

UNTERSUCHUNGEN ZUR IMMUNOGENITÄT
VERSCHIEDENER ÄUßERER MEMBRANPROTEINE
VON *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* IM
ZELLKULTUR-ADHÄRENZ-MODELL

MAIKE RICHTER



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Untersuchungen zur Immunogenität verschiedener äußerer
Membranproteine von *Brachyspira hyodysenteriae* im
Zellkultur-Adhärenz-Modell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Maïke Richter

Tierärztin aus Bad Dürkheim

Gießen, 2009

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
PD Dr. H. Willems

Tag der Disputation: 23.04.2009

Meinen Eltern,

die stets für mich da waren
und
mich in allen Lebenslagen
und
bei allen Vorhaben
unterstützt
haben

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

M. Richter, G. Baljer und W. Herbst.

Untersuchungen zur Adhäsion von *Brachyspira hyodysenteriae* an Darmepithelzellen von Schwein, Ratte und Mensch.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift. 2008. Band 121 (11-12): Seite 402

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Stipendium zur Doktorandenförderung von der **H.-Wilhelm-Schaumann-Stiftung**.

INHALTSVERZEICHNIS

	INHALTSVERZEICHNIS	I
	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	IV
1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Die Schweinedysenterie (SD)	3
2.1.1	Ätiologie	3
2.1.2	Epidemiologie.....	4
2.1.3	Pathogenese	6
2.1.3.1	Verlauf der Infektion.....	6
2.1.3.2	Adhärenz der Brachyspiren an Epithelzellen.....	7
2.1.4	Klinik und Pathologie	9
2.1.5	Therapie und Eradikation.....	10
2.1.6	Versuche zur Vakzination gegen die Dysenterie.....	11
2.1.7	Bakterielle Adhärenz an Epithelzellen und äußere Membranproteine von <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	12
3	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	Materialien	16
3.1.1	Verbrauchsmaterialien und Puffer	16
3.1.2	Bakterienstämme	16
3.1.3	Gentechnisch veränderte Mikroorganismen (GVOs).....	16
3.1.4	Plasmide	18
3.1.5	Zelllinien	19
3.1.6	Tiere	19
3.2	Bakteriologische Methoden	19
3.2.1	Anzucht von Bakterien	19
3.2.2	Keimzahlbestimmung.....	20
3.2.3	Reinheitskontrolle	21
3.3	Molekularbiologische Methoden	21
3.3.1	Präparation von DNS aus Bakterienkulturen.....	21
3.3.2	DNS-Bestimmung	21
3.3.3	Restriktion von DNS.....	21
3.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
3.3.5	Primer.....	23
3.3.6	Agarosegelelektrophorese	25

3.3.7	DNS-Klonierung	25
3.3.8	DNS-Sequenzierung	26
3.4	Proteinanalytische Methoden	26
3.4.1	Bestimmung der gewonnenen Proteinkonzentration	26
3.4.2	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	26
3.4.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	27
3.5	Serologische Methoden	28
3.5.1	Konjugate	28
3.5.2	Westernblot / Immunoblot	28
3.6	Zellkulturmethoden.....	29
3.6.1	Kultivierung der Zellen	29
3.6.2	Studium der Adhärenz von <i>B. hyodysenteriae</i> an Darmepithelzellen	30
3.7	Tierexperimentelle Methoden	32
3.7.1	Tierhaltung	32
3.7.2	Herstellung der Impfstoffe	32
3.7.3	Herstellung rOMP-spezifischer Antiseren im Kaninchen	33
3.8	Datenhaltung und Auswertung.....	34
3.8.1	Bilddokumentation und Auswertung	34
3.8.2	Auswertung von DNS-Sequenzdaten	34
3.8.3	Statistische Auswertung.....	34
4	ERGEBNISSE	35
4.1	Vorkommen der für äußere Membranproteine kodierenden Gene (<i>bhlp16</i>, <i>bhlp29,7d</i>, <i>bhmp39f</i> und <i>bhmp39h</i>) bei verschiedenen Referenzstämmen dieser Spezies	35
4.2	Rekombinante Herstellung der Proteine Bhlp16, Bhlp29,7d, Bhmp39f und Bhmp39h.....	36
4.2.1	Klonierung der Gene <i>bhlp16</i> , <i>bhlp29,7d</i> , <i>bhmp39f</i> und <i>bhmp39h</i> in <i>E. coli</i> BLR(DE3).....	36
4.2.2	Ergebnisse der Proteinexpression und -aufreinigung.....	39
4.2.3	Optimierung der Proteinexpression	46
4.2.4	Proteingehalte der rOMP-Präparationen	48
4.3	Ergebnisse der Immunisierungsversuche	48
4.3.1	Nachweis der rOMP-spezifischen Antikörper beim Kaninchen	48
4.3.2	OMP-Detektion in Ganzzelllysaten von <i>B. hyodysenteriae</i> durch die rOMP- spezi-fischen Antiseren.....	50
4.3.3	OMP-Detektion in Ganzzelllysaten der <i>B. hyodysenteriae</i> - Serotyp-Referenz- stämmen 1-9 durch die rOMP-spezifischen Antiseren vom Kaninchen	52

4.4	Adhäsionsversuche	56
4.4.1	Adhäsion der Brachyspiren an Darmepithelzelllinien von Schwein, Ratte und Mensch.....	56
4.4.2	Hemmung der Adhärenz von <i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm B204 durch Rekonvaleszentenserum von Schweinen und Ganzzelllysate von IEC-18 und IPEC-J2-Zellen.....	56
4.4.3	Hemmung der Adhäsion von <i>B. hyodysenteriae</i> (Stamm B204) an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit den rOMP-spezifischen Antiseren vom Kaninchen.....	60
4.4.4	Hemmung der Adhäsion der neun <i>B. hyodysenteriae</i> Serotyp-Referenzstämme an IPEC-J2-Zellen durch Anti-rBhlp16 (CH078) plus Anti-rBhmp39f (CH080)	63
5	DISKUSSION	66
6	ZUSAMMENFASSUNG	74
	SUMMARY	76
7	LITERATURVERZEICHNIS	78
8	ANHANG	87
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	91
9.1	Abbildungen	91
9.2	Tabellen.....	93
	DANKSAGUNG	95

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

° C	° <u>C</u> elsius
ad	auffüllen auf
A.dest.	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata
AHT	<u>A</u> nhydro <u>t</u> etrazyklin
Ak	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
Amp ^f	Ampicillinresistenz-Gen (Strukturgen der β-Lactamase)
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
B.	Brachyspira
<i>B. hyo</i>	<i><u>B</u>rachyspira <u>h</u>ydysenteriae</i>
BHI	<u>b</u> rain- <u>h</u> eart- <u>i</u> nfusion (Nährbouillon)
BHIF	<u>b</u> rain- <u>h</u> eart- <u>i</u> nfusion (Nährbouillon) mit 20 % <u>F</u> KS
<i>bhlp16</i>	Gen zu Protein Bhlp16 (alte Bezeichnung SmpA)
<i>bhlp29,7d</i>	Gen zu Protein Bhlp29,7d (alte Bezeichnung BmpB)
<i>bhmp39f</i>	Gen zu Protein Bhmp39f (alte Bezeichnung VspF)
<i>bhmp39h</i>	Gen zu Protein Bhmp39h (alte Bezeichnung VspH)
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
bzw	<u>b</u> eziehu <u>n</u> gs <u>w</u> eise
ca	<u>c</u> ir <u>c</u> a
cm	Zentimeter
CVSSR	<u>C</u> olistin, <u>V</u> ancomycin, <u>S</u> pectinomycin, <u>S</u> piramycin, <u>R</u> ifampicin
d	Tage
DNS	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i><u>E</u>scherichia <u>c</u>oli</i>
Fa	<u>F</u> irma
FKS	<u>F</u> ötale <u>K</u> älberserum
fmol	<u>F</u> emt <u>o</u> l
g	<u>G</u> ramm
GVOs	<u>G</u> entechnisch <u>v</u> eränderte Mikro <u>o</u> rganismen
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure)
HRP	<u>h</u> orse <u>r</u> addish <u>p</u> eroxidase (Meerrettichperoxidase)
incl.	<u>i</u> n <u>c</u> l <u>u</u> sive
i.v.	<u>i</u> ntrav <u>e</u> nös

Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IHIT	<u>I</u> nstitut für <u>H</u> ygien <u>e</u> und <u>I</u> nfektionskrankheiten der <u>T</u> iere, JLU Gießen
Kb	<u>K</u> ilob <u>a</u> sen
Kbw/min	<u>K</u> ipp <u>b</u> ewegungen pro <u>M</u> inute (gezählt wird jeder Anschlag)
kDa	<u>K</u> ilodalton
KG	<u>K</u> örper <u>g</u> ewicht
LB	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani (Nährbouillon)
LPS	<u>L</u> ipopol <u>y</u> saccharid
M	<u>m</u> olar
mA	<u>M</u> illiampere
MCSI	<u>M</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite <u>I</u>
min	<u>M</u> inute
ml	<u>M</u> illiliter
mM	<u>M</u> illimol
NMWL	<u>N</u> ominal <u>M</u> olecular <u>W</u> eight <u>L</u> imit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Stichprobenumfang
ng	<u>N</u> anogramm
o.a.	<u>o</u> ben <u>a</u> ngeführt
OD ₅₅₀	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte bei einer Wellenlänge von <u>550</u> nm
OMP	<u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein (äußeres Membranprotein)
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>g</u> ele <u>e</u> ktrophorese
PBS	<u>P</u> hosphat- <u>B</u> uffered- <u>S</u> aline
PCR	<u>P</u> olymerase- <u>C</u> hain- <u>R</u> eaction (Poymerase-Kettenreaktion)
pmol	<u>P</u> ikomol
REM	<u>R</u> aster <u>e</u> lektronen <u>m</u> ikroskop
r	<u>r</u> ekombinant
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
s	<u>S</u> ekunde
s.k.	<u>s</u> ub <u>k</u> utan
SD	<u>S</u> chweinedysenterie
SDS	<u>S</u> odium (=Natrium)- <u>D</u> odecyl <u>s</u> ulfat
sp	<u>S</u> pezies
Strep-Tag	zur Markierung verwendetes Streptavidin-Fragment aus <i>Streptomyces avidinii</i>
s.u.	<u>s</u> iehe <u>u</u> nten

TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> acetat- <u>E</u> DTA-Puffer
TEM	<u>T</u> ransmissionselektronen <u>m</u> ikroskop
TEMED	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
Tet	<u>T</u> etrazyklin
Tris	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	<u>T</u> rypticase- <u>S</u> oja- <u>A</u> gar
U	<u>U</u> nit
u.a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
U/min	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
usw.	<u>u</u> nd <u>s</u> o <u>w</u> eiter
u.U.	<u>u</u> nter <u>U</u> mständen
UV	<u>U</u> ltraviolette <u>s</u> Licht
V	<u>V</u> olt
z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
z.T.	<u>z</u> um <u>T</u> eil

1 EINLEITUNG

Brachyspira (B.) hyodysenteriae ist der Erreger der Schweinedysenterie. Weltweit führt diese Erkrankung besonders in Ländern mit intensiver Schweinehaltung zu bedeutenden finanziellen Verlusten (34). Klinisch ist die Dysenterie durch eine mukohämorrhagische Diarrhö gekennzeichnet, von der hauptsächlich junge Mastschweine betroffen sind (3, 28, 34). Die Morbidität ist mit bis zu 90 % sehr hoch und die Mortalität erreicht bei unbehandelten Tieren bis zu 30 % (105). Für die Entstehung einer durch *B. hyodysenteriae* hervorgerufenen Erkrankung sind besondere Pathogenitätsmerkmale der Bakterien verantwortlich, wie z. B. die positive Chemotaxis zu Muzin (58), das LPS sowie ein oder mehrere Hämolyse (104, 106) und die Aerotoleranz der Mikroorganismen (97).

