermatitis digitalis belegt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigen die große Biodiversität von Treponemen des Rindes sowie die Tatsache, dass *Treponema* spp. als typischerweise bei der DD vorkommende Bakterien zu betrachten sind. Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) zeigen weiterhin nicht nur das massive Vorkommen von Treponemen, sondern lassen auch eine Mitbeteiligung in diesem Krankheitsbild vermuten.

Zunächst konnten in der bakteriologischen Diagnostik die charakteristischen anaeroben Leitkeime identifiziert werden, die im Zusammenhang mit der Dermatitis digitalis bereits mehrfach beschrieben sind.

Abbildung 15: prozentuale Verteilung vorkommender Anaerobier-Isolate.



Am stärksten waren typischerweise neben *Porphyromonas levii*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp. sowie *Fusobacterium* spp. vertreten.

Diese Nachweise entsprechen der Literatur (METZNER et al., 1995; METZNER, 2001). Auch GRUND et al. (1995) konnten in bakteriologischen Untersuchungen an insgesamt 488 Dermatitis digitalis-Proben aus 142 Beständen *Porphyromonas levii* mit 72% und *Fusobacterium necrophorum* mit 24% sowie verschiedene *Prevotella* spp. und nicht-pigmentierte gramnegative sporenlose Anaerobier, pigmentierte gramnegative anaerobe Stäbchen als auch anaerobe grampositive Kokken identifizieren. Auch bei Schafen wurden im Zusammenhang mit der „severe virulent ovine foot rot (SVOFR)“ *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides fragilis* und *Prevotella* spp. isoliert (DEMIRKAN et al., 2001). Die in der bakteriologischen Diagnostik isolierten Spezies repräsentieren also typischerweise die bei der DD vorkommenden Anaerobier, und diese Befunde belegen zum wiederholten Male klar, dass es sich bei der DD um eine typische chronische Mischinfektion mit anaeroben Keimen handelt. Hieraus lässt sich allerdings nicht ableiten, welcher Keim als primäres Pathogen wirkt und eventuell als Wegbereiter für andere Bakterienspezies fungiert, so wie es zum Beispiel bei der Moderhinke des Schafes bereits bekannt ist (HURTADO et al., 1998).

Insgesamt gelang bei drei der 58 Bioplate neben dem DNA-Nachweis auch eine Isolierung von *Treponema*-Spezies. Die Untersuchungen des Enzymmusters, der 16S rDNA-Sequenz sowie des Proteinmusters ergaben, dass alle Isolate identisch waren und somit einheitlich zu einem Isolat mit der Bezeichnung DD49 zusammengefasst wurden. Zwar wurde bei dem Einzelisolat DD53/1 im Gegensatz zu den übrigen Isolaten eine schwache Esterase-Lipase C8-Aktivität festgestellt, doch ist dieses Isolat genotypisch mit den anderen Isolaten identisch. Da eine Zuordnung auf genotypischer Ebene immer aussagekräftiger ist als auf Enzymebene, werden diese Isolate als identisch betrachtet (ROHDE et al., 2002). Ebenso verweisen die Enzymmuster auf eine Zuordnung zur Socranskii-Subgruppe, insbesondere besteht hier zu *Treponema socranskii socranskii* die größte Ähnlichkeit. Allen gemeinsam ist das Vorhandensein der Enzyme alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, die Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase sowie Esterase (C4), während das Isolat DD 53/1, wie oben angeführt, zudem eine schwache Aktivität der Esterase Lipase (C8) aufweist. Es zeigt somit auf Basis des Enzymmusters eine stärkere Übereinstimmung mit *Treponema socranskii paretis*.

Ausgehend vom 5'-Ende der 16S rDNA-Sequenz ergab die entsprechende Analyse der ersten 600 Basen mit 98,3 % die größte Übereinstimmung zur Sequenz AY005083 eines oralen *Treponema*-Isolates. Zu weiteren kultivierbaren Vertretern besteht die größte Verwandtschaft zu *Treponema socranskii* ssp. '04' mit 97,1 % bzw. zu *Treponema socranskii* ssp. *buccale* mit

97 %. Zwar wurden nur die ersten 600 Basen zur phylogenetischen Analyse herangezogen, doch reicht dieser Informationsgehalt für eine orientierende Einordnung aus (CHOI et al., 1994).

Bisher wurden Vertreter der Spezies *Treponema socranskii* nur beim Menschen und beim Hund isoliert. Dort war die Spezies vor allem im Zusammenhang mit periodontalen Erkrankungen identifiziert worden (RIVIÈRE et al., 1996; SAKAMOTO et al., 1999). Erst kürzlich wurde *Treponema socranskii* allerdings auch in Gehirngewebe von Patienten nachgewiesen, die an der Alzheimer Krankheit erkrankt waren (RIVIÈRE et al., 2002). Beim Rind wurde im Zusammenhang mit der Dermatitis digitalis bislang an kultivierbaren Vertretern der Spezies *Treponema* die bis dahin unbekannte Spezies *Treponema brennaborensis* beschrieben sowie mehrere Isolate, die der Phylotypgruppe TRE II nach Choi zuzuordnen sind (WALKER et al., 1995; SCHRANK et al., 1999). Insofern belegt die Isolierung der Spezies *Treponema socranskii* aus diesem Krankheitsprozess erneut die hohe Diversität.

