

3.3. Ergebnisse

3.3.1 Charakterisierung einer bislang unbekanntenen *Treponema*-Spezies

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine neue *Treponema*-Spezies isoliert werden. Bei der Charakterisierung einer neuen Spezies sind neben molekularbiologischen Daten auch phänotypische Beschreibungen notwendig. Daher wurde versucht neue Spirochätenisolate anzuzüchten. In diesem Versuch wurden alle 25 Klauenbioptate einbezogen. Nach zehntägiger Inkubation unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C war in der Probe der Nr. 18 in der Dunkelfeldmikroskopie eine größere Anzahl beweglicher, helikal gewundener Bakterien zu erkennen. Diese Probe wurde anschließend auf eine 1,7%ige OMIZ-Pat-Platte ausgestrichen. Nach 5 Tagen waren 3 Kolonien gewachsen. Diese Kolonien wurden getrennt in flüssiges OMIZ-Pat Medium überimpft. Der Vorgang wurde wiederholt, um eine Reinkultur zu erhalten. Im Anschluß wurde die Flüssigkultur mit Glycerin (15%) zur Deponierung der Kultur und für anschließende Versuche zur Charakterisierung des Isolates bei -70 °C eingefroren.

3.3.1.1 Kulturmorphologie

Das neue Isolat wurde unter der Bezeichnung DD5/3^T geführt. Die Wachstumszeit

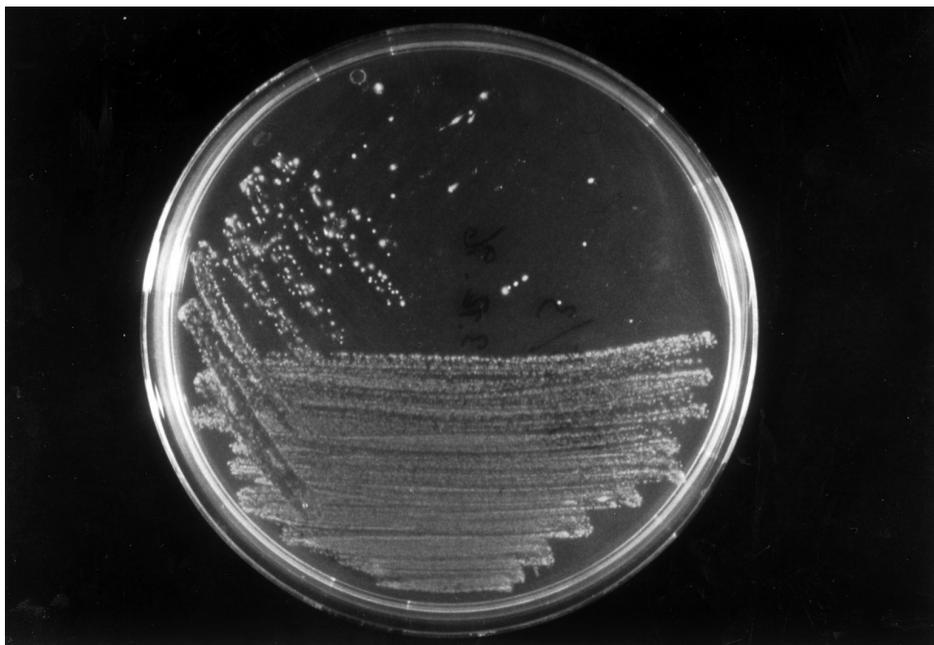


Abb. 4: Isolat DD5/3^T- Plattenausstrich nach 3-tägiger anaerober Inkubation bei 37°C.

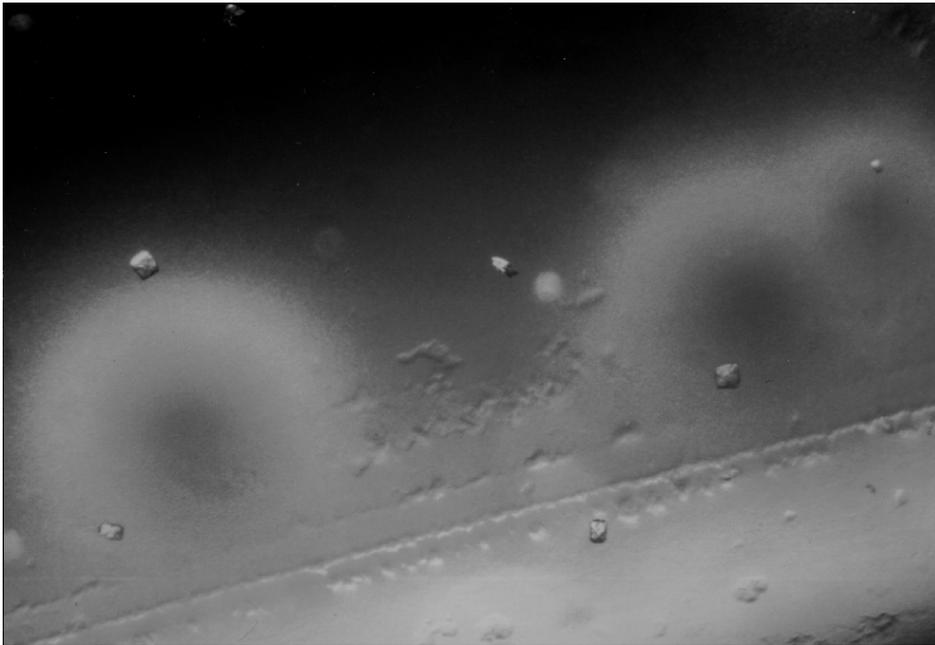


Abb. 5: Isolat DD5/3^T - einzelne Kolonien im Impfausstrich nach 3-tägiger Inkubation bei 37 °C in den Agar penetriert.

des neuen Isolates aus der Glycerinkultur betrug in flüssigem OMIZ-Pat Medium 3 Tage. Nach dem Ausstreichen der Flüssigkultur auf die OMIZ-Pat-Platte waren nach 3-5 Tagen kleine, weiße bis zu 3 mm große, diffuse Kolonien sichtbar, die komplett in den Agar penetrierten (Abb. 4 und 5).

In der Wachstumsphase waren mikroskopisch fast ausschließlich helikal gewundene Bakterien sichtbar. Eine hohe Motilität der Treponemen war in der Flüssigkultur im Dunkelfeld zu sehen. Die Zelllänge variiert mit dem Alter der Kultur. In der stationären Phase waren vermehrt Rundformen nachweisbar.