Bezüglich der Dysenterieprophylaxe erscheinen Eradikationsanstrengungen auf Basis einer konsequenten antibiotischen Therapie in Verbindung mit flankierenden hygienischen Maßnahmen als aussichtsreich (100, 111). Untersuchungen zur Immunprophylaxe mit inaktivierten und/oder attenuierten Ganzzellvakzinen waren dagegen bislang wenig Erfolg versprechend (104). Da der Erreger serologisch nicht einheitlich ist (66), könnte eine fehlende Übereinstimmung von Impf- und Feldstämmen Grund für diese Misserfolge sein. Außerdem ist denkbar, dass bei der *in vitro* Vermehrung der Impfkeime immunogene Proteine, die in der Pathogenese eine wichtige Rolle spielen, gar nicht exprimiert werden. Derzeit richten daher verschiedene Arbeitsgruppen ihr Augenmerk im Rahmen der Vakzineentwicklung auf die äußeren Membranproteine von *B. hyodysenteriae* (40, 63, 74, 121). Diese Proteine sind wahrscheinlich serotypübergreifend und haben möglicherweise aufgrund ihrer exponierten Position in der Zellwand der Bakterien Bedeutung für die *in vitro* Versuchen hergeleitete Fähigkeit der Brachyspiren zur Adhärenz an Säugerzellen. Die Adhärenz ist ein bedeutsamer Schritt im Rahmen der Pathogenese (7, 62, 120), aber bisher nicht aufgeklärt. Als Beitrag zum Verständnis dieses *in vitro* vorliegenden Geschehens war zu untersuchen, ob die Hypothese über eine mögliche Vermittlung der Adhärenz von *B. hyodysenteriae* an Epithelzellen durch äußere Membranproteine berechtigt ist. Gleichzeitig interessierte, ob diese Proteine, wie angenommen, tatsächlich eine hohe Übereinstimmung innerhalb verschiedener Stämme besitzen und somit als konserviert gelten. Entsprechend dieser Aufgabenstellung wird zunächst ein Zellkulturmodell entwickelt, das zum Studium der Adhärenz von *B. hyodysenteriae* an Darmepithelzellen dienen soll. Anschließend werden unter Verwendung ausgewählter rekombinant hergestellter OMPs spezifische Antiseren im Kaninchen erzeugt. Mit Versuchen zur Inhibierung der bakteriellen Adhärenz an Darmepithelzellen mit diesen zunächst im Westernblot charakterisierten Antiseren, soll daraufhin die aufgestellte Hypothese geprüft werden. Im Folgenden sind Untersuchungen mit verschiedenen Serotypen von *B. hyodysenteriae* vorgesehen, die zur

Beantwortung der bedeutsamen Frage beitragen sollen, ob die Inhibierung der Anheftung als serotypübergreifend oder eher als serotypspezifisch zu charakterisieren ist.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Die Schweinedysenterie (SD)

Die Schweinedysenterie ist eine weltweit verbreitete Erkrankung (24, 29, 34), die erstmalig 1921 in Indiana (USA) beschrieben wurde (119) und insbesondere heranwachsende Masttiere, seltener auch Zuchtsauen betrifft (3, 34). Verursacht wird die Erkrankung durch *Brachyspira (B.) hyodysenteriae*, welches erst 1971 definitiv als Erreger der Schweinedysenterie identifiziert werden konnte (102). Die hohe Morbidität (bis 90 %) und Mortalität (bis 30 %) in den betroffenen Herden (105) führt zu massiven ökonomischen Verlusten in der Schweineindustrie, insbesondere auch durch die deutliche Reduktion der Gewichtszunahmen (24, 34).

2.1.1 Ätiologie

Brachyspira hyodysenteriae gehört zur Familie der Brachyspiraceae der Ordnung Spirochaetales (78). Obwohl die Schweinedysenterie bereits 1921 erstmals beschrieben wurde (119), datiert die Kenntnis der Ätiologie erst auf Untersuchungen aus dem Jahr 1971 (102).

Brachyspiren sind gram-negative Schraubenbakterien, die aufgrund ihrer periplasmatischen Flagellen (34, 42) und ihrer positiven Chemotaxis zu Muzin (*B. hyodysenteriae*) zu einer aktiven und zielgerichteten Fortbewegung befähigt sind (76). Zum Überleben benötigen die Mikroorganismen ein anaerobes Umfeld, gelten jedoch als aerotolerant, was sie dem Enzym NADH-Oxidase (NOX) verdanken (96, 97). Ein besonderes Kennzeichen bei der Vermehrung auf Schaf- oder Pferdeerythrozyten enthaltenden festen Nährböden ist die Ausbildung einer vollständigen Hämolyse. Hierdurch lässt sich *B. hyodysenteriae* von den übrigen beim Schwein vorkommenden *B. spp.* (*B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*), die lediglich eine schwache Hämolyse zeigen, abgrenzen (48, 60). Hämolyse, Beweglichkeit, Chemotaxis und Aerotoleranz sind bedeutende Virulenzfaktoren dieser Bakterien (48, 104).

Ein weiteres typisches Merkmal ist die hohe serologische Diversität innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae*. Derzeit werden neun Serotypen (13, 66, 71), bzw. Serogruppen (28, 30, 66, 69) unterschieden. Der ursprünglichen Einteilung in Serotypen folgte aufgrund der Vielzahl festgestellter Kreuzreaktivitäten zwischen den einzelnen Isolaten 1989 die Einteilung in Serogruppen (28, 29). Die Zusammenfassung mehrerer kreuzreagierender Isolate (Serovare) zu Serogruppen ist ein Versuch, die natürlichen Verhältnisse anschaulicher

widerzuspiegeln. Über die Ergebnisse bisheriger Serotypisierungsversuche von *B. hyodysenteriae* – Isolaten informiert **Tabelle 1**. Es wird ersichtlich, dass das Spektrum der in verschiedenen Ländern vorherrschenden Serotypen sehr unterschiedlich sein kann. Dies trifft nicht nur auf geografisch weit voneinander entfernt liegende Regionen zu, sondern auch auf benachbarte und in enger wirtschaftlicher Beziehung stehende Länder. So herrschen beispielsweise in den USA die Serotypen 1 und 2 vor (6, 23, 71), während in Kanada in erster Linie die Serotypen 8 und 9 dominieren (71).

2.1.2 Epidemiologie

Die Schweinedysenterie ist weltweit verbreitet und führt insbesondere in Ländern mit intensiver Schweineproduktion zu wirtschaftlichen Verlusten (24). So gibt es Berichte aus Europa (24, 36, 98, 101), Asien (59), den USA (24), Südamerika (5) und Australien (75). Was die Situation in Deutschland anbetrifft, muss ebenfalls von einer weiten und möglicherweise sogar noch zunehmenden Ausbreitung des Erregers ausgegangen werden. Wurden in den 90iger Jahren noch in ca. 25 % der Proben von durchfallkranken Schweinen *B. hyodysenteriae* nachgewiesen, waren es Anfang des 21. Jahrhunderts z. T. über 30 % (39, 85, 110, 112).

Die Übertragung des Erregers erfolgt auf fäkal-oralem Weg. Als Infektionsquelle ist somit in erster Linie der Kot infizierter Schweine zu nennen. Bei kranken und auch klinisch unauffälligen Schweinen, aber auch bei Ratten (25), Mäusen (49) und Hunden (92) wurde der Erreger im Kot nachgewiesen. Die Ausscheidung der Bakterien kann beim Schwein nach Rekonvaleszenz über einen Zeitraum von bis zu drei Monaten (83 Tagen) erfolgen (17). Beispielsweise infizierte ein Schwein noch 70 Tage nach Ende der Symptomatik dysenteriefreie Tiere (93). Selbst klinisch nicht erkrankte Tiere scheiden die Bakterien nach experimenteller Infektion über einen Zeitraum von bis zu 51 Tagen aus (17). Begünstigt wird die Übertragung mit dem Kot durch die lange Überlebensdauer der Brachyspiren in den Fäzes: noch nach 112 Tagen (bei 10 °C) konnten in kontaminierten Kotproben vermehrungsfähige Bakterien nachgewiesen werden. Unzureichende Hygienemaßnahmen (mangelnde Reinigung und Desinfektion) sind demnach bedeutende Faktoren, die zu einer raschen Ausbreitung des Erregers im Bestand führen (8).

Betroffen sind hauptsächlich junge Mastschweine bis 16 Wochen, seltener Sauen und Saugferkel in Zuchtherden (3, 34). Der hohe ökonomische Schaden entsteht durch Kosten für Medikation, Tierverluste und insbesondere verringerte Gewichtszunahmen (24, 34).