Vertreter der jeweiligen Subspezies von *Treponema socranskii* sind bisher im Zusammenhang mit der DD noch nicht beschrieben worden. Welchen Einfluss diese Treponeme auf die Pathogenese der DD besitzt, ist allerdings noch völlig offen. So konnte dieses Isolat auch nur bei drei Proben isoliert werden, während DNA-DNA Dot blot-Hybridisierungen der Biotatproben mit einer *Treponema socranskii*-spezifischen Oligonukleotidsonden negativ verliefen. Andererseits ist die Kultivierung der verschiedensten *Treponema* spp. generell mit großen Schwierigkeiten behaftet, da diese einen hohen Anspruch an das Nährmedium haben (WYSS, 1992). Da zudem die exakten Ansprüche an das Nährmedium von vielen *Treponema*-spp. unbekannt sind, insbesondere von jenen Phylotypen, die nur anhand ihrer 16S rDNA-Sequenz identifiziert werden konnten, wird die Anzucht vieler Spezies auch dauerhaft nicht gelingen. Der Umstand, dass dieser Vertreter jedoch auch mit Hilfe einer speziesspezifischen Sonde nicht nachzuweisen war, deutet eher darauf hin, dass diese Vertreter in einer zu geringen Anzahl vorliegen, um sie mit Hilfe der Dot blot-Hybridisierung nachzuweisen. Diese Befunde verdeutlichen, dass trotz der vielen Vorteile der kulturunabhängigen Identifizierung die Anwendung kultureller Methoden unverzichtbar ist.

Eine etwaige Rolle dieser Spezies in der Pathogenese der DD könnte durch weitere Untersuchungen erhärtet werden, falls ähnliche Isolate zukünftig bei der DD isoliert bzw. nachgewiesen werden können. Zumindest im Zusammenhang mit periodontalen Erkrankungen ist das häufige Auftreten und die pathogene Rolle der verschiedenen *Treponema*

socranskii-Subtypen aufgezeigt worden (TAKEUCHI et al., 2001). Die hier vorliegenden Befunde bestätigen somit den Modellcharakter der DD für Parodontopathien.

Wie bereits in vorhergehenden Studien unter Verwendung von 16S rDNA-Genbanken bzw. Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen gezeigt werden konnte, herrscht bei der Dermatitis digitalis eine sehr hohe Diversität der vorhandenen *Treponema* spp. (CHOI et al., 1997; MOTER et al., 1998). Insgesamt konnten in dieser Arbeit mittels DNA-DNA Dot blot-Hybridisierungen die 3 verschiedenen Phylotypgruppen TRE I, TRE II, TRE IV sowie die Phylotypen DDKL-4 und DDKL-12 nachgewiesen werden und kulturell, wie bereits erwähnt, mehrere *Treponema socranskii* zugehörige Isolate. Dieses zeigt deutlich den Grad der hier vorliegenden Diversität. Untermauert wird dies vor allem durch den Umstand, dass eine Vielzahl der untersuchten 58 Proben diese Diversität aufwies. So konnte die Phylotypgruppe TRE I in 81 % der Proben, die Phylotypgruppe TRE II in 77 %, die Phylotypgruppe TRE IV in 79 %, die Phylotypen DDKL-4 und DDKL-12 in 96 % bzw. in 91 % der untersuchten Bioplatproben nachgewiesen werden.

Obwohl in früheren Untersuchungen von CHOI et al. (1997) zur Diversität beteiligter Treponem bei der Dermatitis digitalis die Phylotypen DDKL-3 und DDKL-20 beschrieben wurden, konnten diese in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Dot blot-Hybridisierung nicht nachgewiesen werden. Es wäre möglich, dass der erstmalige Nachweis dieser beiden Phylotypen darauf zurückzuführen ist, dass mit der Generierung einer Genbank einfach eine andere Technik verwendet wurde, die das Vorkommen anderer Phylotypen bevorzugt. Bei einem ausreichenden Umfang der zu untersuchenden Klone gelingt der Nachweis eines, in geringerem Umfang vorliegenden Phylotypen daher eher als durch Verwendung einer spezifischen DNA-Sonde aus einem großen Pool verschiedenster Sequenzen. Eine weitere nahe liegende Erklärung wäre natürlich die, dass diese Phylotypen in den untersuchten Proben nicht vorkamen und somit auch nicht nachzuweisen waren. Wir tendieren jedoch eher zu der Annahme, dass die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen eher auf technische als auf epidemiologische Umstände zurückzuführen sind.

Die vorliegenden Ergebnisse decken sich jedoch zum Teil mit denen von SCHRANK (2000) bezüglich des Nachweises von DD-Phylotypen. Mittels DNA-DNA Dot blot-Hybridisierungen an einer 16S rDNA-Genbank aus DD-Bioplasten konnten ebenso wie in jener Arbeit die Phylotypen DDKL-4 sowie DDKL 12 nachgewiesen werden, während in beiden Untersuchungen der Nachweis der Phylotypen DDKL-3, DDKL-20 als auch der speziesspezifische Nachweis von *Treponema brennaborensis* negativ verlief. Unter Verwendung der genannten phylotypgruppenspezifischen Oligonukleotidsonden konnte aber in dieser Arbeit neben den

Phylotypgruppen TRE II und TRE IV zusätzlich der Phylotyp TRE I in einer Vielzahl der Proben nachgewiesen werden. Ein wichtiger Grund für den unterschiedlichen Nachweis der Phylotypgruppe TRE I ist möglicherweise der, dass in den Untersuchungen von SCHRANK (2000) nur insgesamt 3 Klauenbiopate mittels einer 16S rDNA-Genbank und anschließender DNA-DNA Dot blot-Hybridisierung untersucht wurden, während in der vorliegenden Untersuchung mit 58 Biopaten eine größere Probenanzahl Gegenstand der Untersuchung war. So ist vorstellbar, dass der Phylotyp TRE I nicht in diesen wenigen Proben vorkam und somit auch nicht detektiert werden konnte.