Die Zugabe von Kaninchenserum (2-10%) oder die Herabsetzung der Wachstumstemperatur auf 30 °C verminderte das Wachstum des Isolates DD5/3^T.

3.3.1.2 Licht- und Elektronenmikroskopie

Die Zellen des Isolates waren 5-8 µm lang und 0,25-0,55 µm breit. Sie besaßen einen zytoplasmatischen Zylinder mit 2 Endflagellen, die subterminal an jedem Pol beginnen (Abb. 7). Die Rundformen waren in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen als Spirochäten zu erkennen (Abb. 6, 8a, b, c, 9).

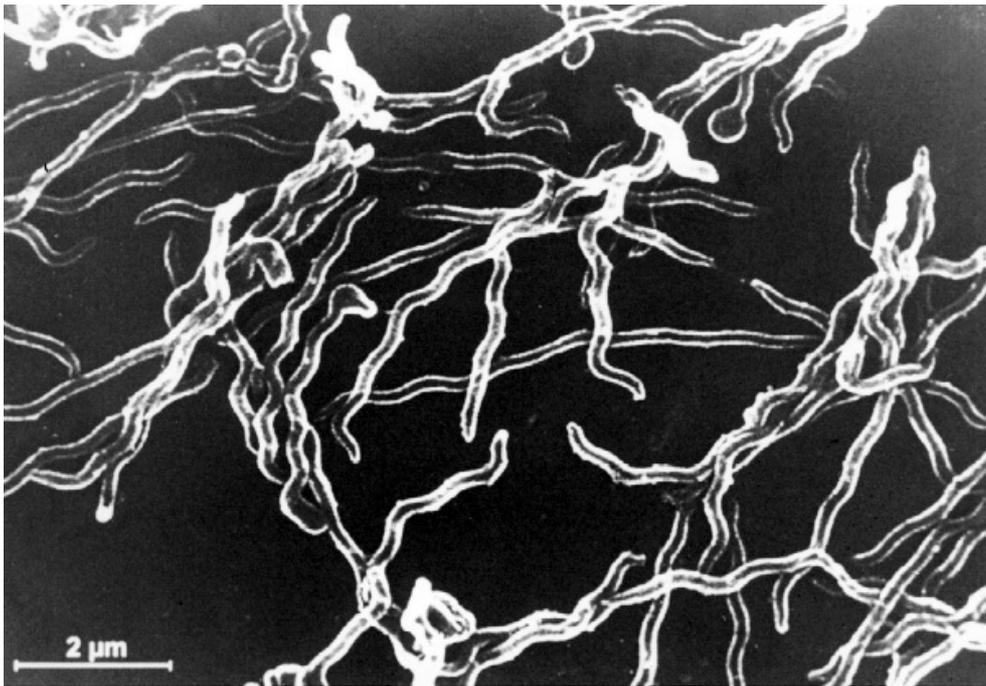


Abb. 6: Raster-Elektronenmikroskopische Abbildung einer Flüssigkultur von DD5/3^T. Darstellung verschiedener unterschiedlich stark helikal gewundener Morphotypen. Bei einigen Treponemen ist eine Schleifenbildung sichtbar, die den Beginn der Rundformenbildung darstellt.

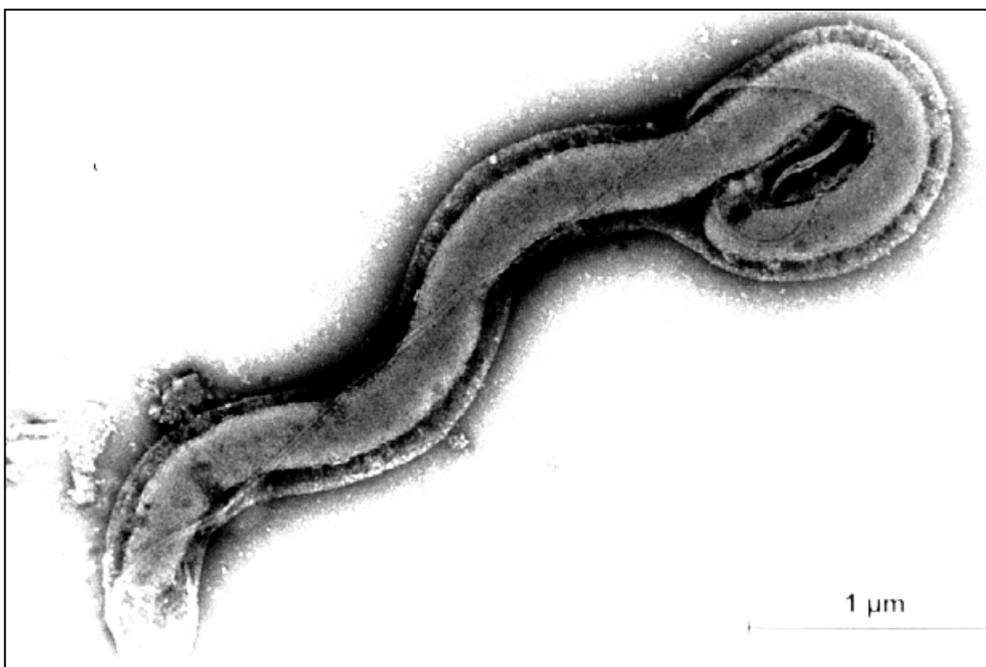


Abb. 7: Transmissions-Elektronenmikroskopie von DD5/3^T. Darstellung einer einzelnen Treponeme mit den zwei Endflagellen im periplasmatischen Raum und den Insertionsstellen am Polende.



Abb. 8a:



Abb. 8b:

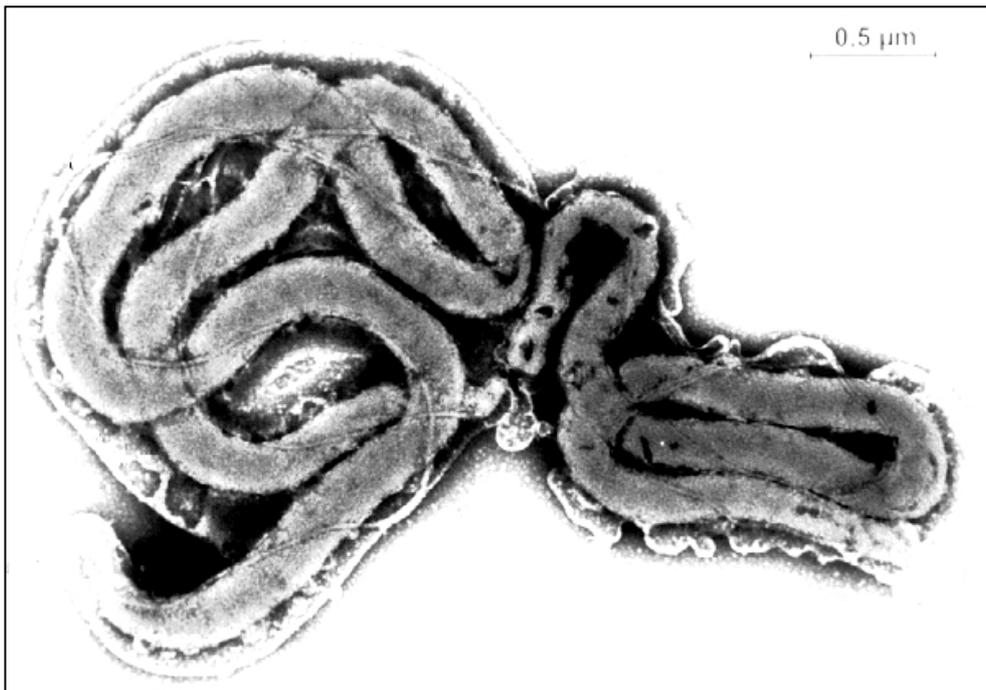


Abb. 8c:

Abb. 8a, b, c: Darstellung 3 verschiedener Stadien der Rundformenbildung von DD5/3^T unter Verwendung der Transmissions-Elektronenmikroskopie.



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.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, daß es sich bei den Rundformen um Treponemen handelte. Für einen Nachweis, ob die helikal gewundenen und die Rundformen einer Spezies angehören, wurde eine spezifische Oligonukleotidsonde (DDK5/3) entwickelt und in der *In situ*-Hybridisierung eingesetzt. Die Sondensequenz wurde mit allen veröffentlichten 16S rDNA-Sequenzen der Datenbank des Programms HUSAR abgeglichen und anschließend mit Cy3-dCTP markiert. Die markierten Oligonukleotide wurden speziell für die *In situ*-Hybridisierung spezifisch eingestellt. Die Hybridisierung erfolgte bei einer Temperatur von 46 °C für 2 Stunden bei einer Formamidkonzentration von 20%.

In der *In situ*-Hybridisierung war zu sehen, daß die Einrollungsformen, wie die helikal gewundenen Formen mit der spezifischen Sonde DDK5/3 hybridisierten (Abb. 10a,b).

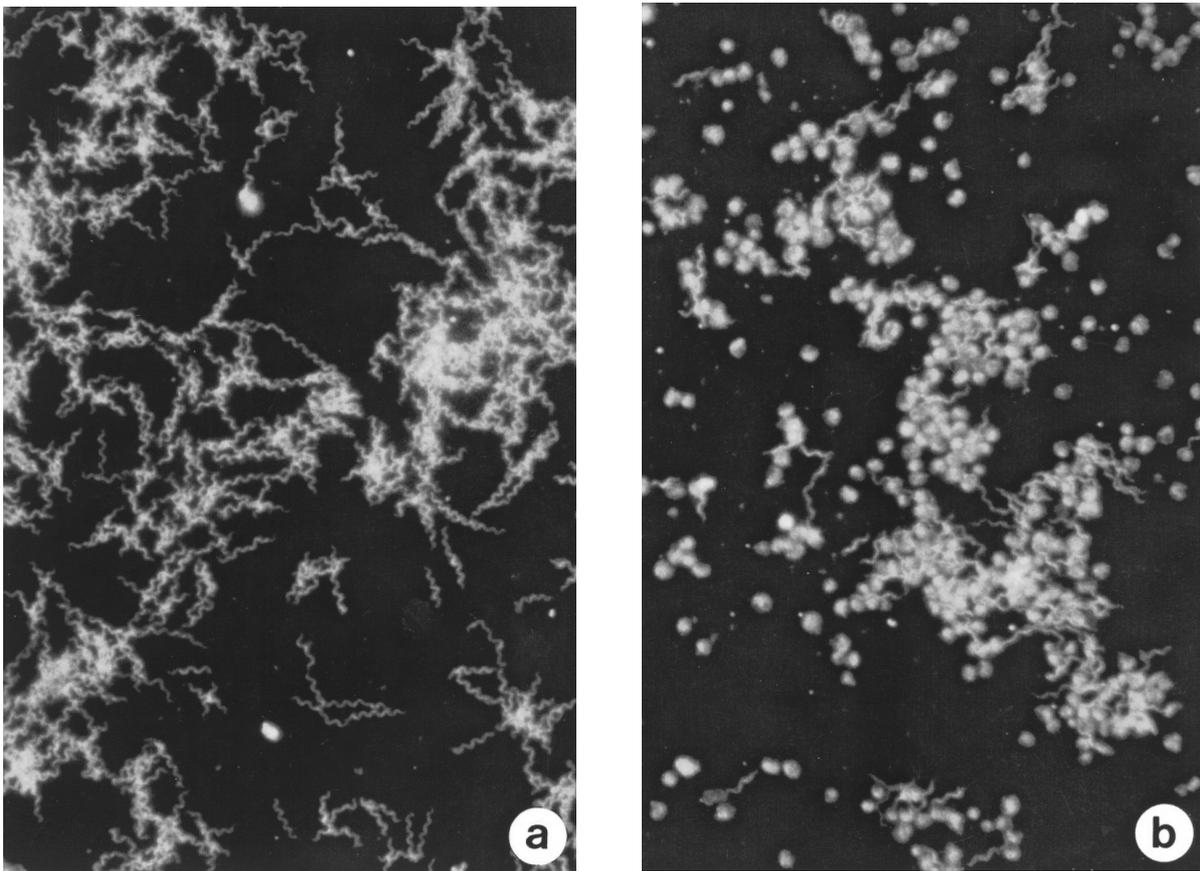


Abb. 10 a, b: FISH einer Flüssigkultur von DD5/3^T unter Verwendung der Cy3-markierten Oligonukleotidsonde DDK5/3. In der Hybridisierung waren spezifische Signale, bei den helikalen Morphotypen in der logarithmischen Phase (a) und den Einrollungsformen in der stationären Phase des Wachstums (b) zu sehen.

3.3.1.3. Biochemie und phylogenetische Einordnung

Zur Charakterisierung der neuen Spezies und zur Abgrenzung gegenüber anderen Treponemen wurde ein SDS-PAGE angefertigt und die Enzymaktivitäten bestimmt. Weiterhin wurde DD5/3^T in den phylogenetischen Baum eingeordnet .