Tabelle 1: Übersicht über die Serotypzuordnung diverser *B. hyodysenteriae*-Isolate

Den verschiedenen Serotypen (1-9) und Serogruppen (A-J) zugeordnete <i>B. hyodysenteriae</i>-Isolate									
1/A	2/B	3/C	4/D	5/E	6/F	7/G	8/H	9/J	
ATCC 27164	<u>ACK 300/8</u>	e B169*	c A1*	d <u>B8044</u>	b <u>B6933</u>	b <u>ACK 300/8</u>	e FM 88-76	c FMV 89-3323	c
B78*	b ATCC 31212		NSW2	a KF9	d Vic1	a Q14	a FM 88-89	c FMV 89-1614D	c
B234*	b ATCC 31213		P18A*	d MC 52/80	d	Q16	a FM 88-90	c FMV 89-1020P4	c
<u>B6933</u>	b B140*	b	Q1 – Q9	a Q24	a	Q18	a FM 88-91	c 1389-440	c
Den191	g B204*	b	Q12	a WA3	a	Q22	a FM 88-94	c 89-440	c
Dys7	<u>B8044</u>	b	Q13	a WA5	a		FM 88-104	c 89-1066 C2	c
G	f DJ 215	i	Q15	a WA6	a		FM 88-116	c 89-1066 C21	c
SA3	a KSU 90-17491	b	Q16	a	a		FM 88-77 P6	c 89-1066 D81	c
T6	Q11	a	Q17	a	a		FM 88-81 P6	c NSW1	a
T7	Q17	a	Q19	a	a		FM 88-95 P6	c	a
Vic27	a Q21	a	Q23	a	a		FM 88-106 P6	c	c
Vic28	a Q25	a	SA1	a	a		FM 88-86 P7	c	c
Vic29	a Q26	a	SA2	a	a		FM 88-105 P9	c	c
WA14	a T3	a	Vic3	a	a		FM 88-88 P10	c	c
WA15	a T5	a	Vic5	a	a		Vic2	a	a
WA27	a 9605	a	Vic6	a	a				
	NSW3	a	Vic7	a	a				
	Vic4	a	Vic8	a	a				
	Vic5	a	Vic9	a	a				
	Vic10 – Vic21	a	Vic21 – Vic26	a	a				
	Vic30 – Vic37	a	Vic29	a	a				
	Vic37a	a	Vic41	a	a				
	Vic37b	a		a	a				
	Vic38	a		a	a				
	Vic40	a		a	a				
	WA1	a		a	a				
	WA2	a		a	a				
	WA4	a		a	a				
	WA7 bis WA13	a		a	a				
	WA26	a		a	a				

Literatur zu Tabelle 1:
 (6), (10), (13), (23), (28), (29), (32), (66), (69), (71), (72), (94), (117)

Legende zu Tabelle 1:
 fettgedruckt:
 kursiv mit *:
 normal:
 unterstrichen:
 Herkunft der Isolate:

Einteilung nur in Serotypen erfolgt
 Einteilung in Serotypen und Serogruppen erfolgt
 Einteilung nur in Serogruppen erfolgt
 unterschiedliche Einteilungen beschrieben

a: Australien
 b: USA
 c: Kanada
 d: UK
 e: Niederlande
 f: Mexiko
 g: Dänemark
 i: Japan

2.1.3 Pathogenese

2.1.3.1 Verlauf der Infektion

Habitat von *B. hyodysenteriae* ist der Dickdarm. Die Entstehung einer mukohämorrhagischen Diarrhö ist an die Ausprägung bestimmter Virulenzeigenschaften des Erregers gebunden (s. u.). Erste Hürde auf dem aus Sicht des Erregers langen Weg von der Außenwelt bis in den Dickdarm ist der Magen. Der niedrige pH-Wert des Magensafts ist für die meisten Bakterien tödlich, auch für Brachyspiren. Der Erreger wird jedoch in sehr hoher Zahl und zudem noch verpackt in einer schützenden Hülle aus Kot und Schleim aufgenommen, so dass eine ausreichende Zahl von Brachyspiren die Magenpassage überlebt (34, 37). Auch bei experimentellen Infektionen sind sowohl sehr große Erregermengen, ca. 10^7 bis 10^9 (47, 52), als auch Schutzvorkehrungen vor dem niedrigen pH des Mageninhalts für das Angehen der Infektion erforderlich. Letzteres wird durch intragastrale Applikation des in einer großen Menge puffernder Nährbouillon suspendierten Erregers bewerkstelligt (63).

Die anschließende Kolonisierung des Dickdarms durch *B. hyodysenteriae* wird durch das dort herrschende Milieu beeinflusst. Wichtig ist das Vorhandensein einer residenten Mikroflora (z. B. *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides vulgatus*). Gnotobioten lassen sich in der Regel nicht erfolgreich infizieren (33, 118). Dies gelingt bislang lediglich durch die orale Inokulation des pathogenen *B. hyodysenteriae*-Stammes B204, wobei sich die typischen Läsionen zwar zeigen, aber deutlich schwächer ausgeprägt sind (34, 81). Somit ist eine residente Mikroflora für die Entwicklung der initialen Läsionen nicht notwendig, beeinflusst aber erheblich den Verlauf der Erkrankung (34). Förderlich für die Krankheitsentstehung ist weiterhin die Fütterung mit einem erhöhten Sojaschrotanteil, einem hohen Gehalt an Protein und Nicht-Stärke-Polysacchariden (80, 90) und bestimmten nur im Dickdarm abbaubaren Oligosacchariden (Raffinose, Stachyose, Verbacose) (116).

Bei der Besiedlung der Dickdarmkrypten und der die Epithelzellen bedeckenden Mukusschicht kommt dem Erreger seine Aerotoleranz, die ihm ein Überleben bei geringen Sauerstoffkonzentrationen im Darm ermöglicht, sehr zugute. Stämme, denen das NADH-Gen (verantwortlich für die Sauerstofftoleranz) fehlt, sind weniger virulent (97). Die hohe Beweglichkeit der Brachyspiren (56, 84) und ihre Chemotaxis zu Muzin (24, 57, 58) lenken sie an die Orte der höchsten Muzinkonzentration, an die Oberfläche der Epithelzellen. Die Beweglichkeit wird als absolut notwendig für die Virulenz angesehen. Auch waren Stämme ohne das erwähnte Orientierungsvermögen weniger virulent (56, 76, 84). Die Präsenz der Brachyspiren in den Kolonkrypten führt zur Stimulation der Schleimproduktion in den Becherzellen. Dementsprechende klinische Anzeichen (Schleimbeimengungen im Kot)

werden offensichtlich, wenn die Zahl der Brachyspiren einen Wert von 10^6 Zellen je cm^2 Schleimhaut erreicht (118).

Die Spirochäten lagern sich auch an die lumenseitige Oberfläche der zerstörten Epithelzellen an und dringen in diese ein (20, 55). Einige der Bakterien findet man auch jenseits der Basalmembran in der Lamina Propria nahe der Blutgefäße (24, 45, 81). Die entstehenden Erosionen stellen Eintrittspforten für die Invasion anderer Mikroorganismen, wie beispielsweise *Balantidium coli* dar, was zu einer weiteren Schädigung der Darmschleimhaut führt (24). Die in gesunden Schweinen überwiegend gram-positive Mikroflora unbeweglicher Bakterien verschiebt sich in Richtung beweglicher gram-negativer Mikroorganismen in erkrankten Tieren (24, 82). Es wird vermutet, dass verschiedene Toxine der Brachyspiren, wie Lipopolysaccharid (LPS) und Hämolyse, an der Epitheldegeneration beteiligt sind (24, 46, 104, 105), was unter experimentellen Bedingungen allerdings bislang nicht nachvollzogen werden konnte (24, 61, 120). Durch entzündliche und nekrotisierende Prozesse entstehen im Bereich des erodierten Epithels Blutungen, was die im Verlauf der Erkrankung auftretenden Blutbeimengungen im Kot erklärt (45, 55). Obwohl die für SD typischen Veränderungen besonders dort lokalisiert werden, wo Brachyspiren in den Epithelzellen vorzufinden sind, wird die Invasion der Epithelzellen nicht als notwendig im Rahmen der Pathogenese angesehen (34). Im Zusammenhang mit dieser Invasion ist nicht geklärt, ob diesem Vorgang eine Adhäsion der Brachyspiren an die Epithelzellen vorangeht. Adhäsionsversuche unter Verwendung von Zellkulturen sprechen zwar dafür, jedoch fehlen derartige Befunde in vivo (7, 57, 62, 120).

Aufgrund der resultierenden Malabsorption im Dickdarm entstehen hohe Verluste an Natrium, Chlorid, Bicarbonat und Wasser (4, 24), was bei unzureichender Therapie tödlich enden kann.

2.1.3.2 Adhärenz der Brachyspiren an Epithelzellen

Ob *Brachyspira hyodysenteriae* an Darmepithelzellen adhärert und inwieweit das Adhäsionsvermögen für die Pathogenese der Erkrankung wichtig ist, wird seit längerem kontrovers diskutiert (48, 104).

1974 untersuchten Glock, Harris und Kluge erstmals mittels Phasen-, Licht- und Elektronenmikroskopie die Darmschleimhaut experimentell infizierter Schweine. Die Inokulation erfolgte oral mit einer Suspension von abgeschabter Kolonschleimhaut SD-kranker Schweine, die negativ auf Salmonellen getestet wurden. Dabei fanden sie heraus, dass die Brachyspiren in großer Zahl an der lumenseitigen Oberfläche des Kolons und insbesondere in den Krypten zu finden sind. Auch konnten sie bereits im Lichtmikroskop scheinbar intakte Spirochäten sowohl in Becherzellen, als auch in und zwischen sonstigen

Epithelzellen darstellen. Diese intrazellulären Brachyspiren wurden zum Teil an der Basis der Epithelzellen beobachtet und schienen an die Lamina propria angeheftet zu sein. Hinter dieser Barriere sind sie allerdings nicht in Erscheinung getreten. Im Dickdarm von nicht infizierten Kontrolltieren konnten keine Spirochäten nachgewiesen werden. Bereits zwei Tage nach der Infektion wurden die Bakterien in der Kolonschleimhaut beobachtet, wobei sich deren Zahl im Laufe der Untersuchungen in Tieren mit frühzeitiger klinischer Symptomatik stark ansteigend präsentierte. Die Untersucher mutmaßten, dass die Penetration des Epithels durch die Mikroorganismen entweder zwischen den Epithelzellen oder durch die luminale Oberfläche erfolgt. Da sie keine spezifische Adhäsion nachweisen konnten, vermuteten die Verfasser, dass die Invasion durch Invagination der Zellmembran stattfindet. Andererseits wurden niemals Spirochäten in einer Vakuole gesehen, sondern lagen stets frei und beweglich im Zytoplasma (20).

1979 führten Knoop und Kollegen Anheftungsversuche an intestinalen Schweineepithelzellen und adrenalen Mäusezellen durch. Die Zellen wurden bei 50 %iger Konfluenz mit dem *B. hyodysenteriae*-Referenzstamm B78 (Serotyp 1/Serogruppe A) inokuliert. Der dreigeteilte Versuchsaufbau verglich die Anheftung von lebenden und inaktivierten Brachyspiren. Die Inaktivierung erfolgte zum einen mittels Hitze (56 °C, 60 min) zum anderen durch aerobe Inkubation bei 23 °C für drei Tage. Die Auswertung erfolgte nach einer Giemsa-Färbung durch Zählung von mindestens 200 Zellen mit mehr als drei angehefteten Brachyspiren in 40 Feldern. Es zeigte sich, dass eine direkte Bindung nur bei lebenden Vertretern pathogener *B. spp.* stattfand, während inaktivierte Bakterien nur vereinzelt Anheftung zeigten. Die direkte Bindung an die Zelloberfläche konnte bereits 15-60 min nach der Inokulation festgestellt werden. Temperaturen unter 37 °C wirkten sich negativ auf die Zahl der angehefteten Brachyspiren aus. Zusätzlich wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, in denen häufig axiale Fibrillen in enger Verbindung mit der Zelloberfläche dargestellt werden konnten. Auch hier war es jedoch nicht möglich, den Prozess des Eindringens in die Zelle darzustellen, so dass dieser Schritt weiterhin hypothetisch bleibt (62).