Nicht nur das Vorkommen dieser *Treponema*-Gruppen in absoluten Zahlen, sondern insbesondere der Umstand, dass sehr häufig sogar 5 verschiedene Phylotyp- bzw. Phylotypgruppensonden nebeneinander in derselben Probe positive Hybridisierungssignale ergaben, unterstreicht die Tatsache, dass die Dermatitis digitalis ein günstiges Umfeld für die Diversität verschiedenster *Treponema* spp. darstellt. So waren in einem Teil der untersuchten Biopate mindestens 5 verschiedene *Treponema* spp. in ein und derselben Probe vorhanden. Im Gegensatz hierzu konnten in anderen Untersuchungen lediglich *Treponema* spp. mit Verwandtschaft zu *Treponema vincentii*, *Treponema denticola* oder *Treponema phagedenis* nachgewiesen werden (RIJPKEMA et al., 1997; DEMIRKAN et al., 1998). Bedenkt man weiterhin, dass verschiedene *Treponema* spp. im Pansen vorkommen, so stellt allein das Rind ein bedeutendes Reservoir an zahlreichen *Treponema*-Phylotypen dar (STANTON und CANALE-PAROLA, 1980; PASTER und CANALE-PAROLA, 1985). Diese Tatsache wird auch durch die Fluoreszenz *In situ*-Hybridisierung (FISH) unterlegt. So konnten hiermit die Phylotypen TRE I, TRE IV und DDKL-4 innerhalb des pathologisch veränderten Gewebes dargestellt werden.

Die Ergebnisse der FISH zeigen deutlich, dass eine starke Beteiligung von Treponemen bei der Dermatitis digitalis vorliegt und bekräftigen bereits durchgeführte Untersuchungen von MOTER et al. (1998), in welchen ebenfalls unter Einsatz der Oligonukleotidsonden TRE I, II, IV sowie DDK4 mittels FISH verschiedene *Treponema*-Phylotypen in Dermatitis digitalis-Proben nachgewiesen werden konnten. Als ebenfalls sehr wichtiges Ergebnis werten wir die Tatsache, dass Treponemen nicht nur oberflächlich innerhalb der Epidermis vorkommen, sondern auch in tieferen Epidermisschichten, was die Hypothese einer ursächlichen Beteiligung von Treponemen am Krankheitsprozess der Dermatitis digitalis unterstützt. Wegen der diffizilen Anzuchtbedingungen für Treponemem sowie der Tatsache, dass die DD eine chronische anaerobe Mischinfektion darstellt, erscheint ein Beleg dieser Hypothese im Sinne der Erfüllung der Koch'schen Postulate jedoch als aussichtslos, weshalb die weitere Charak-

terisierung der Läsionen unter Anwendung der Histologie und der FISH als das zielstrebigste Verfahren angesehen wird.

Mit Hilfe der DNA-DNA Dot blot-Hybridisierung gelang unter Verwendung des Primerpaares TPU1/RTU3 kein Nachweis der Phylotypen TRE I und TRE II in den Bioptaten, während dies jedoch unter Verwendung des Primerpaares SPU1/RTU3 erfolgreich gelang. Bei phylogenetischen Analysen komplexer mikrobieller Habitate stellt sich das generelle Problem, die gesamte mikrobielle Vielfalt komplett zu erfassen. Es sind vielfältige Gründe hierfür bekannt, und es sind in erster Linie technische. Jeder einzelne experimentelle Schritt in der Untersuchungskette kann zu einem verzerrten Ergebnis in der Gesamtbetrachtung beitragen. Hierbei ist insbesondere der so genannte „PCR-Bias“ zu berücksichtigen.

Einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Ermittlung mikrobieller Diversitäten haben die verwendeten Oligonukleotidprimer. Die Zielgene bei der Untersuchung komplexer Mikrobiota sind die verschiedensten rRNA-Operone. Um diese gleichmäßig zu erfassen, müssten im Idealfall mehrere Bedingungen erfüllt sein. Jedes der vorhandenen rRNA-Gene sollte untereinander hinsichtlich der Ausbildung eines Primer-Template-Hybrids die gleichen Voraussetzungen erfüllen. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass universelle Primer nicht wirklich alle Spezies hinsichtlich einer homologen Sequenz abdecken, denn diese Primer sind anhand unvollständiger Datenbanken kultivierbarer Vertreter theoretisch konstruiert worden, ohne die wahre Diversität ausreichend systematisch untersucht zu haben (MARCHESI et al., 1998).

Auch spielt der G/C-Gehalt der vorliegenden Template-DNA eine wichtige Rolle. Hoher G/C-Gehalt bedingt eine geringere Dissoziation der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge als niedriger G/C-Gehalt, so dass ein Primer-Template-Hybrid unter Umständen nicht bei jedem vorliegendem Template mit der gleichen Effizienz ausgebildet wird (SUZUKI und GIOVANNONI, 1996. So konnten bereits REYSENBACH et al. (1992) zeigen, dass die rRNA-Gene zweier hyperthermophiler Archaeobakterien in geringerem Ausmaß amplifiziert wurden als die rRNA-Gene von *Saccharomyces cerevisiae*, obwohl für diesen Versuchsansatz konservierte Primer benutzt wurden. Durch verbesserte Denaturierungs- und Annealingsbedingungen nach Zugabe von Acetamid zu den PCR-Ansätzen fand dagegen eine gleichmäßige Amplifikation der 16S rRNA-Gene statt.