SDS-PAGE

Der Vergleich der Proteinbandenprofile von acht Treponemenarten und dem Isolat DD5/3^T ergab deutliche Unterschiede. Für die Darstellung der Banden wurde eine Coomassie blue-Färbung vorgenommen. In der Region zwischen 31-66 kDa befinden sich bei dem neuen Isolat Banden, die sich deutlich von denen der anderen Stämme *T. denticola*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii subsp. buccale*, *T. socranskii subsp. paredis*, *T. socranskii subsp. socranskii*, *T. vincentii*, *T. maltophilum*, *T. phagedenis* Biotyp Reiter unterscheiden (Abb. 11).

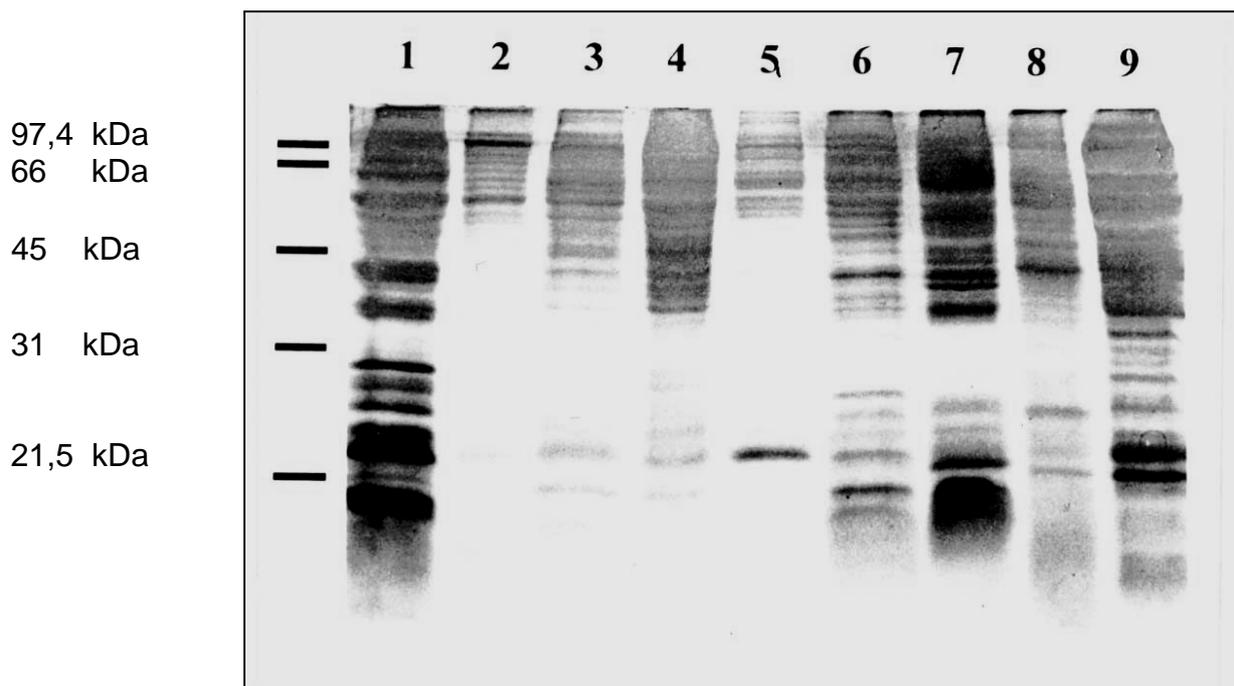


Abb. 11:

Proteinanalyse. Elektropherogramm des Gesamtproteinextraktes (12 µg, Coomassie blue, 10%) des Isolates DD5/3^T (1) und acht anderer Treponemen [*T. maltophilum* ATCC 51939^T (2), *T. socranskii subsp. socranskii* ATCC 35536^T (3), *T. socranskii subsp. paredis* ATCC 35535^T (4), *T. socranskii subsp. buccale* ATCC 35534^T (5), *T. pectinovorum* ATCC 33768^T (6), *T. denticola* CD-1 (7), *T. vincentii* LA-1 (8), , *T. phagedenis* Biotyp Reiter (9)]. An der linken Seite der Abbildung befindet sich der Molekulargrößenmarker.

Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten des neuen Stammes ergaben folgendes Bild:

Das Isolat DD5/3^T besaß keine Katalaseaktivität. Die Untersuchung mit dem rapid ID 32 A-System zeigte folgende Enzymaktivitäten: Alkalische Phosphatase, β -Galaktosidase, α -Glukosidase, N-Acetyl- β -Glukosaminidase, Argininarylamidase und die Fermentation von Raffinose und Mannose.

Weiterhin wurde das API-Zym-System eingesetzt. Dieses Minisystem wurde ausgewählt, um einen Vergleich der Enzymaktivitäten zu anderen kultivierbaren Treponemen zu haben. WYSS et al. (1996, 1997) und WALKER et al. (1995) benutzten dieses System bei der Beschreibung der Enzymaktivitäten bei den von ihnen angezüchteten Treponemen. Der Vergleich der Enzymaktivitäten mit Hilfe des API-Zym-System zu den anderen kultivierbaren Treponemen ist in Tabelle 8 dargestellt.

Phylogenetische Einordnung

Mit Hilfe der Primerkombination TPU1 und RTU8bio und TPU1bio und RTU8 wurden Strang und Gegenstrang der 16S rDNA sequenzanalysiert (1400 bp). Die Analyse der drei isolierten Kolonien ergab identische Sequenzen. Der Vergleich des Isolates mit den verfügbaren 16S rDNA-Sequenzen der Datenbank des Programms HUSAR 4,0; (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) ergab höchste Homologie zu Cluster 17 der Gruppe IV der Treponemen (CHOI et al., 1994). Das Isolat DD5/3^T unterscheidet sich somit in phäno- und genotypischen Merkmalen von allen bisher bekannten *Treponema*-Spezies und wurde unter der Bezeichnung *Treponema (T.) brennaborensis* geführt. Die Einordnung von *T. brennaborensis* in den phylogenetischen Baum der Treponemen ist in Abb. 12 zu sehen. Die größte Ähnlichkeit besitzt das neue Isolat zu *T. maltophilum* (89,7%), einer oralen kultivierbaren Treponeme der Gruppe IV.

Die Ähnlichkeit zu anderen kultivierbaren Treponemenspezies lag zwischen 83,7-89,5% (Abb. 18).