Im selben Jahr führte eine weitere Arbeitsgruppe um Wilcock und Olander Anheftungsversuche mit einem nicht näher bezeichneten *B. hyodysenteriae*-Stamm an HeLa- (Mensch), Schweinehoden- und Schweine-buffy-coat-Zellen durch. Verwendet wurden 24-48 h alte Monolayer-Kulturen. Die Auswertung erfolgte nach Hämatoxylin-Eosin- oder Warthin-Starry-Silberfärbung mittels Phasenkontrast-, Licht- und Dunkelfeldmikroskopie. Auch hier konnte bei allen getesteten Zellen eine direkte Bindung der Bakterien an die Zelloberfläche nachgewiesen werden, wobei lediglich bewegliche Brachyspiren in der Lage waren zu adhären. Auch nach dreistündiger Wartezeit löste sich die einmal zustande

gekommene Bindung nicht. Wilcock und Olander konnten weiterhin keine Zellpenetration oder sonstige Effekte einer Adhäsion auf die Zellmorphologie erkennen (120).

Der neueste veröffentlichte Adhäsionsversuch datiert auf das Jahr 1989. Bowden et al. untersuchten die Anheftung verschiedener *B. hyodysenteriae*-Stämme an HIE 407-Zellen (Mensch). Verwendet wurden die Stämme B234 (pathogen), B204 (pathogen), ACK 300/8 (apathogen) und T22 (apathogen), jeweils lebend, hitzeinaktiviert (56 °C, 30 min.), kälteinaktiviert (4 °C, 24 h) und formalininaktiviert (0,03 %, 37 °C, 24 h). Nach Durchführung einer Wright-Färbung erfolgte die mikroskopische Detektion der Anheftung. Auch in dieser Studie konnte die Adhäsion nachgewiesen werden, bei einer positiven Korrelation zwischen Titer der inokulierten und Zahl der angehefteten Brachyspiren. Zudem wurden verschiedene Parameter bezüglich ihres Einflusses auf die Adhärenz überprüft (7).

Nur eine Arbeitsgruppe um Kennedy et al. hat 1988 versucht mittels Elektronenmikroskopie eine direkte Bindung an die Epithelzellen nicht in Zellkultur, sondern in der Darmschleimhaut experimentell infizierter Tiere nachzuweisen. Die Interaktion des *B. hyodysenteriae*-Stammes B204 (Referenzstamm für Serotyp 2/Serogruppe B) mit den Epithelzellen wurde im Elektronenmikroskop (REM und TEM) untersucht. In diesem Fall war es nicht möglich eine Adhäsion nachzuweisen, so dass daraus geschlossen wurde, dass eine Anheftung in vivo nicht stattfindet (57).

Erstaunlicherweise sind seit 1989 keine weiteren Anstrengungen bezüglich der näheren Erforschung der Adhäsion und deren möglicher Beteiligung an der Entstehung der Schweinedysenterie unternommen worden.

2.1.4 Klinik und Pathologie

Wichtigstes klinisches Kennzeichen dieser bakteriellen Infektion ist eine mukohämorrhagische Diarrhö (28, 34). Zunächst werden die Fäzes gelb bis grau und es kann zu Anorexie und einem Anstieg der Körpertemperatur auf 40 bis 40,5 °C kommen. Häufig entleert sich der Dickdarm schlagartig, was klinisch zur Ausprägung einer deutlichen Wespentaille führt. Mit zunehmender Dauer wird der Kot meist blutig, enthält Schleimbeimengungen und ist von wässriger Konsistenz. Die betroffenen Tiere werden schwach, magern ab und sterben häufig aufgrund von Dehydratation, Azidose und Hyperkaliämie. Neben den klinisch akuten Fällen können auch perakute und chronische Verlaufsformen auftreten (3, 34, 81). Neben der Virulenz des Erregers sind für eine klinische Manifestation der Infektion sehr wahrscheinlich zusätzliche Faktoren erforderlich. Als Cofaktoren kommen sowohl infektiöse (u. A. *B. innocens* (60, 103), *Clostridium spp.*(118), *Bacteroides vulgatus* (33, 118)) als auch nicht infektiöse Ursachen, wie beispielsweise die

Futterzusammensetzung, in Frage. Interessanterweise kann der klinische Verlauf der Erkrankung durch Fütterung einer hochverdaulichen Diät deutlich gemildert werden (80, 90).

Im Gegensatz zu vielen anderen Durchfallerkrankungen beim Schwein, ist bei der Dysenterie lediglich der Dickdarm von pathologisch-anatomischen Veränderungen betroffen (1, 20, 34, 81, 103). Zunächst verändert sich das Erscheinungsbild der üblicherweise glatten Schleimhaut nach rau und gewellt (55). In der Folge entwickeln sich punktuell entzündliche Veränderungen, Schwellungen und oberflächliche Nekrosen. Bei schwerwiegenden Verlaufsformen führt eine vermehrte Fibrinexsudation zur Bildung mukofibrinöser Pseudomembranen, die häufig Blut enthalten und am Kolonepithel anhaften (24, 44).

Mikroskopisch ist die akute SD durch eine deutliche Hyperämie und ödematöse Veränderungen der Lamina propria gekennzeichnet. Weiterhin sind Hämorrhagien auffällig, resultierend aus Nekrosen und Erosionen des Epithels. Die Schleimhaut ist ödematisiert, die Mikrovilli erscheinen verkürzt und irregulär und die Zellkerne schrumpfen. Auch die Zellorganellen sind betroffen. So kommt es zu einer Schwellung der Mitochondrien und einer Ausdehnung des endoplasmatischen Retikulums (2, 24).

2.1.5 Therapie und Eradikation

Im Vordergrund tierärztlicher Maßnahmen steht bei klinisch manifesten Verlaufsformen die antibiotische Therapie. Die früher zur Behandlung der Dysenterie verwendeten Nitroimidazole, wie z. B. Ronidazol, sind bei lebensmittelliefernden Tieren nicht mehr zugelassen (37). Derzeit kommen zur Therapie der Erkrankung das Makrolidantibiotikum Tylosin, das den Makroliden aufgrund des Wirkungsmechanismus nahestehende Lincomycin und die Pleuromutiline Tiamulin und Valnemulin zur Anwendung (83). Gegenüber Tylosin und in geringerem Umfang auch Lincomycin hat sich jedoch in den vergangenen Jahren eine bemerkenswerte Antibiotikaresistenz herausgebildet (38, 83). Dies beschränkt die Verwendung dieser Substanzen, besonders des Tylosins, erheblich. Auch durch eine Erhöhung der Dosierung ist dieses Problem aufgrund des Resistenzmechanismus der Bakterien (Mutation im Bereich der Bindungsstelle des Tylosins am Ribosom) nicht zu umgehen (54). Die Wirksamkeit der Pleuromutiline ist nach wie vor zwar gut, jedoch hat sich anscheinend auch hier eine Abnahme der Empfindlichkeit der im Feld vorkommenden Stämme gegenüber diesen Substanzen ergeben (83). Die Applikation der Antibiotika erfolgt vorzugsweise über das Trinkwasser oder Futter. Schweine, die nicht genügend Futter oder Wasser aufnehmen, müssen parenteral therapiert werden. Die Tiere gesunden sehr rasch, jedoch sollte die Behandlungsdauer zum Zwecke der Eliminierung der Erreger 21 Tage nicht unterschreiten. Flankierende Maßnahmen sind eine effektive Kotbeseitigung und Schadnagerbekämpfung. Die frühzeitige medikamentelle Beeinflussung des

Infektionsverlaufs verhindert jedoch die Ausbildung einer Immunität. Die therapierten Schweine sind somit nach Ausscheidung des Antibiotikums voll empfänglich für eine Reinfektion (37).

Die Eradikation der SD scheint durch konsequente und ausreichend lange Anwendung wirksamer Chemotherapeutika, die u. U. alle Stufen der Schweineproduktion umfasst, möglich zu sein. Allerdings sind gleichzeitig flankierende hygienische Maßnahmen, wie z. B. die Reinigung und Desinfektion, regelmäßige Schadnagerbekämpfung und vor allem der Zukauf *B. hyodysenteriae*-freier Tiere notwendig (100, 111).

2.1.6 Versuche zur Vakzination gegen die Dysenterie

Aufgrund der großen ökonomischen Bedeutung der Dysenterie, vermehrter Antibiotikaresistenz der Erreger und der zunehmenden rechtlichen Beschränkungen bezüglich des Einsatzes von Antibiotika bei lebensmittelliefernden Tieren, bestehen große Anstrengungen zur Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes. Bereits 1974 wurde erstmals ein Versuch mit einem attenuierten Lebendimpfstoff durchgeführt, bei dem der erhoffte Erfolg jedoch ausblieb (43). In der weiteren Entwicklung rückten Vakzinen aus formalininaktivierten Bakteriensuspensionen in den Mittelpunkt des Interesses (14, 16, 21, 30, 79). Bei nahezu allen Vakzinationsversuchen wurde trotz Verwendung unterschiedlichster Impfschemata über eine deutliche Reduktion der Stärke und Dauer der klinischen Symptomatik sowie des Gewichtsverlustes berichtet. Lediglich einmal wurde in den USA bei dem „Challenge“ einer vakzinierten Gruppe von Schweinen eine deutlich schnellere und heftigere Entwicklung der Erkrankung beobachtet als in der Kontrollgruppe (79). Dazu ist allerdings anzumerken, dass der Impfstamm zum Serotyp 2 zählte, während der Challenge-Stamm dem Serotyp 1 angehörte. Einen Überblick über die in den Versuchen verwendeten Impf- und Challenge-Stämme gibt **Tabelle 1**.

Entscheidend für die Wirksamkeit dieser Vakzinen ist die Frage, inwieweit die im Feld vorhandenen Serotypen von *B. hyodysenteriae* mit dem oder den in der Vakzine enthaltenen Serotypen übereinstimmen. Bereits 1983 haben Joens et al. gezeigt, dass die Immunantwort nach einer Vakzination serotypspezifisch ist (51). Infektionen mit heterologen Stämmen können somit trotz Impfung zu den typischen Läsionen führen (51). Wegen dieser serologischen Diversität der *B. hyodysenteriae*-Stämme wird mittlerweile versucht, mithilfe molekularbiologischer Methoden Impfstoffe zu entwickeln, die eine serotypübergreifende Immunität induzieren können. Entscheidend für die Nutzung von Proteinen bei der Impfstoffherstellung sind weiterhin die Antigenität und Immunogenität und auch die serotypübergreifende Verbreitung des Antigens in der Brachyspirenpopulation. Im Westernblot können Antigene mit Antiseren detektiert werden, die zu verschiedenen

Zeitpunkten einer Infektion mit dem Erreger gewonnen werden. Es wurden im Immunoblot mit Rekonvaleszentenseren nicht nur serotypspezifische, sondern auch serogruppenübergreifende Banden nachgewiesen (27), sowie solche, die nahezu ausschließlich bei pathogenen, nicht aber bei apathogenen Stämmen vorkommen (22). Auf diese Weise wurde beispielsweise 1986 ein 16 kDa-Protein (SmpA = Serpulina membrane protein A = Bhlp16) der äußeren Membran entdeckt, welches nur mit dem Serum rekonvaleszenter, gegen Reinfektion geschützter Schweine detektierbar war (50). Kürzlich wurde (im Jahr 2004) in Australien die Verwendung des His6-BmpB-Proteins als Impfstoffkomponente sehr vielversprechend beurteilt (63). Bei BmpB (= Brachyspira membrane protein B = Bhlp29,7d) handelt es sich um ein Lipoprotein der äußeren Membran, dessen kodierendes Gen bei allen von dieser Arbeitsgruppe getesteten *B. hyodysenteriae*-Stämmen vorkam. Die Proteine der äußeren Membran gelten aus immunprophylaktischer Sicht als insgesamt sehr vielversprechend, da sie aufgrund ihrer exponierten Lage in der äußeren Membran der bakteriellen Zellwand u. U. für erste bedeutsame Schritte im Rahmen der Pathogenese verantwortlich sind.