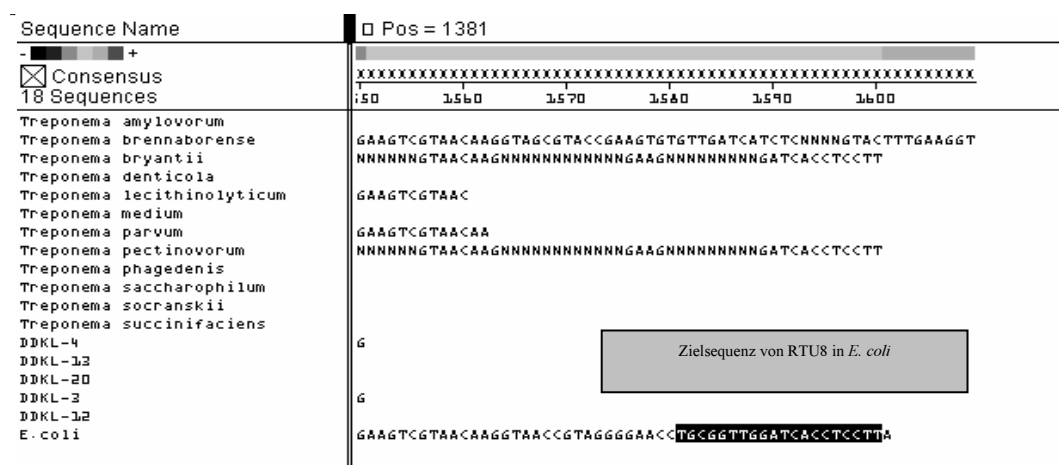
Ein weiteres Kriterium ist die Voraussetzung einer gleichen Extensionseffizienz der DNA-Polymerase für alle der vorliegenden Templates. Gerade bei der Verwendung unterschiedlicher Primerpaare kann es daher auch zu einer unterschiedlichen Effizienz bei der Amplifikation kommen. Die Verwendung von Primerpaaren, welche zur Amplifikation

längerer DNA-Fragmente führt, ist unter Umständen weniger effizient als die Verwendung von Primern, die eine Amplifikation kürzerer Fragmente bedingen, da die Polymerase längere DNA-Fragmente weniger effizient amplifiziert (SUZUKI und GIOVANNONI, 1996). Vor diesem Hintergrund lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse mit den Primerpaaren SPU1/RTU3 sowie TPU1/RTU8 zum Teil erklären.

Wahrscheinlich sind für diese unterschiedlichen Ergebnisse mehrere Gründe verantwortlich. Möglicherweise wurden 16S rRNA-Gene dieser beiden Gruppen unter Verwendung des Primerpaares TPU1/RTU8 nicht ausreichend für eine anschließende erfolgreiche Dot blot-Detektion amplifiziert wie unter Verwendung des Primerpaares TPU1/RTU3, welches nur ein ca. 550 bp langes Fragment generiert. Dies kann unter anderem an dem Umstand liegen, dass die verwendete Taq-Polymerase, wie oben aufgeführt, unter Umständen nicht für alle Phylotypgruppen die gleiche Amplifikationseffizienz besitzt, und so bestimmte Spezies im Vergleich mit anderen Spezies bevorzugt vervielfältigt werden. Da aber sowohl *Treponema medium* als Vertreter der Phylotypgruppe TRE I als auch *Treponema denticola* als Vertreter der Phylotypgruppe TRE II einen ausgeglichenen GC-Gehalt von ca. 51 % aufweisen, ist es eher unwahrscheinlich, dass im Hinblick auf andere *Treponema*-Gruppen ein unterschiedliches Denaturierungs- und Annealingsverhalten zu einer verringerten Amplifikation geführt haben. Auch ist es nicht möglich diese mögliche Fehlerquelle zu überprüfen, da von vielen Vertretern der Gattung *Treponema* nicht die komplette Sequenz der 16S rDNA vorliegt.

Wie in Abb.16 zu erkennen ist, liegt die Bindungsstelle des Primers RTU8 im rRNA-Operon von *Escherichia coli* bei Position 1521.

Abbildung 16: Abgleich ribosomaler Sequenzen verschiedener *Treponema*-Spezies, Position von RTU8.



Die rDNA-Sequenzen der meisten in Datenbanken verfügbaren *Treponema* spp. enden vor dieser Position, so dass nicht überprüft werden kann, ob die Primersequenz optimal mit der

Speziessequenz übereinstimmt. Obwohl Polymerase-Ketten-Reaktionen bei Vertretern dieser beiden Phylotypgruppen trotz möglicherweise suboptimaler Sequenzübereinstimmung erfolgreich mit diesem Primerpaar verlaufen, wenn DNA aus Reinkulturen eingesetzt wird, ist es trotzdem vorstellbar, dass diese Vertreter in Anwesenheit anderer Spezies in geringerem Masse amplifiziert werden.

Eine weitere mögliche und durchaus plausible Erklärung für die unterschiedlichen Hybridisierungsergebnisse ist die Tatsache, dass es sich beim Primerpaar TPU1/RTU8 um universelle Primer handelt. Es werden nach derzeitiger Ansicht neben den ebenfalls vorkommenden *Treponema spp.* alle weiteren Bakterien mitamplifiziert, die im Gewebe vorkommen. Da es sich bei der Dermatitis digitalis nicht um eine Monoinfektion verschiedener *Treponema*-Spezies handelt, sondern um eine Mischinfektion mit weiteren anaeroben Keimen, wird die 16S rDNA dieser Anaerobier ebenfalls mit vervielfältigt und steht daher in einer Polymerase-Kettenreaktion konkurrierend zu *Treponema*-Sequenzen.