Taxon	Stämme	Literaturquelle	Enzymaktivitäten der Treponemen (API ZYM-System)																			
			Enzymaktivität																			
			Alkalische Phosphatase	C ₄ Esterase	C ₈ Esterase Lipase	C ₁₄ Lipase	Leucin-Arylamidase	Valine-Arylamidase	Cystine-Arylamidase	Trypsin	Chymotrypsin	Phosphorsäure	Naphtholphosphohydrolase	α-Galaktosidase	β-Galaktosidase	β-Gluconidase	α-Glukosidase	β-Glukosidase	N-Acetyl-β-glucosaminidase	α-Mannosidase	α-Fucosidase	
<i>T. brennaborensis</i>			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Treponemenisolate nach Walker			1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1-9185MED		1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. maltophilum</i>			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BRT		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HO2A		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PNA1		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. denticola</i>			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CD-1		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	51B2		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. pectinovorum</i>			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 33768 ^T		2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. socranscii subsp. buccale</i>			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 35534 ^T		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. socranscii subsp. paredis</i>			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 35535 ^T		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. socranscii subsp. socranskii</i>			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 35536 ^T		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. vincentii</i>			2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LA-1		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ritz A		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. amylovorum</i>			3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 8: Vergleich der Enzymaktivitäten kultivierbarer Treponemen unter Verwendung des API ZYM-System

- 1 WALKER et al., 1995
 2 WYSS et al., 1996
 3 WYSS et al., 1997

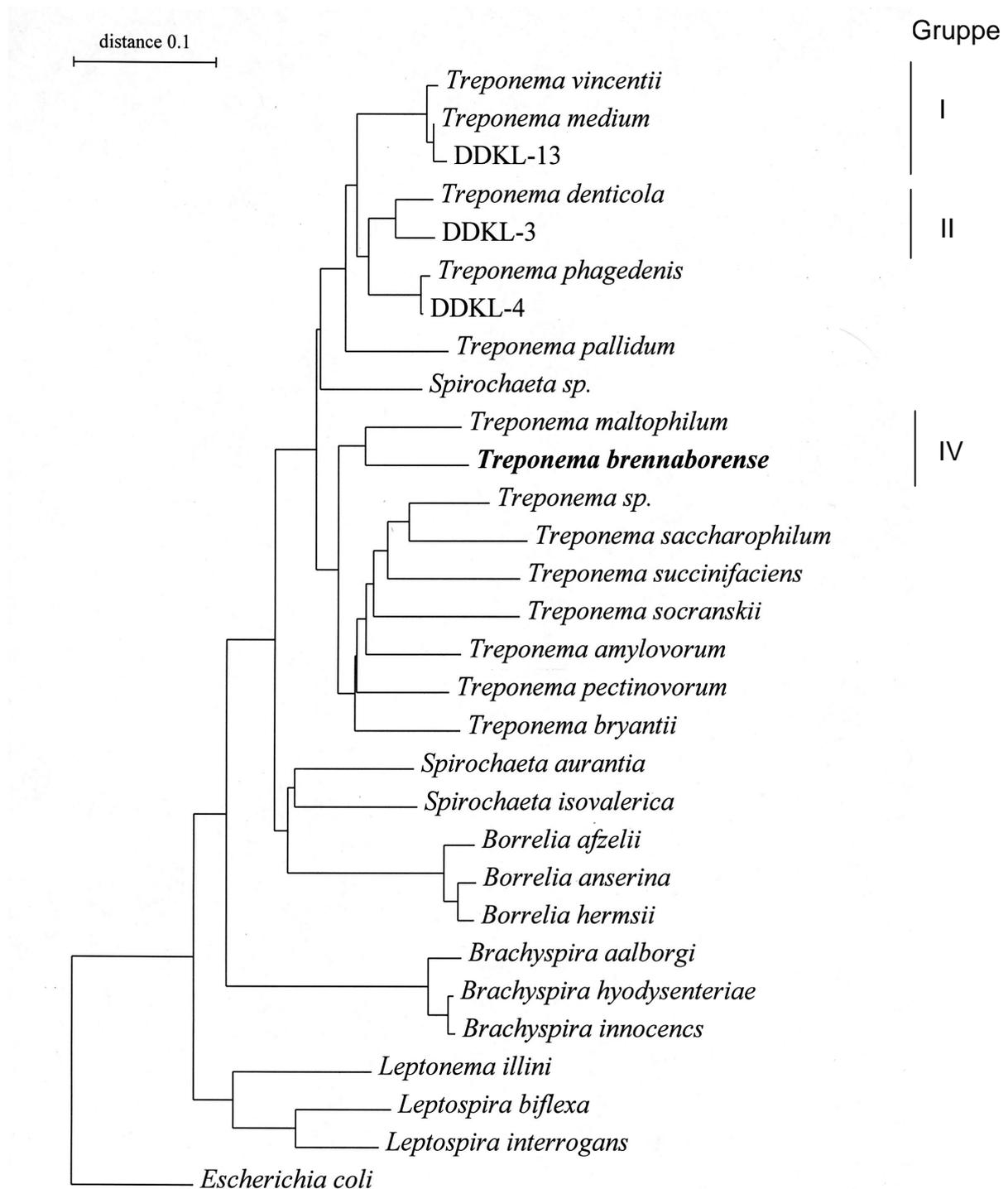


Abb. 12: Dendrogramm zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft von *T. brennaborensis* mit weiteren Spezies der Gattung *Treponema*, basierend auf den 16S rRNA-Sequenzen (16S rRNA *E. coli* Position von 67-1467). Der Algorithmus wurde nach JUKES u. CANTOR (1969) berechnet und nach der Neighbor-Joining-Methode korrigiert (SAITOU u. NEI, 1987).

3.3.2 Analyse der 16S rDNA-Genbank

Die Klauenbioptatproben (Nr. 12-14) von DD-Läsionen bildeten das Ausgangsmaterial für die Klonierung (Abb. 14). Von 133 ausgewählten Klonen enthielten 104 Klone ein Insert mit der erwarteten Länge von ca. 1500 bp (Abb. 13). Diese 104 Klone wurden in die Sequenzanalyse einbezogen. Um eine Einteilung und Einordnung der rekombinanten Klone vornehmen zu können, wurde die 16S rDNA-Genbank zunächst durch Hybridisierung mit DIG-markierten Oligonukleotiden und anschließender Sequenzierung analysiert.