2.1.7 Bakterielle Adhärenz an Epithelzellen und äußere Membranproteine von *Brachyspira hyodysenteriae*

In vitro Versuche weisen daraufhin, dass *B. hyodysenteriae* sehr wahrscheinlich in der Lage ist an verschiedene Epithelzellen zu adhären. Über den Mechanismus dieser Adhärenz und den hieran beteiligten Komponenten ist wenig bekannt. Versuche mit durch Hitze und Kälte abgetöteten Bakterien und Inhibierungsversuche mit Rekonvaleszentenseren legen jedoch nahe, dass dieser Prozess energieabhängig ist und aller Wahrscheinlichkeit nach durch antigene Strukturen (Protein, LPS) vermittelt wird (7, 62). Die Tatsache, dass dieser bedeutsame Schritt im Rahmen der Pathogenese der SD durch im Verlauf einer Infektion erworbene Antikörper verhindert werden kann (7), machen die an der Adhärenz beteiligten Antigene zu interessanten Objekten, z. B. für die Entwicklung einer Vakzine. Bei den in Frage kommenden bakteriellen Proteinen stehen zunächst, allein aufgrund ihrer exponierten Lage, äußere Membranproteine (OMPs) zur Diskussion. Leider liegen diesbezüglich nur wenige weitergehende Informationen vor, insbesondere über die biologische Bedeutung dieser Proteine. Im Hinblick auf ihre potentiell immunogene Wirkung wurden in den letzten Jahren mehrere OMPs von *B. hyodysenteriae* näher untersucht. Hierbei handelte es sich um Bhlp16 (SmpA), Bhlp17,6 (SmpB), Bhlp29,7a-d (BmpB, BlpGFEA) und Bhmp39a-h (VspA-H) (26).

Aufgrund der zunehmenden Fülle identifizierter Proteine, wurde im Jahr 2006 von einer Gruppe führender Brachyspirenforscher eine einheitliche Nomenklatur empfohlen, um die alten Bezeichnungen zu ersetzen (26). Bestehen soll der Name aus einer Abkürzung für die

B. sp. (Bh für *B. hyodysenteriae*), einem Kürzel für Membran- oder Lipoprotein (mp oder lp), der Masse in kDa und nötigenfalls zur weiteren Differenzierung ein Buchstabe aus dem lateinischen Alphabet. Das kodierende Gen erhält die gleiche Bezeichnung, allerdings klein und kursiv geschrieben. Im Folgenden werden die für die vorliegenden Untersuchungen bedeutsamen OMPs unter Verwendung der neuen Bezeichnungen (bisherige in Klammern) näher skizziert.

Bhlp16 und Bhlp17,6 (SmpA, SmpB)

Bei Untersuchungen von Proteinpräparationen der äußeren Membran von *B. hyodysenteriae* wurde ein immundominantes Protein, Bhlp16 (SmpA), nachgewiesen, das im Westernblot von Sera rekonvaleszenter, nicht aber von Sera akut an SD erkrankter Schweine erkannt wurde (50). Aufgrund der Tatsache, dass rekonvaleszente Tiere immun gegen eine neuerliche Erkrankung waren, stellten Joens und Marquez die Hypothese auf, dass Antikörper gegen dieses Protein wichtig für die Immunität der Schweine sein könnten (50). Das kodierende Gen wurde zu einem späteren Zeitpunkt identifiziert und sequenziert (108). Bhlp16 ist ein membranassoziiertes Lipoprotein und auf der Oberfläche der Zellwand lokalisiert (109). Die Expression dieses Proteins steht aller Wahrscheinlichkeit nach unter der Kontrolle äußerer Milieufaktoren mit hoher Expressionsrate in der initialen Phase der Infektion (89). Monoklonale Antikörper gegen Bhlp16 führten *in vitro* zur Agglutination von *B. hyodysenteriae* und zu einer Hemmung der Bakterienvermehrung (107). Über die mögliche biologische Bedeutung dieses Proteins ist nichts bekannt. Jedoch schien das Protein *in vivo* nicht exprimiert zu werden, was zu der Frage führte, ob es überhaupt für eine Subunit-Vakzine geeignet wäre. Allerdings erfolgte dieses Experiment erst an Isolaten aus der akuten Phase der Erkrankung (89). Es wäre also durchaus möglich, dass das Protein zu Beginn der Kolonisation exprimiert wurde, was damit übereinstimmen würde, dass es von Sera rekonvaleszenter Tiere erkannt wurde (50).

Kürzlich wurde ein weiteres OMP kodierendes Gen, *bhlp17,6* (*smpB*), identifiziert, das Sequenzhomologien zu *bhlp16* aufwies. Nach Untersuchung mehrerer Stämme verfügt *B. hyodysenteriae* entweder über *bhlp16* oder *bhlp17,6*, die beide anscheinend an gleicher Stelle auf dem Chromosom lokalisiert sind und in gleicher Häufigkeit auftreten (in jeweils 50 % der Stämme). Bedeutsam ist, dass beide exprimierten Proteine immunogen waren, aber keinerlei serologische Kreuzreaktivität aufwiesen (41). Somit müssten bei einer Verwendung der Proteine in einer Vakzine immer beide enthalten sein, um alle Stämme immunologisch zu erfassen. Die Bedeutung dieses Proteins bleibt ähnlich wie die des Bhlp16 jedoch spekulativ.

Bhmp39a-h (VspA-H)

Das mengenmäßig dominierende Protein in der äußeren Membran von *B. hyodysenteriae* ist das "variable surface protein" Bhmp39 (Vsp) (19). Interessanterweise kodiert *B. hyodysenteriae* für acht Bhmp39-Proteine (Bhmp39a bis -h bzw. VspA bis -H), die sich in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich sind. Die Gene dieser Proteine sind auf dem Chromosom des Erregers in zwei Clustern mit den Bezeichnungen *bhmp39abcd* (*vspABCD*) und *bhmp39efgh* (*vspEFGH*) angeordnet. Vermutlich stellt der *bhmp39e-h*-Cluster das Ergebnis einer Duplikation des *bhmp39a-d*- Clusters dar (74).

Nach Transkriptionsstudien und massenspektrometrischen Analysen wird jedoch von *B. hyodysenteriae* unter in vitro Bedingungen hauptsächlich *bhmp39f* (*vspF*) exprimiert, gefolgt von *bhmp39h* und *bhmp39d*. Lediglich Bhmp39f und Bhmp39h sind in der Membran von *B. hyodysenteriae* ausreichend präsent, um sie mittels Massenspektrometrie nachzuweisen. Im Gegensatz dazu, wird *bhmp39g* scheinbar nicht transkribiert. Es wird vermutet, dass alle acht Gene der zwei Genloki einzeln transkribiert werden können, wengleich der Regulationsmechanismus noch unbekannt ist (121).

Das ursprünglich im Westernblot mit Seren rekonvaleszenter Schweine entdeckte extrazytoplasmatische 39 kDa-Protein Bhmp39 (Vsp) wird von *bhmp39h* kodiert (18, 19, 74, 121). Die Existenz dieser acht paralogen Gene könnte Ausdruck für das Potential des Erregers zu einer antigenen Variation oder adaptiven Antwort auf Veränderungen des Milieus sein (12). Auch der Aufbau aus stark konservierten hydrophoben und hoch variablen hydrophilen Regionen lässt eine mögliche Rolle der Gene bei der Umgehung des Immunsystems vermuten (73).

Die biologische Bedeutung von Bhmp39 (Vsp) ist somit bislang nicht geklärt. Es ist lediglich bekannt, dass beim Schwein nach Infektion mit *B. hyodysenteriae* Antikörper gegen Bhmp39h nachweisbar sind (74).

Bhlp29,7d (BmpB)

Als potentiell Impfantigen wurde ein weiteres OMP mit der Bezeichnung Bhlp29,7d (BmpB) von *B. hyodysenteriae* beschrieben (67, 81). Das Lipoprotein ist hoch konserviert und hat eine Ähnlichkeit von 33,9-39,9 % mit dem D-Methionin bindenden Lipoprotein MetQ anderer Bakterienspezies. Dieses Protein ist Teil eines D-Methionin-Aufnahmesystems und für die spezifische Bindung des aufzunehmenden Substrates verantwortlich. Es wird vermutet, dass die Familie der „methionine uptake transporter“ (MUT) eine wichtige Rolle bei der Virulenz mancher Erreger spielen könnte (64). Weiterhin ist es immunogen und wird anscheinend in vivo exprimiert (68). Umfangreiche Untersuchungen zur Verteilung und Sequenzidentität des *bhlp29,7d* in *B. hyodysenteriae*-Stämmen und Stämmen anderer

B. sp.(*B. pilosicoli*, *B. innocens*, *B. intermedia*, *B. murdochii*, *B. canis*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*) zeigten, dass das kodierende Gen in allen untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämmen und ansonsten lediglich in *B. innocens* B256, nicht jedoch in den übrigen untersuchten *B. innocens*-Stämmen vorkam (64).

Es weist eine 99,6%ige Sequenzhomologie zu einem Gen auf, dessen Produkt verwirrenderweise als BlpA bezeichnet wurde (11), aber als identisch mit BmpB angesehen wird (63). Das BlpA-kodierende Gen wurde auf einem Locus mit vier paralogen Genen (*bhlp29,7abcd* bzw. *blpGFEA*) entdeckt, deren Gen-Produkte Homologieraten zwischen 61-80 % in der Aminosäuresequenz aufwiesen (11). Transkriptionsstudien sowie Westernblotanalysen mit rekombinanten Bhlp29,7a-d und Rekonvaleszentenseren vom Schwein weisen darauf hin, dass unter in vivo und in vitro Bedingungen lediglich Bhlp29,7d exprimiert wird (11). *B. hyodysenteriae* verfügt also für Bhlp29,7 über vier paraloge Gene (*bhlp29,7abcd*), von denen nach bisherigen Erkenntnissen nur eines exprimiert wird (Bhlp29,7d), ähnlich wie bei Bhmp39a-h (64).