Das Primerpaar SPU1/RTU3 umfasst mit RTU3 einen universellen Primer, während SPU1 einen annähernd spirochätenspezifischen Primer darstellt. Mit dieser Primerkombination werden demnach bevorzugt Spirochaeten, in diesem Fall also Treponemen amplifiziert, während andere Keime bei der Vervielfältigung der 16S rDNA unberücksichtigt bleiben. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass mit Hilfe dieser Vorselektion nun auch treponemale Sequenzen mitamplifiziert werden, die bei dem Primerpaar TPU1/RTU8 in ihrer Vervielfältigung benachteiligt waren und daher in unzureichender Menge für eine erfolgreiche Dot blot-Hybridisierung vorlagen.

Einen weiteren, sicherlich sehr großen Einfluss hat der Umstand, dass hier statt RTU8 der Primer RTU3 verwendet wurde, der in *Escherichia coli* ca. bei Position 520 hybridisiert, also in einer anderen konservierten Region der 16S rRNA als RTU8. So konnte bereits SCHMALENBERGER et al. (2001) den unterschiedlichen Einfluss von Primern auf das genetische Profil mikrobieller Habitate darlegen. Es konnte gezeigt werden, dass Primer, welche an konservierten Regionen binden, zumindest auf Domain-Ebene nie zu 100 % als universell zu betrachten sind. Somit ist es sicherlich auch vorstellbar, dass es unter Verwendung anderer universeller bakterieller Primer, welche optimal an treponemale Sequenzen binden, zu ähnlichen Ergebnissen wie unter Verwendung von SPU1/RTU3 kommen kann.

Auch bei der Generierung von Genbanken aus humanem Periodontitis-Probenmaterial, in denen 2 verschiedene universelle 16S rDNA-Primer verwendet wurden, variierten die

Ergebnisse stark. So konnte unter Verwendung des Primerpaares 51f/1525r eine wesentliche höhere Diversität aufgezeigt werden als mit dem Primerpaar 27f/519r (HUTTER et al., 2003). Bezüglich der DNA-Aufarbeitung aus Kot stellen wiederum PCR-Inhibitoren häufig ein Problem dar. Vielfach ist es nicht möglich, diese Inhibitoren durch die Aufarbeitung aus dem Untersuchungsmaterial ausreichend zu entfernen. Bei PCR-Inhibitoren handelt es sich um verschiedenste Substanzen, von denen etliche noch unbekannt sind (LOU et al., 1997). Bekannte Substanzen sind zum Beispiel Hämin und dessen Abbauprodukte wie Bilirubin. Weiterhin stellen zum Beispiel komplexe pflanzliche Polysaccharide als auch Huminsäuren ein Problem dar (MONTEIRO et al., 1997; MONTEIRO et al., 2001). Ungenügend aufgereinigte DNA führt dann bei der anschließenden PCR zu falsch-negativen Ergebnissen, obwohl in der Reaktion selbst ausreichend DNA-Template vorliegt (SATAKE et al., 1997). Ähnliche Verhältnisse liegen bei der Aufarbeitung von Pansensaft vor. Auch bei diesem kritischen Untersuchungsmaterial liegen proteinähnliche oder polyphenolische PCR-Inhibitoren vor, die zur Einschränkung nachfolgender Polymerase-Ketten-Reaktionen führen können (REILLY und ATTWOOD, 1998). Daher wurde zunächst versucht, eine geeignete DNA-Aufarbeitung für Pansensaft und Kot auszutesten. Neben den kommerziell erhältlichen Aufarbeitungskits wurden mit einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung sowie mit einer CTAB-Aufreinigung zwei herkömmliche Methoden ausgetestet. Die CTAB-Aufreinigung wurde deshalb miteinbezogen, weil CTAB besonders geeignet ist, pflanzliche Polysaccharide zu binden und somit zu entfernen. In die engere Auswahl kamen letztendlich der Aufarbeitungskit NucleoSpin Tissue Kit (Macherey&Nagel) sowie der Aufarbeitungskit Invisorb Spin Stool DNA Kit (Invitex GmbH), von denen im Anschluss die Nachweisgrenzen für die beispielhaft ausgesuchten Oligonukleotidsonden TRE I, TRE II, TRE IV und TSOC bestimmt wurden.

Bedenken muss man, dass diese Nachweisempfindlichkeiten nur an 4 Oligonukleotidsonden ausgetestet wurden, um einen beispielhaften Überblick über die Nachweisgrenzen zu erhalten, in denen sich das Testverfahren bewegt. Auffällig war hierbei, dass nicht alle Sonden gleiche Ergebnisse zeigten. Die unterschiedlichen Nachweisempfindlichkeiten zwischen den Sonden spiegeln sicherlich auch die tatsächlichen Gegebenheiten bei der Anwendung verschiedener 16S rDNA-Oligonukleotidsonden wieder. Mögliche Gründe hierfür könnten sein, dass unterschiedliche Waschttemperaturen und verschiedene Waschpuffer verwendet werden, die auf die jeweilige Sonde abgestimmt sind. Daher ist auch die Stringenz der jeweiligen Sonden zueinander in der jeweiligen Hybridisierungsreaktion selbst unterschiedlich, was wiederum einen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit hat. So konnte bereits ZHENG et al. (1996)

belegen, dass in Abhängigkeit unterschiedlicher Stringenzen in Post-Hybridisierungs-Waschschritten unterschiedliche Intensitäten in Dot blot-Hybridisierungen mit universellen Sonden auftraten.