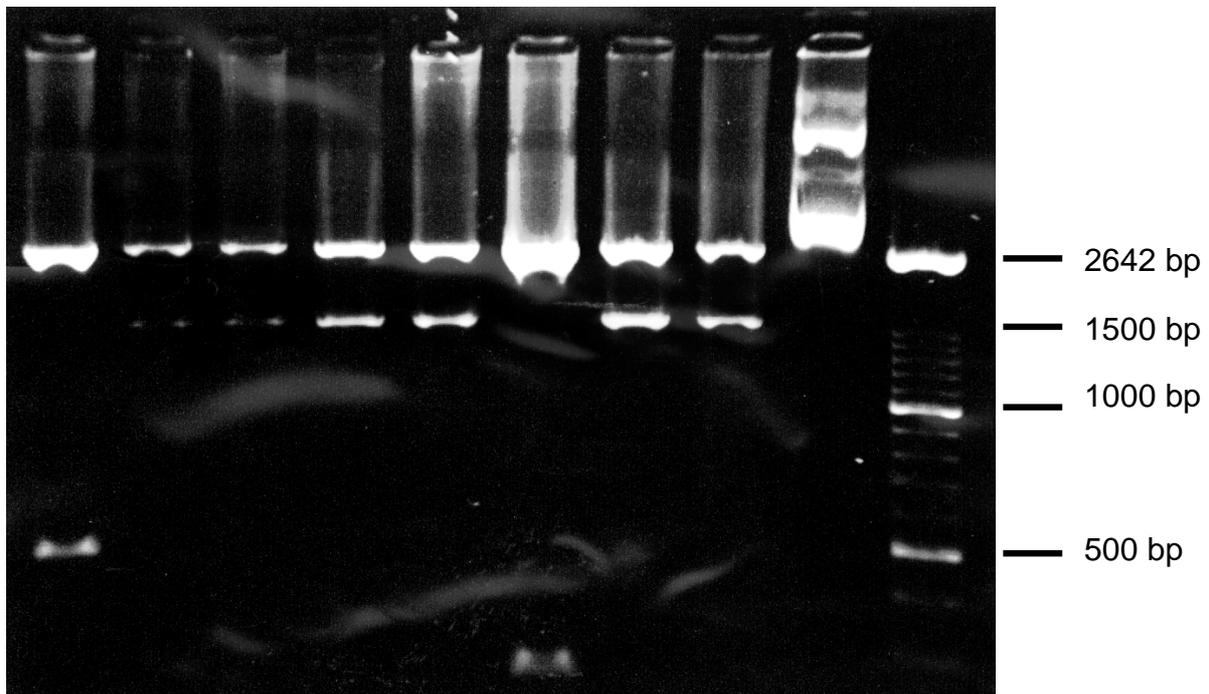


Abb. 13: Restriktionsanalyse rekombinanter Plasmide.
Elektropherogramm verdauter Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sa*II (1,2% Agarose).
Klonnummer: von links nach rechts: 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, pUC19, DNA-Größenmarker Marker XIV

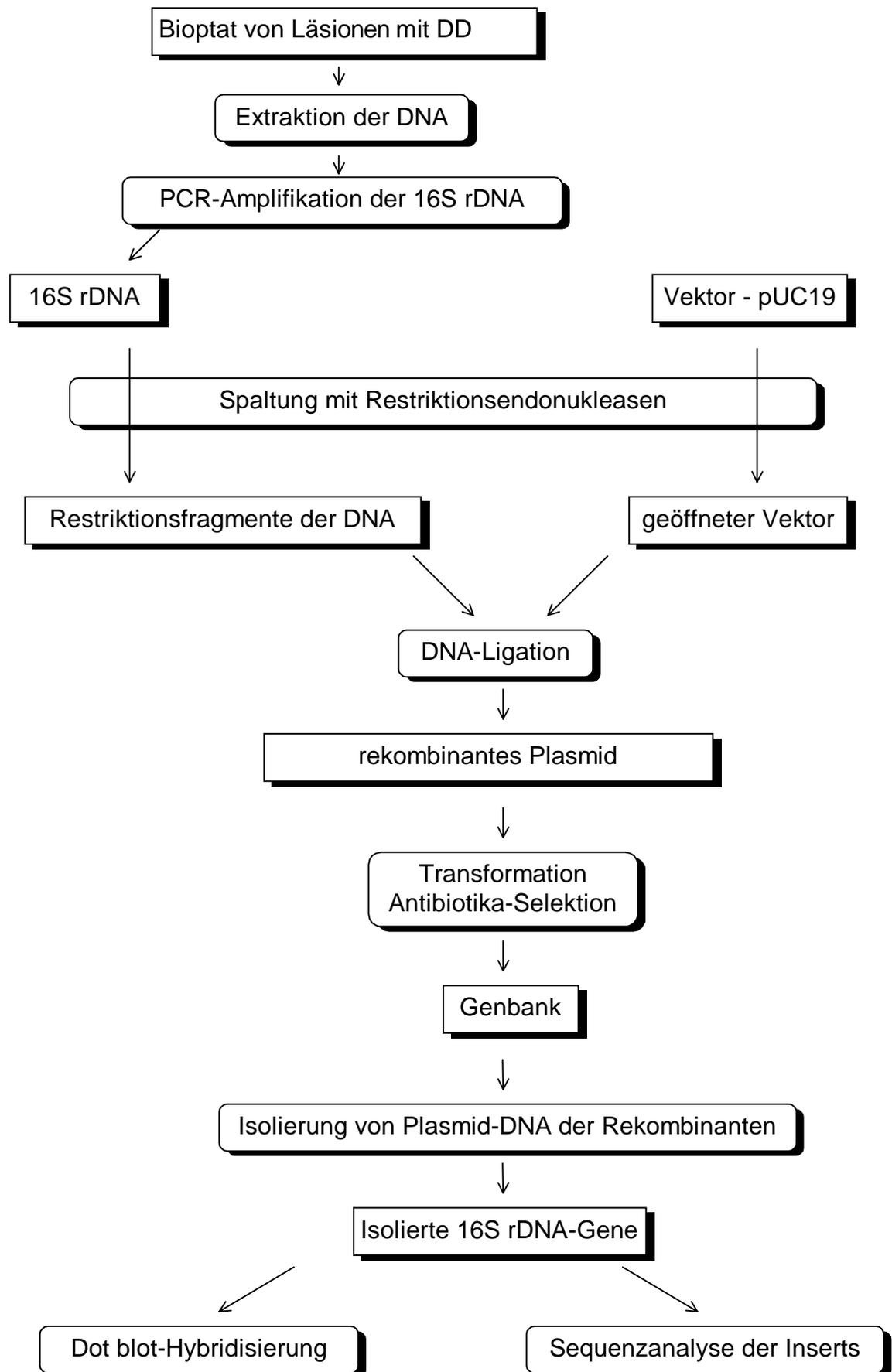


Abb. 14: Flußdiagramm

3.3.2.1 Analyse der 16S rDNA-Genbank durch Dot blot-Hybridisierung und Sequenzanalyse

Die 16S rDNA-Genbank wurde mittels Dot blot-Hybridisierung untersucht. Mit der gattungsspezifischen Oligonukleotidsonde der oralen Treponemen (TREPS) reagierten 72 von 104 Klonen. Die verbleibenden 32 Klone zeigten in der Dot blot-Hybridisierung keine (19) bzw. nur schwache (13) Signale bei Verwendung dieser Sonde.