Auch natives Protein wird durch Antiseren von Mäusen und Schweinen, die mit rekombinantem Bhlp29,7d (BmpB) immunisiert wurden, entdeckt (68). Mit rekombinantem Bhlp29,7d von *B. hyodysenteriae* (Stamm WA1) geimpfte und mit Stamm B/Q02 zwei Wochen nach Impfung belastete Schweine, wiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine um ~50 % niedrigere Inzidenz an Dysenterie auf (63). Der Impfstamm repräsentiert Serotyp 2 (Serogruppe B). Über die Serotypzugehörigkeit des Stammes für die Belastung liegen dagegen keine Informationen vor. Die Frage nach einer serotypübergreifenden Schutzwirkung bleibt damit offen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Puffer sind im Anhang aufgelistet.

3.1.2 Bakterienstämme

Sowohl für die Adhäsions- als auch für die Klonierungsversuche wurde der *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 verwendet. Weiterhin gingen insgesamt acht weitere Referenzstämme (**Tabelle 2**) in die Untersuchungen ein. Diese werden im Folgenden als Serotyp-Referenzstämme oder Serotypstämme bezeichnet. Für die Herstellung der GVOs kam der *E. coli*-Stamm BLR(DE3) zum Einsatz (**Tabelle 3**).

Lagerung der Brachyspiren. Die dauerhafte Lagerung der Brachyspiren-Isolate erfolgte suspendiert in FKS (Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in flüssigem Stickstoff sowie in BHIF^{CVSSR}-Medium bei -70 °C.

Lagerung der transformierten *E. coli* BLR(DE3). Nach Standardanzucht der Klonkolonien in ampicillinhaltigem (Fa. Biomol, Hamburg bzw. Fa. Roth, Karlsruhe) LB-Medium (50 µg/ml) wurden je 500 µl Bakteriensuspension in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß abgefüllt. Pro Kolonie wurden zwei Reaktionsgefäße angelegt. Nach der Zugabe von 500 µl ampicillinhaltigem LB-Medium mit Zusatz von 20 % Glycerin (Fa. Merck Schuchardt, Hohenbrunn), wurden die Bakterien sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

3.1.3 Gentechnisch veränderte Mikroorganismen (GVOs)

Bei den gentechnisch veränderten Mikroorganismen handelt es sich um Abkömmlinge des *E. coli*-K12-Derivats BLR(DE3) (**Tabelle 3**), in deren Genom mit Hilfe von rekombinanten Plasmiden DNS-Fragmente des *B. hyodysenteriae* Stammes B204 eingefügt wurden (**Tabelle 4**). Die Lagerung der GVOs erfolgte bei -70 °C in LB-Medium incl. 20 % Glycerin.

Tabelle 2: Verwendete *Brachyspira hyodysenteriae*-Referenzstämme

Stamm	Serotyp	Serogruppe	Herkunft
B78	1	A	ISU
B204	2	B	IM
B169	3	C	ISU
A1	4	D	ISU
B8044	5/2	k.A.	ISU
B6933	6/1	k.A.	ISU
ACK300/8	7/2	k.A.	ISU
Vic2	k.A.	H	MU
NSW1	k.A.	J	MU

Erläuterungen: **k. A.** = keine Angaben in der Literatur; **ISU** = Prof. M.J. Wannemuehler, Veterinary Medical Research Institute Iowa State University, Ames, USA, **MU** = Prof. D.J. Hampson, School of Veterinary Studies, Murdoch University, Murdoch Western Australia, **IM** = ursprünglich Dr. D.L. Harris, Veterinary Medical Research Institute Iowa State University, Ames, USA, freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. G. Amtsberg, Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	relevante Eigenschaften	Herkunft
BLR (DE3)	K12-Derivat, F ⁻ ompT hsdSB (r _B m _B ⁻) gal dcm Δ(srl-recA) 306::Tn10(DE3)	N
MR0	BLR(DE3) mit Plasmid pASK-IBA3plus	diese Arbeit
MR1	BLR(DE3)/pHIT-7-01, K12-Derivat mit pASK-IBA3plus:: <i>bhlp29,7d</i>	diese Arbeit
MR2	BLR(DE3)/pHIT-7-02, K12-Derivat mit pASK-IBA3plus:: <i>bhmp39f</i>	diese Arbeit
MR3	BLR(DE3)/pHIT-7-03, K12-Derivat mit pASK-IBA3plus:: <i>bhmp39h</i>	diese Arbeit
MR4	BLR(DE3)/pHIT-7-04, K12-Derivat mit pASK-IBA3plus:: <i>bhlp16</i>	diese Arbeit

Erläuterungen: **N** = Fa. Novagen durch Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.1.4 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten bzw. verwendeten Plasmide sind in **Tabelle 4** aufgeführt. Beispielhaft für die vier rekombinanten Plasmide ist die schematische Genkarte von pHIT-7-01 in **Abbildung 1** dargestellt.

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	relevante Eigenschaften	Herkunft
pASK-IBA3plus	3247 bp, f1 origin, MCS I, Amp ^r , <i>tetA</i> -Promotor, <i>tetA</i> -Repressor, <i>t_{lpp}</i> -Lipoprotein Transkriptions-terminator, C-terminale Strep-Tag-Kodierungssequenz	Fa. IBA GmbH, Göttingen
pHIT-7-01	pASK-IBA3plus:: <i>bhlp29,7d</i> , 3982 bp, <i>Bsal</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pHIT-7-02	pASK-IBA3plus:: <i>bhmp39f</i> , 4339 bp, <i>Bsal</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pHIT-7-03	pASK-IBA3plus:: <i>bhmp39h</i> , 4339 bp, <i>Bsal</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pHIT-7-04	pASK-IBA3plus:: <i>bhlp16</i> , 3646 bp, <i>Bsal</i> , Amp ^r	diese Arbeit

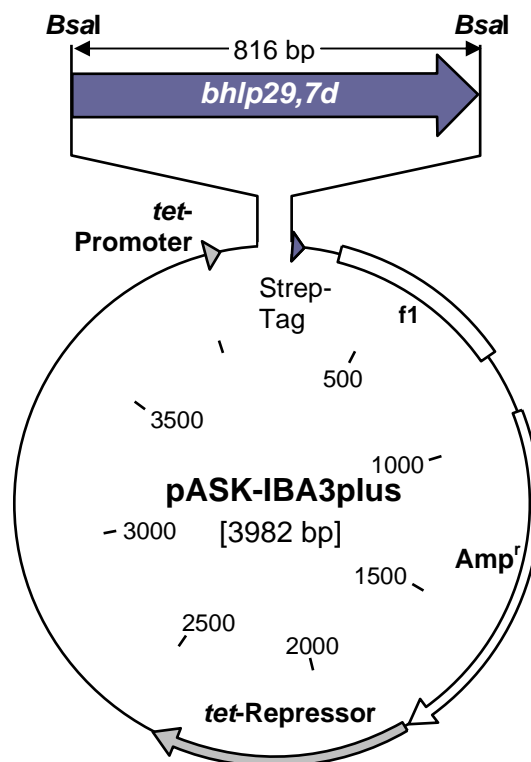


Abbildung 1: Genkarte des rekombinanten Plasmids pHIT-7-01

Erläuterungen: Amp^r = Ampicillinresistenz-Gen, f1 = f1-origin (Replikationsursprung), Strep-Tag = Streptavidin-bindender Marker

3.1.5 Zelllinien

Insgesamt wurden drei Darmepithelzelllinien in die Untersuchungen einbezogen, die in **Tabelle 5** aufgelistet sind.

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

Name	Ursprung	Herkunft
HRT-18	Kolon, Adenokarzinom, Mensch	Prof. Storz, Louisiana State University, USA
IEC-18	Ileum, Ratte	ATCC (ATCC CRL 1589)
IPEC-J2	Jejunum, Ferkel	Dr. P. Schierack, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin

Erläuterungen: ATCC = American Type Culture Collection

3.1.6 Tiere

Zur Herstellung der benötigten Immunseren wurden fünf weibliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer eingesetzt (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln). Weitere Angaben zur Haltung und Fütterung sind **Kapitel 3.7** zu entnehmen.

3.2 Bakteriologische Methoden

3.2.1 Anzucht von Bakterien

Standardanzucht von Brachyspiren. Die Anzucht der Brachyspiren erfolgte in BHIF^{CVSSR}-Medium. Jeweils ein Kryotube tiefgefrorene Brachyspiresuspension der zuvor hergestellten Charge (siehe unten) wurde mittels Handwärme aufgetaut, unter sterilen Bedingungen vorverdünnt (1:30) und anschließend im Verhältnis 1:49 [v/v] in das Anzuchtmedium überführt. Die Inkubation fand für drei Tage unter anaeroben Bedingungen (Anaerobierbox AnaeroPack Rectangular, Fa. Biomerieux, Wien, Österreich; AnaeroGen, Fa. Oxoid, Hampshire, England) bei 37 °C unter ständiger Bewegung auf dem Schüttler (96 U/min) statt. Zur Kontrolle der anaeroben Bedingungen wurde ein Sauerstoffindikator (Anaerotest, Fa. Merck, Darmstadt) mitgeführt.

Anzucht der Brachyspiren auf TSA^{CVSSR}-Platten mit Schafblut. Vor der Chargenherstellung und zur Anzucht von Isolaten aus Kotproben wurden die Brachyspiren auf TSA^{CVSSR}-Platten (mit Schafblut) angezüchtet. Hier zeigte *B. hyodysenteriae* eine deutliche Hämolyse. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen (Anaerobiertopf Anaerocult, Fa. Merck, Darmstadt, AnaeroGen, Fa. Oxoid, Hampshire, England) bei 37 °C über fünf bis zehn Tage. Bei sichtbarer Kontamination wurden die Isolate unter lichtmikroskopischer Kontrolle passagiert, bis mikroskopisch keine Kontamination mehr erkennbar war.

Chargenherstellung der Brachyspiren. Zur Herstellung einer Bakteriencharge wurde der Stamm B204 zunächst auf TSA^{CVSSR}-Agar (mit Schafblut) vermehrt. Nach dem Reinheitsnachweis im Dunkelfeldmikroskop erfolgte die Abschwemmung der Brachyspiren von der Platte mit ca. 3 ml BHIF^{CVSSR} unter Reinraumbedingungen. Nach der Herstellung einer log10-Verdünnungsreihe über acht Stufen wurde 1 ml der Verdünnungsstufe 10⁴ in 49 ml BHIF^{CVSSR} überführt und unter ständiger Bewegung (Schüttler, 96 U/min) inkubiert (anaerob, 37 °C, 3-4 d). Zur dauerhaften Lagerung bei -70 °C erfolgte die Abfüllung von 1 ml-Aliquots. Die Keimzahlbestimmung wurde gemäß **Kapitel 3.2.2** durchgeführt. Vor der Verwendung der Charge wurde eine Reinheitskontrolle durchgeführt (**Kapitel 3.2.3**).