Andererseits fällt auf, dass sehr hohe Ausgangskeimzahlen in Pansensaft und Kot benötigt werden, um ein positives Signal in anschließenden Hybridisierungen zu erhalten. Ähnlich hohe Keimzahlen werden auch von anderen Untersuchern berichtet. So lag die Nachweisgrenze für verschiedene *Brachyspira*-Spezies in Schweinekot in einer Untersuchung von LESER et al. (1997) bei mindestens 5×10^5 Keime pro Gramm Kot. Um beispielsweise *Butyrivibrio fibrisolvens*-Isolate mittels Hybridisierung radioaktiv markierten Oligonukleotidsonden gegen RNA-Extrakte aus Pansensaft nachzuweisen, waren in Untersuchungen von FORSTER et al. (1997) beim Einsatz von 1.000 ng RNA-Extrakt Zellzahlen von mindestens 10^4 Zellen / ml notwendig. Interessanterweise erhöhte sich die Mindestanzahl auf 10^6 Zellen / ml, wenn statt 1.000 ng RNA-Extrakt nur noch 100 ng eingesetzt wurde. Zurückgeführt wird diese hohe Mindestkeimzahl darauf, dass nach der DNA-Extraktion immer noch Inhibitoren vorhanden sind, wodurch die Polymerase-Kettenreaktion beeinträchtigt wird. So lag die Mindestkeimzahl für einen positiven PCR-Nachweis verschiedener Enterokokkenspezies aus Reinkulturen in Untersuchungen von SCHWIERTZ et al. (2000) bei 10^2 - 10^3 Zellen / ml, während sich im Gegensatz dazu die Mindestkeimzahl für einen Nachweis aus Feces auf 10^5 - 10^7 Zellen / g Trockengewicht erhöhte. Diese Daten machen deutlich, dass die Anwendung PCR-basierter Nachweismethoden bei problematischem Probenmaterial wie Kot und Pansensaft kritisch zu betrachten ist, und bei der Interpretation von Ergebnissen diese Limitierungen mitberücksichtigt werden müssen. Sicher ist, dass diese hohen Nachweisgrenzen unbefriedigend sind und eine vorherige Anreicherung der detektierten Bakterienspezies durch Kultivierungsverfahren wünschenswert ist.

In Bezug auf die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass die eventuell im Kot oder Pansen vorhandenen Treponemen in einer unzureichenden Anzahl vorkommen, um sie mit dem verwendeten Detektionssystem nachzuweisen. Aus den genannten Gründen ist es nicht möglich, den in der vorliegenden Arbeit fehlenden Nachweis von *Treponema*-Spezies so zu deuten, das tatsächlich bestimmte *Treponema*-Gruppen, die bei der DD mit involviert sind, im Magen-Darm-Trakt der betroffenen Rinder nicht vorkommen und das Rind somit nicht der eigene Träger dieser pathogenen Erreger ist. Leider kann diese Frage nicht beantwortet werden.

Da jedoch im Pansen von Rindern bereits die beiden apathogenen Spezies *Treponema bryantii* und *Treponema saccharophilum* beschrieben sind, ist es durchaus vorstellbar, dass

neben diesen beiden Vertretern auch weitere, bei der DD mitbeteiligte Treponemen im Gastrointestinaltrakt des Rindes vorkommen. Diese positiven Nachweise waren ja auch Anlaß der vorliegenden Untersuchung. Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass unter Verwendung universeller bakterieller Primer 16S rDNA-Genbanken aus Pansensaftmaterial etabliert worden sind, die allenfalls Sequenzen aufweisen, die zu jenen von *Treponema bryantii* ähnlich sind, während zum Beispiel *Treponema bryantii* selbst mittels dieser Genbanken nicht nachgewiesen werden konnte (WHITFORD et al., 1998; TAJIMA et al., 1999). Dies könnte darauf hinweisen, dass eventuell beteiligte Treponemen nur in geringer Zahl vorhanden sind. Um also abschließend zu klären, ob der Gastrointestinaltrakt ein Habitat für mitbeteiligte Treponemen darstellt, wäre es in weitergehenden Untersuchungen vorteilhafter, Detektionssysteme mit einer höheren Nachweisempfindlichkeit zu verwenden. So könnte die Detektionsgrenze eventuell auch durch eine Kombination mit anderen Methoden herabgesetzt werden, wie z.B. der nested PCR.

Da das Reservoir der Treponemen in der vorliegenden Arbeit somit nicht geklärt werden konnte, kann der Infektionsweg weiterhin nur hypothetisch behandelt werden. Ein anderer möglicher Infektionsweg wäre der von Tier zu Tier. Die Dermatitis digitalis tritt in der Regel endemisch in Tierherden auf, und möglicherweise kommen *Treponema* spp. als Kommensalen in der Umgebung der Tiere oder auf der Haut selbst vor, bis bestimmte Umweltbedingungen, wie zum Beispiel eine mechanische Primärläsion, die Vermehrung von Treponemen begünstigt und somit einer Infektion Vorschub leisten (EDWARDS et al., 2003). In diesem Zusammenhang wäre es aber auch möglich, dass ein sehr feuchtes Milieu die Barrierefunktion der Epidermis so einschränkt, dass bakterielle Erreger in die Epidermis invadieren könnten. Um diesen möglichen Infektionsweg abzuklären, könnten Hautbiopate von bereits erkrankten Tieren als auch von noch gesunden Tieren aus dem gleichem Bestand entnommen werden, um beide Gruppen auf das Vorkommen von Treponemen zu untersuchen. Das Vorkommen von Treponemen im Maulbereich stellt eine weitere Möglichkeit dar.