Für eine genauere Klassifizierung schlossen sich Dot blot-Hybridisierungen mit den gruppen- bzw. speziesspezifischen Oligonukleotidsonden rekombinanter Klone der DD, der oralen Treponemen und des klinischen Isolates DD5/3^T an (Abb. 15, 16). Die Oligonukleotidsonden wurden von 16S rDNA-Sequenzen rekombinanter Klone (DDKL-2, DDKL-3, DDKL-12, DDKL-20, CHOI et al. 1997; Sequenzen der Gruppen I, II und IV, MOTER et al., 1998) bzw. von *Treponema*-Spezies abgeleitet (Tabelle 6).

Ca. 25% der untersuchten Klone hybridisierten mit den Oligonukleotidsonden DDK2 und DDK12. Von diesen besaßen 2 Klone ein schwaches und 3 andere Klone kein Signal bei der Hybridisierung mit der TREPS-Sonde.

Mit den gruppenspezifischen Sonden TREII und TREIV der oralen Treponemen reagierten 12% (TREII) und 6% (TREIV) der Klone positiv. Dagegen zeigte keiner der Klone mit den Oligonukleotidsonden DDK3, DDK20, DDK5/3 und TREI eine positive Reaktion. Alle Klone, die mit den gruppenspezifischen Sonden TREII und TREIV der oralen Treponemen reagierten, wurden sequenziert. Der Sequenzvergleich der Insert-DNA ergab, daß eine nahe Verwandtschaft zwischen diesen Klonen und den kultivierbaren, oralen Treponemen der entsprechenden Gruppen bestand. Die Sequenzübereinstimmung der 12 TREII-positiven Klone zu *T. denticola* lag zwischen 94 und 98,4%. Bei den 6 TREIV-positiven Klonen betrug die Sequenzähnlichkeit zu *T. maltophilum* 92,8- 94,8% (Tabelle 9). Die Sequenzen (n=12) die sich in die Gruppe der oralen Treponemen einordneten, wiesen vielfach untereinander eine sehr große Identität auf. Sie unterschieden sich oft nur in zwei oder drei Basen. Das gleiche Ergebnis wurde bei den TREIV-positiven Inserts (n=6) festgestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A								*		●
B										
C										
D										
E				*	*	*	*	*	*	*

A1 (Kontrollmembran)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
F				●	●		●			●		●	
G											●		
H			●	●	●	●							
I						●						●	
J							●				●		
K								●	●		●		
L	●	●	●			●					●		●
M		●							●	●	●	●	

A2 (Probenmembran)

Abb. 15: Ergebnisse der Dot blot-Hybridisierung der 16S rDNA-Genbank mit der Oligonukleotidsonde DDK12 (A1, A2). Die Membran (A1) zeigt die positive Reaktion der Kontroll-DNA der Sonde DDK12. Auf der Probenmembran (A2) sind 28 positive Reaktionen erkennbar.

* keine Proben-DNA oder Kontroll-DNA aufgetragen

Abb. 15 und 16: Auf den Kontrollmembranen A1 und B1 befanden sich folgende PCR-Kontrollen:

Die Stämme wurden freundlicherweise von R. Mutters, Marburg, Deutschland (gekennzeichnet durch RM); C. Wyss, Zürich, Schweiz (gekennzeichnet durch CW); und B. Wilske, München, Deutschland (gekennzeichnet durch BW) zur Verfügung gestellt. In den Spalten 1-8 befanden sich folgende Stämme: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* MCCM 02638 (A1) (RM), *Capnocytophaga gingivalis* MCCM 00858 (A2) (RM), *Capnocytophaga ochracea* MCCM 00238 (A3) (RM), *Eubacterium lentum* ATCC 25559^T (A4) (RM), *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586^T (A5) (RM), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (A6) (RM), und *Prevotella intermedia* MCCM 00407 (A7) (RM); die kultivierbaren Treponemenspezies *T. vincentii* ATCC 35580 (B1), *T. denticola* ATCC 35405^T (B2), *T. socranskii* subsp. *socranskii* ATCC 35536 (B3), *T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 (B4), *T. maltophilum* ATCC 51939^T (B5) (CW), und *T. phagedenis* subsp. *reiterii* (B6) (BW); ein klinisches Isolat (CW) (B8; höchste Ähnlichkeit zu Klon NZM 3142), und *T. pectinovorum* ATCC 33768^T (E1); die rekombinanten Klone der Gruppe I NZM 3D292 (C1), NZM 3D464 (C5), NZM 3112 (C6), NZM 3142 (D2), NZM 3147 (D4), und NZM 3166 (D7); die rekombinanten Klone der Gruppe II NZM 3106 (C7) und NZM 3158 (D6); die rekombinanten Klone der Gruppe III NZM 3143 (D3), NZM 3D298 (C3), und NZM 3D527 (C4); rekombinante Klone der Gruppe IV NZM 3122 (C8), NZM 3D505 (C2), und NZM 3125 (D8); rekombinante Klone der Gruppe V NZM 3124 (D1) und NZM 3155 (D5); der rekombinante Klon der Gruppe VI NZM 3104 (E2) und der rekombinante Klon der Gruppe VII NZM 3D384 (E3).

In den Spalten 9 und 10 befanden sich 7 rekombinante Klone der DD, beschrieben bei CHOI et al. (1997): DDKL-1 (A9); DDKL-2 (B9); DDKL-3 (C9); DDKL-4 (D9); DDKL-12 (A10); DDKL-13 (B10); DDKL-20 (C10); und das Isolat *T. brennaborensis* (D10).

Der Vergleich der positiven Hybridisierungsergebnisse ergab, daß 6 Klone mit 2 verschiedenen Oligonukleotidsonden reagierten. Die Sequenzanalyse von 3 der 6 Inserts zeigte, daß diese Klone aus zwei verschiedenen DNA-Fragmenten aufgebaut waren und somit chimäre Sequenzen darstellten.

