

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	3
2.1 Analyse bakterieller Diversität.....	3
2.2 Genus <i>Treponema</i>	9
2.3 Vorkommen von Treponemen	12
2.3.1 Natürliche Habitate	13
2.3.1.1 Pansen.....	13
2.3.1.2 Gastrointestinaltrakt verschiedener Spezies.....	14
2.3.2 Pathogene <i>Treponema</i> -Spezies	19
2.3.2.1 <i>Treponema pallidum</i>	19
2.3.2.2 <i>Treponema paraluisuniculi</i>	20
2.3.2.3 Orale <i>Treponema</i> spp.	21
2.3.2.4 Dermatitis digitalis (DD) assoziierte <i>Treponema</i> -spp.....	23
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	30
3.1 Material	30
3.1.1 Untersuchungsmaterial.....	30
3.1.2 Geräte	30
3.1.3 Chemikalien und Materialien	31
3.1.4 Nährmedien	32
3.1.5 verwendete Kits.....	32
3.1.6 Lösungen	33
3.1.6.1 Lösungen für die DNA-Extraktion.....	33
3.1.6.2 Lösungen für die DNA-Messung	33
3.1.6.3 Lösungen für die Agarosegelektrophorese	33
3.1.6.4 Lösungen für Dot blot-Hybridisierung.....	34
3.1.6.5 Lösungen für Fluoreszenz in situ Hybridisierungen	35

3.1.6.6	Lösungen für SDS-Page	35
3.1.7	Zusammensetzung des Polyacrylamid-Gels.....	36
3.1.8	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidsonden und Primer sowie eingesetzte Referenzstämme	37
3.2	Methoden.....	39
3.2.1	Entnahme des Probenmaterials	39
3.2.2	Bakteriologische Untersuchung	39
3.2.3	Anzucht und Charakterisierung von Isolaten	40
3.2.3.1	Anzucht	40
3.2.3.2	Biochemische Charakterisierung angezüchteter Isolate.....	40
3.2.3.3	Genotypische Charakterisierung	41
3.2.4	DNA-Extraktion des Probenmaterials.....	41
3.2.4.1	Bioptate	41
3.2.4.2	Kot und Pansensaft.....	42
3.2.5	Polymerase-Ketten Reaktion.....	42
3.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	43
3.2.7	Dot blot-Hybridisierung	43
3.2.7.1	DIG-labeling der Oligonukleotidsonden.....	43
3.2.7.2	Beschickung der Dot blot-Membran	44
3.2.7.3	Dot blot-Hybridisierung	44
3.2.7.4	Nachweis gebundener Oligonukleotidsonden	45
3.2.8	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	46
3.2.8.1	Fixierung der Kontrollstämme	46
3.2.8.2	Fixierung der Bioptate.....	46
3.2.8.3	Einbettung der Bioptate	46
3.2.8.4	Schneiden und Aufziehen der Bioptate	46
3.2.8.5	Verwendete Bioptate für die FISH.....	46
3.2.8.6	Verwendete Oligonukleotidsonden für die Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung.	
	47
3.2.8.7	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung	47
3.2.8.8	Mikroskopische Beurteilung	47
3.2.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
3.2.9.1	Zell-Lysate	47
3.2.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	48

3.2.9.3	Durchführung der SDS-Gelelektrophorese	48
3.2.10	Bestimmung der Nachweisgrenzen (Dot blot-Hybridisierung).....	48
3.2.10.1	DNA-Extraktion der eingesetzten Treponema-Stämme	49
3.2.10.2	DNA-Messung	49
3.2.10.3	Zugabe definierter DNA-Mengen zu Kot- bzw. Pansensaftproben	49
3.2.10.4	Zugabe definierter DNA-Mengen zu einer Polymerase-Ketten-Reaktion.....	50
3.2.10.5	Ermittlung der Detektionsgrenze Digoxigenin-gelabelter Oligonukleotid- sonden.....	50
3.2.10.6	Feststellung der jeweiligen Nachweisgrenzen mittels Dot blot-Hybridisierung..	50
4.	ERGEBNISSE	51
4.1	Konventionelle Anzucht.....	51
4.2	Charakterisierung der angezüchteten Isolate.....	52
4.2.1	Isolierung von Treponemen.....	52
4.2.2	Biochemische Charakterisierung.....	52
4.2.3	Genotypische Charakterisierung	53
4.2.4	Proteinchemische Charakterisierung mittels SDS-Page nach Lämmli	54
4.3	Auswahl einer geeigneten DNA-Extraktions-Methode	55
4.4	Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit	56
4.4.1	Zugabe definierter DNA-Mengen zu Kot- bzw. Pansensaftproben	56
4.4.2	Zugabe definierter DNA-Mengen zu einer Polymerase-Ketten Reaktion	57
4.4.3	Ermittlung der Detektionsgrenze der eingesetzten Digoxigenin-gelabelten Oligonukleotidsonden	58
4.5	DNA-DNA-Hybridisierung mittels Dot blot.....	59
4.5.1	Dot blot-Hybridisierung gegen Bioptat-, Pansensaft- und Kotproben.....	59
4.6	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung	60
5.	DISKUSSION	63
6.	ZUSAMMENFASSUNG	77

7. SUMMARY 79

8. LITERATURVERZEICHNIS 81

9. ANHANG 93