Obwohl der eigentliche Infektionsweg beteiligter *Treponema* spp. also weiterhin ungeklärt bleibt, bestärken die vorliegenden Ergebnisse eine Mitbeteiligung von Treponemen im Infektionsgeschehen der Dermatitis digitalis. Da von einigen *Treponema* spp. bereits etliche Virulenzfaktoren beschrieben sind, ist es durchaus vorstellbar, dass sie als primäres Agens bei der Dermatitis digitalis mit in Frage kommen. Der nach unserem Wissen diesbezüglich am besten untersuchte Vertreter ist *Treponema denticola*, dessen Virulenzfaktoren stellvertretend für andere Treponemen stehen (FENNO und MCBRIDE, 1998). Als auffälligste mögliche

virulenzassoziierte Eigenschaft fällt die allen Spirochaeten eigene Motilität auf, welche durch die periplasmatischen Flagellen vermittelt wird (CHAN und MCLAUGHLIN, 2000). So konnte bei *T. denticola* gezeigt werden, dass die Motilität abhängig von der Viskosität des vorliegenden Milieus ist (PIETRANTONIO et al., 1988). Für eine erfolgreiche Kolonisation und Auslösung einer Infektion ist neben der vorhandenen Motilität auch die Fähigkeit zur Adhärenz an entsprechenden Zellen notwendig. Neben der Fähigkeit zur Adhärenz an Epithel- und Endothelzellen ist *Treponema denticola*, wie auch die Arten *Treponema vincentii* und *Treponema socranskii*, ebenfalls in der Lage, Endothelzellen nach erfolgter Adhäsion zu penetrieren (KEULERS et al., 1993; PETERS et al., 1999). Adhärenz scheint über die Bindung an verschiedene Wirtsproteinen zu erfolgen. Eine Rolle hierbei spielen neben Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ I und IV, Gelatin und Fibrinogen auch Hyaluronsäuren (CHAN und MCLAUGHLIN, 2000). Bei *Treponema denticola* wird die Adhärenz über verschiedene Proteine vermittelt. Von Bedeutung hierbei sind das "major surface protein" (Msp), der "chymotrypsin-like protease complex" (CTLP) sowie ein 72 kDa großes membranassoziiertes Protein Rolle (FENNO und MCBRIDE, 1998).

Ebenfalls von Bedeutung sind cytopathische Effekte. Die reine Adhärenz an Wirtszellen alleine verursacht nach derzeitiger Ansicht per se keine Schädigung. Um einen Keim als potentiell virulent zu charakterisieren, ist es generell erforderlich, dass dieser zusätzlich über bestimmte Virulenzfaktoren cytopathische Effekte verursacht. So ist bei *Treponema denticola* sowohl die Fähigkeit zur Hämagglutination als auch zur Hämolyse beschrieben. An diesem Vorgang sind mehrere Proteine beteiligt, die teils Bestandteile der Bakterienzelloberfläche sind oder auch in die Umgebung sezerniert werden und zur Lyse von Erythrozyten führen (EDWARDS et al., 2003). Daneben ist zusätzlich die Fähigkeit zur Hämoxidation bekannt, welche über Cystalysin vermittelt wird, ein Zelloberflächenenzym, das ebenfalls eine Hämolyse vermittelt und somit zur Eisenversorgung mit beiträgt (CHU et al., 1999).

Weiterhin sind zwei zentrale multifunktionale Virulenzfaktoren bekannt, das bereits erwähnte Msp und auch der CTLP-Komplex. Msp ist ein dominant vorkommendes Antigen auf *Treponema denticola*, dessen Vorkommen zunächst außen auf der Zellmembran vermutet wurde, tatsächlich aber ist es vorwiegend periplasmatisch lokalisiert (EGLI et al., 1993; CAIMANO et al., 1999). Neben seiner adhäsiven Eigenschaft weist es zusätzlich eine porenbildende Aktivität auf und bedingt somit in Epithelzellen cytopathische Effekte wie zum Beispiel „membrane blebbing“ (MATHERS et al., 1996; FENNO und MCBRIDE, 1998). Dieser Virulenzfaktor wurde nicht nur bei verschiedenen *Treponema denticola*-Isolaten nachgewiesen, sondern ebenfalls bei den *Treponema*-Spezies *Treponema vincentii*,

Treponema maltophilum und *Treponema pectinovorum* (FENNO et al., 1997; HEUNER et al., 1999).

Der genannte membran-assoziierte „chymotrypsin-like protease complex“ (CTLP) von *Treponema denticola* ist in der äußeren Membran lokalisiert und assoziiert mit Msp (FENNO et al., 1998). Wie Msp ist CTLP bei der Adhäsion mitbeteiligt, besitzt zudem aber weitere proteolytische Eigenschaften. So ist CTLP beim enzymatischen Abbau einer Vielzahl von Substraten wie Gelatin, Laminin, Serumbestandteilen, α_1 -Antitrypsin, Transferrin, Fibrinogen und weiterer bioaktiver Peptide beteiligt (FENNO und MCBRIDE, 1998). Nach Inkubation mit Epithelzellen verursacht CTLP ebenfalls cytopathische Effekte, die sich in Form von „membrane blebbing“ äußern (UITTO et al., 1995). In einem murinen Abszess-Modell konnte z.B. gezeigt werden, dass CTLP-Mutanten von *Treponema denticola* eine geringere Virulenz aufwiesen als der Wildtyp (ISHIHARA et al., 1998).