Die Inserts von 5 Klonen, die mit der gattungsspezifischen Sonde TREPS jedoch mit keiner der gruppen- bzw. speziesspezifischen Sonde hybridisierten, wurden ebenfalls sequenziert. Eine sehr hohe Ähnlichkeit (95,3 -98,8%) zu *T. phagedenis* besaßen 4 Sequenzen. Dagegen hatte die Sequenz eines Klones (Klon 83) zu dem rekombinanten Klon DDKL-20 eine Ähnlichkeit von 92,3% (Tabelle 9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A								*		
B					●					
C		●						○		
D										
E				*	*	*	*	*	*	*

B1 (Kontrollmembran)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
F													
G													
H									●			●	
I				●	●								
J													
K													
L												●	
M			●										

B2 (Probenmembran)

Abb.16: Ergebnisse der Dot blot-Hybridisierung der 16S rDNA-Genbank mit der Oligonukleotidsonde TREIV (B1, B2). Die Membran (B1) zeigt die positiven Reaktionen der Kontroll-DNAs der Sonde TREIV. Auf der Probenmembran (B2) sind 6 positive Reaktionen erkennbar.

* keine Proben-DNA oder Kontroll-DNA aufgetragen

Zehn Klone, die in der Dot blot-Hybridisierung nur ein schwaches Signal mit der Oligonukleotidsonde TREPS aufwiesen, wurden sequenzanalysiert. Zwei dieser Klone besaßen Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu *T. phagedenis* (98,2-98,6%). Die acht anderen Klone zeigten Ähnlichkeit zu Sequenzen der Gattungen *Clostridium*, *Mycoplasma*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Porphyromonas* sowie *Butyrivibrio* (Tabelle 9).

Zur Kontrolle wurden 4 von 16 Inserts die in der Dot blot-Hybridisierung mit keiner gruppen- bzw. speziesspezifischen Oligonukleotidsonde reagierten analysiert. Diese 4 Klone besaßen keine Treponemensequenzen. Auf eine Sequenzanalyse weiterer negativer Klone wurde verzichtet.

Die Einordnung der Klone erfolgte nach Vergleich der 500 sequenzierten Basen (16S rRNA *E. coli* Position 100-600) und den veröffentlichten 16S rRNA-Sequenzen der Datenbank HUSAR (Abb. 17). Die rekombinanten Klonsequenzen wurden in den phylogenetischen Baum der Gattung *Treponema* eingeordnet (Abb. 19). Es ist zu erkennen, daß sich die Sequenzen der 16S rDNA-Gene gut in die Gruppen bzw. Cluster der Spezies *Treponema* einordnen lassen.

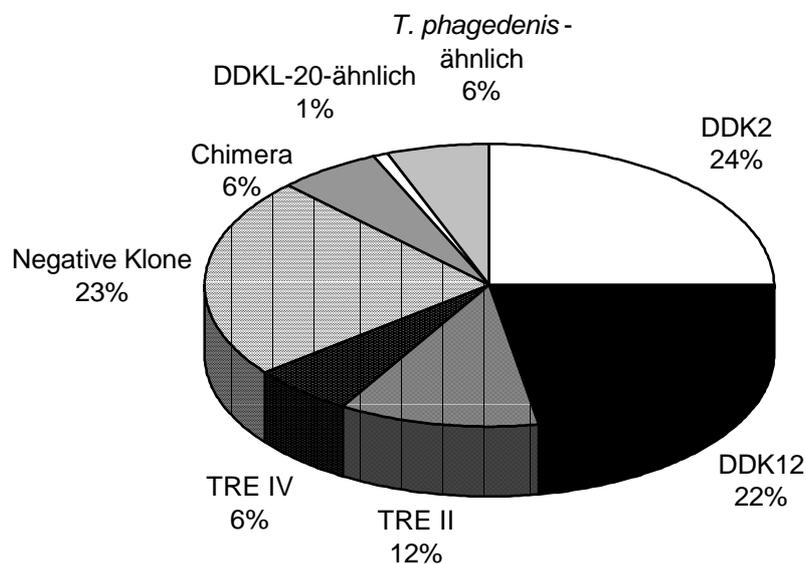


Abb. 17: Prozentuale Verteilung der Insertsequenzen der 16S rDNA-Genbank (n = 104 Klone) nach Auswertung der Dot blot-Hybridisierung (DDK2, DDK12, TREII, TREIV) und DNA-Sequenzanalyse.

Tabelle 9: Einordnung der 104 Klone der 16S rDNA-Genbank nach den Ergebnissen der Dot blot-Hybridisierung und der DNA-Sequenzanalyse.

* In der Dot blot-Hybridisierung hybridisierte die Oligonukleotidsonde TREPS nur schwach mit der Plasmid-DNA
 Ø keine Sequenzanalyse durchgeführt

Ergebnisse der Dot blot-Hybridisierung							Anzahl der Klone	Ergebnisse der Sequenzanalyse
verwendete Oligonukleotidsonden								
TREPS			DDK2	DDK12	TREII	TREIV	n	
+	(+)*	-						
21	2	3	26+	-	-	-	26	Ø
22	1	0	-	23+	-	-	23	Ø
12	0	0	-	-	12+	-	12	Gruppe II- ähnlich
6	0	0	-	-	-	6+	6	Gruppe IV- ähnlich
3	0	0	-	-	-		3	<i>T. phagedenis</i> ähnlich (96,9 - 98,8%)
1	0	0	-	-	-	-	1	<i>T. phagedenis</i> ähnlich (94,8%)
1	0	0	-	-	-	-	1	DDK20 ähnlich (92,3%)
0	2	0	-	-	-	-	2	<i>T. phagedenis</i> ähnlich (98,2 - 98,6%)
0	2	0	-	-	-	-	2	<i>Clostridium</i> spp.
0	1	0	-	-	-	-	1	<i>Mycoplasma</i> spp.
0	1	0	-	-	-	-	1	<i>Ruminococcus</i> spp.
0	2	0	-	-	-	-	2	<i>Bacteroides</i> spp.
0	1	0	-	-	-	-	1	<i>Porphyromonas</i> spp.
0	1	0	-	-	-	-	1	<i>Butyrivibrio</i> spp.
0	0	1	-	-	-	-	1	<i>Clostridium</i> spp.
0	0	2	-	-	-	-	2	<i>Mycoplasma</i> spp.
0	0	1	-	-	-	-	1	<i>Ruminococcus</i> spp.
0	0	12	-	-	-	-	12	Ø
5	0	0	5+	5+	-	-	5	Chimeren
1	0	0	1+	-	1+	-	1	Ø
72	13	19					104	