Standardanzucht von *E. coli*. Der *E. coli*-Stamm BLR(DE3) wurde unter aeroben Bedingungen bei 37 °C auf LB-Agar bzw. in LB-Medium (dann als Schüttelkultur mit 180 U/min) angezüchtet. Die Inkubationszeit lag bei 8 bis 18 Stunden. Zur Selektion und Stabilisierung von transformierten *E. coli*-Zellen enthielt das Medium als Zusatz Ampicillin (Fa. Biomol, Hamburg bzw. Fa. Roth, Karlsruhe) in einer Konzentration von 50 µg/ml.

Induktion transformierter *E. coli*-Zellen. Rekombinante *E. coli*-Stämme wurden im Standardverfahren angezüchtet. Nach Verdünnung der ersten Vorkultur mit frischem ampicillinhaltigem LB-Medium (1:100 [v/v]) folgte die Inkubation über Nacht bei 30 °C. Im Anschluss wurde die erste Vorkultur wiederum mit frischem ampicillinhaltigen LB-Medium verdünnt (1:20 [v/v]) und bis zur gewünschten OD₅₅₀ (Photometer DU-640, Beckman Instruments, München) bei 37 °C inkubiert. Nach Induktion der Proteinexpression mit AHT (Fa. IBA, Göttingen) folgte nochmals eine Inkubation der Kultur bei 30 °C (**Tabelle 6**). Schließlich wurden die Bakterienzellen nach neuerlicher OD₅₅₀-Messung abzentrifugiert (4500 x g, 4 °C, 5 min) und das Pellet weiterverarbeitet (**Kapitel 3.4.3**).

Tabelle 6: Parameter für die Induktion transformierter *E. coli*-Zellen

Stamm	gewünschte OD ₅₅₀	eingesetzte AHT-Konzentration	Inkubationszeit nach Induktion
MR0	0,5-0,6	0,2 µg/ml	16-18 h
MR1	0,5-0,6	0,2 µg/ml	16-18 h
MR2	1,9-2,1	0,05 µg/ml	1 h
MR3	1,9-2,1	0,05 µg/ml	1 h
MR4	0,5-0,6	0,2 µg/ml	16-18 h

Erläuterungen: OD₅₅₀ = optische Dichte bei 550 nm, AHT = Anhydrotetrazyklin

3.2.2 Keimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde nach jeder Anzucht eine Titration mit anschließender Auswertung nach Spaerman und Kärber (53, 95) durchgeführt. Dafür wurde eine log 10-Verdünnungsreihe über acht Stufen hergestellt. Je Verdünnungsstufe wurden

vier 10 µl-Tropfen auf eine TSA^{CVSSR}-Schafblutplatte aufgebracht. Nach sieben Tagen Inkubation (anaerob, 37 °C) erfolgte die Auswertung makroskopisch anhand der Hämolyseplaques. Die je Verdünnungsstufe entstandenen Hämolyseplaques wurden protokolliert und hieraus der Titer der Wachstum-bildenden Einheiten 50 je ml (WbE₅₀/ml) geschätzt.

3.2.3 Reinheitskontrolle

Brachyspirensuspension. Jede Brachyspirencharge wurde auf Kontaminationsfreiheit geprüft. Hierzu wurde ein Aliquot aufgetaut und für drei Tage aerob und anaerob bebrütet. Als Kulturmedien fanden eine Schädler-ohne Platte, eine Blutagar- und Gassnerplatte sowie die Serumbouillon Verwendung. Bei Ausbleiben von makroskopisch erkennbarem Wachstum von Fremdkleimen wurde die Charge als kontaminationsfrei erklärt und zur Verwendung freigegeben.

Impfantigene. Die Impfantigene wurden durch Kultivierung auf Blutagar- und Gassnerplatten sowie in Serumbouillon bakteriologisch überprüft. Die Inkubationszeit der Platten betrug vier, der Serumbouillon 12 Tage (aerob, 37 °C).

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Präparation von DNS aus Bakterienkulturen

Plasmid – DNS. Die Plasmidpräparation aus zuvor transformierten *E. coli*-Zellen (**Kapitel 3.3.7**) wurde unter Verwendung des „QIAGEN Plasmid Midi-Kit (25)“ (Fa. Qiagen, Hilden) entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt und der Erfolg mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender DNS-Bestimmung überprüft.

3.3.2 DNS-Bestimmung

Die Konzentration und Reinheit der für die Ligations- und Transformationsansätze gewonnenen DNS wurde über Messungen im Nano Drop 1000 Spektrophotometer (Nano Drop Technologies, Wilmington, USA) ermittelt.

3.3.3 Restriktion von DNS

Restriktion. Vor der Ligation von Plasmid- mit Insert-DNS wurde bei beiden Komponenten eine Restriktion mit *Bsal* (Fa. New England Biolabs, Ipswich, England) im Einzelverdau durchgeführt. Die Menge des eingesetzten Enzyms betrug bei Restriktion von Plasmid-DNS 10 U/µg DNS, bei PCR-Amplifikaten (Inserts) 15 U/µg DNS. Der Puffer 10 x NEBuffer 3 (Fa. New England Biolabs, Ipswich, England) machte 1/10 des Gesamtvolumens eines Ansatzes

aus – als Füllmittel wurde A. dest verwendet (Beispiel: Gesamtvolumen 50 µl: 23 µl Insert (10 µg), 15 µl *Bsal* (150 U), 5 µl 10 x NEBuffer 3, 7 µl A. dest). Für die Reaktion wurden die Ansätze für 1 h bei 50 °C inkubiert. Die Analyse vor und nach Restriktion erfolgte in der Agarosegelelektrophorese.

Reinigung von DNS-Präparationen. Alle gewünschten DNS-Fragmente wurden nach der Restriktion mit dem „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (150)“ (Fa. Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers mit einigen Modifikationen. So wurden die Ansätze zum Lösen der Agarose (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) 20 min bei 50 °C inkubiert und die Eluierung der DNS fand unabhängig von der Fragmentgröße durch Inkubation bei 50 °C für 5 min statt.

3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Herstellung der verwendeten Inserts und Überprüfung transformierter Zellen auf ihren Plasmid- und Insertgehalt wurde die PCR eingesetzt. Stets kam die Platinum *Taq* DNA Polymerase (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) zum Einsatz. Mitgeführt wurde zudem eine Negativkontrolle (mit A. dest).

Insert-PCRs. Ein 50 µl-Reaktionsansatz enthielt 2 U Platinum *Taq* DNA Polymerase, je 20 pmol der entsprechenden Klonierungsprimer (**Tabelle 8**), 160 µM je Nukleotid (Fa. PAN Systems, Aidenbach), 1 x PCR-Puffer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe), 1,5 mM MgCl₂ (50 mM, Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und 2 µl Template-DNS. Die Bedingungen zur Amplifikation waren dann wie folgt: Bei einer Heizdeckeltemperatur von 110 °C wurde ein initialer Denaturierungsschritt (60 s, 95 °C), gefolgt von 35 Zyklen mit 40 s Denaturierung bei 94 °C, 60 s Anlagerung bei einer PCR-spezifischen Temperatur und 60 s (***bhlp16-*** und ***bhlp29,7d-PCR***) bzw. 90 s (***bhmp39f-*** und ***bhmp39h-PCR***) Verlängerung bei 72 °C, sowie einer finalen Verlängerungsphase (10 min, 72 °C) durchgeführt. Abschließend wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4 °C gekühlt. Die PCR-spezifischen Anlagerungstemperaturen betragen bei der ***bhlp16-PCR*** 64 °C, der ***bhlp29,7d-PCR*** und der ***bhmp39f-PCR*** 68 °C, sowie bei der ***bhmp39h-PCR*** 70 °C.

Kontroll-PCRs. Für die Transformationskontrolle wurden von jeder zu überprüfenden Kolonie zwei PCRs durchgeführt. Dabei wurden die entsprechende Insert-PCR und eine zweite **Vektor-PCR** mit externen Primern (Seq-f und Seq-r) durchgeführt. Neben den Proben wurden in beiden PCRs jeweils eine Negativkontrolle (mit A. dest) und eine Positivkontrolle mitgeführt. Letztere war bei den Insert-PCRs das geschnittene und aufgereinigte Insert, bei der Vektor-PCR der ungeschnittene Vektor pASK-IBA3plus. Reaktionsansatz und Amplifikation der Vektor-PCR war dabei identisch mit den Insert-PCRs, außer dass die Primer je 10 pmol eingesetzt wurden und die Anlagerungstemperatur 50 °C betrug.

Aufreinigung von PCR-Produkten. Für die Aufreinigung von PCR-Produkten kam der „QIAquick PCR Purification Kit (50)“ (Fa. Qiagen, Hilden) zum Einsatz. Das Protokoll des Herstellers (für die Verwendung einer Mikrozentrifuge) wurde bis auf eine Verlängerung der Elutionszeit bei Schritt 9 von 1 min auf 5 min vor der Zentrifugation eingehalten.

3.3.5 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) hergestellt mit Ausnahme der Seq-f und Seq-r für den pASK-IBA3plus-Vektor, die von der Firma IBA GmbH (Göttingen) bezogen wurden (**Tabelle 8**). Alle Primer der Firma MWG wurden als Stocklösungen (100 µM) bei -70 °C und als Gebrauchslösungen (20 µM) bei -20 °C gelagert, die Sequenzierungsprimer (10 µM) nur bei -20 °C. Die Größe der jeweiligen PCR-Amplifikate ist **Tabelle 7** zu entnehmen.