Auch besitzt *Treponema denticola* eine Vielzahl weiterer peptidolytischer Enzymsysteme, die zum Teil oberflächenassoziiert vorliegen. Diese Ektopeptidasen könnten ihre peptidolytische Aktivität direkt gegenüber dem Wirtsgewebe entfalten und somit zu massiven Schädigungen führen, während andere Enzyme höchstwahrscheinlich in den extrazellulären sezerniert werden. Vermutlich dienen diese Proteasen zur Generierung verschiedener Peptide, die schließlich von der Bakterienzelle aufgenommen und verstoffwechselt werden (MAKINEN und MAKINEN, 1996; EDWARDS et al., 2003).

Weiterhin sind Enzyme und Stoffwechselprodukte bekannt, die eine Gewebeschädigung mit verursachen. Bei verschiedenen Stämmen oraler Treponemen ist eine Phospholipase C (PLC) beschrieben, die über Hydrolyse der Membranlipide eine Schädigung von Gewebezellen hervorrufen kann (SIBOO et al., 1989). Bekannt ist auch, dass Treponemen kurzkettige Fettsäuren produzieren, die in Konzentrationen, welche auch in periodontalen Taschen vorkommen, Apoptose auslösen können. Neben diesen flüchtigen Fettsäuren werden verschiedene flüchtige Schwefelverbindungen wie Hydrogensulfid oder Methylmercaptan gebildet, die in entsprechenden Konzentrationen über eine Inhibierung der Cytochromoxidase zu cytotoxischen Effekten führen können (FENNO und MCBRIDE, 1998).

Neben den beschriebenen cytopathischen Effekten sind Treponemen auch in der Lage, eine Immunantwort über das sog. angeborene Immunsystem hervorzurufen. Das angeborene Immunsystem wird hierbei hauptsächlich über die Familie der TOLL-like Rezeptoren (TLR) moduliert, die hochkonserviert und bei einer Vielzahl eukaryontischer Spezies beschrieben sind (VASSELON und DETMERS, 2002). Dabei werden während einer Infektion TLR's bereits über verschiedene bakterielle Liganden aktiviert, bevor die adaptive Immunantwort

überhaupt erst effektiv reagieren kann. Typische bakterielle Erkennungsstrukturen sind dabei die Lipopolysaccharide gramnegativer Keime, Lipoproteine und Lipoteichonsäuren aus dem Peptidoglykangerüst grampositiver Keime oder Lipoproteine aus der Zellmembran bei Mycoplasmen, während Glykolipide von Mykobakterien ebenfalls einen starken immunmodulatorischen Effekt bewirken (KAISHO und AKIRA, 2002). So konnte bei *Treponema brennaborensis* gezeigt werden, dass Glykolipide unter anderem einen TLR4 und TLR2 abhängigen Effekt aufwiesen, während sich bei Glykolipiden von *Treponema maltophilum* Glykolipide nur ein TLR2 abhängiger Effekt nachweisen ließ (SCHRÖDER et al., 2000; OPITZ et al., 2001). Auch konnte ASAI et al. (2003) zeigen, dass Extrakte der äußeren Membran von *Treponema denticola*, *Treponema vincentii* und *Treponema medium* in humanen gingivalen Fibroblasten die mRNA-Expression von IL-8 induzierten, dessen Induktion über TLR2 vermittelt wurde.

Auch wenn viele dieser Virulenzmerkmale bei *Treponema denticola* untersucht wurden, ist es doch sehr wahrscheinlich, dass diese Virulenzfaktoren auch bei anderen Vertretern vorkommen. All diese Daten im Zusammenhang mit dem häufigen Vorkommen lassen es als sehr wahrscheinlich ansehen, dass Treponemen eine nicht unerhebliche pathogenetische Bedeutung beim Krankheitsgeschehen der Dermatitis digitalis einnehmen, also nicht nur saprophytäre Sekundärbesiedler sind. Aufgrund ihrer hohen Motilität sind sie in der Lage, das Gewebe zu invadieren. Eine Tatsache, die auch durch die FISH eindeutig gezeigt werden konnte (MOTER et al., 1998). Mit Hilfe ihrer Adhäsionsmechanismen wäre es den beteiligten Treponemen möglich, an den Epithelzellen anzuheften und aufgrund ihrer Virulenzfaktoren eine Schädigung der Epidermiszellen hervorzurufen, was den gesamten Krankheitsprozess in Kombination mit anderen beteiligten Keimen aufrechterhalten, verschlimmern und somit auch zu den für die Dermatitis digitalis typischen chronischen Krankheitsverlauf führen würde, ein Merkmal, welches auch charakteristisch ist für andere Krankheitsbilder, in denen Treponemen mitbeteiligt sind.

Deshalb wird angenommen, dass Treponemen eine erhebliche Mitbeteiligung bei der Dermatitis digitalis zugesprochen werden kann. Auch hinsichtlich der Diversität von Treponemen stellt die Dermatitis digitalis ein beträchtliches Reservoir dar. Um den Infektionsweg von Treponemen aufzuklären, bedarf es dagegen zusätzlicher Untersuchungen.