Tabelle 7: Größe der PCR-Amplifikate

Amplifikat	Amplifikatgröße in [bp]		
	PCR mit internen Primern		PCR mit umgreifen- den Primern
	vor Restriktion	nach Restriktion	
<i>bhlp16</i>	509	479	688
<i>bhlp29,7d</i>	845	815	1024
<i>bhmp39f</i>	1202	1172	1381
<i>bhmp39h</i>	1202	1172	1381
leerer Vektor pASK- IBA3plus			289

Erläuterungen: bp = Basenpaare

Tabelle 8: Verwendete Primer

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3)'	Gen	Organismus	Position ¹⁾	Sequenz-Nr.	Typ ³⁾
bhlp16-f	GTGGCAGGTCCTCAAAATGAACAAAAAATTTTTCACAC	<i>bhlp16</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> (<i>B. hyo</i>), Stamm P18A	119-140	X68401	K
bhlp16-r	ATAGTAGGTCCTCAGCGCTAGCTCCCAATTTTCTTTAG			<u>576-595</u>		
bhlp29,7d-f	ATGGTAGGTCCTCAAAATGAAAAAATTTTATTTATTTGGTATCATCAGC	<i>bhlp29,7d</i>	<i>B. hyo</i> , Stamm B204	1-31	AY706761	K
bhlp29,7d-r	ATATTAGGTCCTCAGCGCTTTTCCAAGTAGGAAGATAAGAACCTAAG			<u>786-813</u>		
bhmp39f-f	ATGGTAGGTCCTCAAAATGAAAAAAGTTTTATTGACAGCTATGGC	<i>bhmp39f</i>	<i>B. hyo</i> , Stamm B204	2085-2113	AY027775	K
bhmp39f-r	ATGGTAGGTCCTCAGCGCTATTGAAAGCAGGTAATAACCAAGTTA			<u>3229-3254</u>		
bhmp39h-f	ATGGTAGGTCCTCAAAATGAAAAAAGTTTTATTGACAGCTATGGC	<i>bhmp39h</i>	<i>B. hyo</i> , Stamm B204	5077-5105	AY027775	K
bhmp39h-r	ATTATAGGTCCTCAGCGCTTTTGAGCACCGCCTAAAGCAG			<u>6227-6246</u>		
bhlp29,7d-1	GAAATAGTAGAAAAATGGATGC	<i>bhlp29,7d</i>	<i>B. hyo</i> , Stamm B204	523-543	AY706761	S
bhlp29,7d-2	TCTCCGTCATTCAAAGCCTG	<i>bhlp29,7d</i>	<i>B. hyo</i> , Stamm B204	<u>211-231</u>	AY706761	S
bhmp39-1	CAAAAACCTAATGACTGAG	<i>bhmp39f/h</i>	<i>B. hyo</i> , Stamm B204	<u>610-628</u>	AY027775	S
bhmp39-2	ACTATCAATCCTTTTCATC	<i>bhmp39f/h</i>	<i>B. hyo</i> , Stamm B204	669-687	AY027775	S
bhmp39-3	ATAGCATTTGAAAAGCACTCT	<i>bhmp39f/h</i>	<i>B. hyo</i> , Stamm B204	<u>522-540</u>	AY027775	S
Seq-f	GAGTTATTTTACCACCTCCCT	MCS ⁴⁾	Vektor pASK-IBA3plus	57-76		S
Seq-r	CGCAGTAGCGGTAAACG	MCS ⁴⁾	Vektor pASK-IBA3plus	<u>329-345</u>		S

Erläuterungen: **bp** = Basenpaare, **1)** = Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der NCBI-Datenbank, die Positionen der Gegenstrangprimer sind unterstrichen, **3)** = Einsatz der Primer bei **K** = Klonierung, **S** = Sequenzierung, **4)** **MCS** = "multiple cloning site" des Vektors pASK-IBA3plus

3.3.6 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden horizontale Flachbettgele mit 1 – 2 % Agarose (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) und 1 x TAE als Elektrophoresepuffer eingesetzt. Der Probenauftrag fand nach der Mischung der Einzelproben mit Ladepuffer im Verhältnis 1:5 [v/v] statt. Zudem wurde ein Molekularmassenstandard in Loading Dye-DNS Ladder Gebrauchsverdünnung mitgeführt (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Fa. Fermentas, St. Leon Roth). Für die Auftrennung der Proben wurde eine Spannung von ca. 10 V pro cm Elektrodenabstand für 40 bis 120 min angelegt. Die Visualisierung und Fotodokumentation erfolgte mittels Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. RH (Typ RH-3) unter UV-Beleuchtung nach Zusatz von Ethidiumbromid (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg). Bei der Untersuchung linearer DNS wurde Ethidiumbromid direkt der Agarose zugesetzt (0,02 µg/ml), während zirkuläre DNS nachträglich im Ethidiumbromid-Bad (2 mg/ml) angefärbt wurde.

3.3.7 DNS-Klonierung

Herstellung kompetenter Zellen. Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde das Protokoll von Hanahan (31) in modifizierter Form verwendet. Nach Standardanzucht von BLR(DE3)-Zellen in LB-Medium wurde die Kultur im Verhältnis 1:100 [v/v] mit frischem LB-Medium verdünnt, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ (Photometer DU-640, Beckman Instruments, München) von 0,4 bis 0,5 inkubiert (37 °C, 180 U/min) und dann auf Eis gekühlt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (1620 x g, 4 °C, 5 min) und in eiskaltem TFB1-Puffer (1/2 des Ausgangsvolumens) resuspendiert. Nach Inkubation (auf Eis, 90 min) folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (1620 x g, 4 °C, 5 min) mit anschließender Resuspendierung des Pellets in TFB2-Puffer (1/15 des Ausgangsvolumens). Diese Suspension wurde à 200 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70 °C.

Ligation. Die Ligation der geschnittenen, gelaufgereinigten Produkte (Vektor und Insert) wurde in Ligationsansätzen mit 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Sie enthielten 1 x Ligationspuffer (Fa. Fermentas, St. Leon-Roth), 1 U T4-Ligase (Fa. Fermentas, St. Leon Roth), 100 ng Vektor-DNS (Fa. IBA, Göttingen, Kat-Nr. 2-1402-000) sowie Insert-DNS im molaren Verhältnis von 1:3, 1:7 oder 1:11. Je Ligation wurden folglich drei Ligationsansätze à 20 µl pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 4 °C.

Transformation. Zur Transformation wurden die kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 bzw. 15 µl des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzepuls von 90 s bei 42 °C wurde die Zellsuspension erneut für 2 min auf Eis

gelagert. Danach wurde sie mit 4 Vol LB-Medium versetzt und für 90 min bei 37 °C vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten (50 µg/ml) ausplattiert und für 16 h bei 37 °C aerob inkubiert.

3.3.8 DNS-Sequenzierung

Als Matrize für die Sequenzierungsreaktion wurden ausschließlich aufgereinigte PCR-Amplifikate verwendet, die unter Nutzung der Sequenzierungsprimer hergestellt wurden (**Kapitel 3.3.4**). Pro Sequenzierungsansatz wurden 70 bis 250 ng DNA und 10 pmol Primer eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 6 µl mit A. dest aufgefüllt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GENterprise (Mainz) durchgeführt.

3.4 Proteinanalytische Methoden

3.4.1 Bestimmung der gewonnenen Proteinkonzentration

Colorimetrisch. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde bei den Proteinen rBhlp29,7d und rBhlp16 der „BCA™ Protein Assay Kit“ (Fa. Pierce, Bonn) gemäß den Anweisungen des Herstellers herangezogen. Die im Elutionspuffer vorliegenden Proteine mussten zuvor mittels der Zeba™ Desalt Spin Columns (Fa. Pierce, Bonn) in PBS (1 x, sterilfiltriert) umgepuffert werden.

Densitometrisch. Die Konzentration der Proteine rBhmp39f und rBhmp39h wurde anhand der Bandenstärke im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel geschätzt. Als Standard für den Vergleich diente eine im selben Gel aufgetragene log₂-Verdünnungsreihe von Albumin (Standardalbuminreihe des BCA-Kits, Fa. Pierce, Bonn).

3.4.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels vertikaler SDS-PAGE nach Lämmli (65). Die Proben wurden mit der äquivalenten Menge Lämmli-Puffer versetzt und zur Denaturierung für 5 min im Wasserbad abgekocht. Anschließend wurden die Proteine in einem 1 mm dicken, 5 %-igen Polyacrylamidsammegel und einem 12,5 %-igen vertikalen Polyacrylamidtrenngel über eine effektive Trennstrecke von 5,5 cm bei 45 Volt / Gel über 2 Stunden aufgetrennt (Vertikalelektrophoresekammer Modell Minigel, Fa. Biometra, Göttingen). Zur Bestimmung der molaren Masse der Proteine wurden die Marker SeeBlue® Plus2 oder Novex® Sharp Protein Standard (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) mitgeführt.

Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch mindestens zweistündiges Einlegen des Gels in Coomassie-Brilliantblau-G250-Färbelösung (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg). Nach dem Entfärben mithilfe einer 45 %-igen Coomassie-Entfärbelösung für etwa 30 min und einer

anschließend eingesetzten 5 %igen Coomassie-Entfärbelösung über Nacht, wurde die Reaktion durch Entfernung des Entfärbers und Zugabe von A. dest. abgebrochen. Die so behandelten Gele konnten mithilfe eines Scanners (CanoScan Lide 600F, Fa. Canon Deutschland, Krefeld) elektronisch dokumentiert und schlussendlich im Geltrockner (Gel dryer Model 543, Fa. Biorad, München) unter Vakuum getrocknet werden (80 °C, 2 h).

3.4.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Das nach Induktion der transformierten *E. coli* gewonnene Zellpellet (**Kapitel 3.2.1**) wurde zunächst in 25 ml Strep-Tactin Washing Buffer (1 x Buffer W, Fa. IBA, Göttingen) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier Cell Disruptor B15, Fa. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd): Stufe 4, Dauerbetrieb, 3 Intervalle: 7 x 20 s-7 x 30 s-7 x 20 s unter stetiger Eiskühlung, jeweils 20 s Pause, zwischen den Intervallen je 5 min Pause. Nach Zentrifugation (13000 x g, 4 °C, 15 min) wurde der Überstand gewonnen und abzentrifugiert (13000 x g, 4 °C, 10 min). Letztlich wurde der Überstand auf 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt und neuerlich zweimal zentrifugiert (14000 x g, RT, 5 min). Falls nötig fand die Lagerung des Überstandes bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C statt.

Zur Aufreinigung der Strep-Tag fusionierten Proteine kamen „Gravity flow Strep-Tactin Superflow“-Säulen (Fa. IBA, Göttingen) unter Einhaltung des firmeneigenen Protokolls zum Einsatz. Die so gewonnenen Eluate wurden dann in einer SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt analysiert (**Kapitel 3.4.2**). Angaben zu den einzelnen Proteinen sind **Tabelle 9** zu entnehmen. Die Säulen wurden entsprechend der Firmenanweisung regeneriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 9: Erwartete Größe der rekombinanten Proteine

Protein	Zahl der Aminosäuren			Größe in [kDa]	
	gesamt	davon Signalsequenz	davon Strep-Tag	ohne Strep-Tag	mit Strep-Tag
rBhlp29,7d	281	21	10	30	31
rBhmp39f	400	21	10	39	40
rBhmp39h	400	21	10	39	40
rBhlp16	169	21	10	16	17

3.5 Serologische Methoden

3.5.1 Konjugate

Die in dieser Arbeit verwendeten Konjugate, sowie ihre Gebrauchsverdünnungen sind in **Tabelle 10** aufgeführt.

Tabelle 10: Verwendete Konjugate

Konjugat	Gebrauchsverdünnung	Hersteller
ECL™ Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey)	1:1000	Fa. Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, England Katalog-Nummer NA934V
Strep-Tactin HRP conjugate	1:4000	Fa. IBA, Göttingen Katalog-Nummer 2-1502-001
Cy2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Swine IgG (H+L)	1:100	Fa. Dianova, Hamburg Katalog-Nummer 114-225-003

3.5.2 Westernblot / Immunoblot

Westernblot. Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (**Kapitel 3.4.2**) wurden mittels Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen. Dazu wurde nach dreißigminütiger Vorinkubation der auf Gelgröße zugeschnittenen Nitrocellulosemembran in 1 x PBS und Aquilibrierung des SDS-PAGE-Gels in Anodenpuffer II die Elektroblokkammer (Modell BF-M, Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) möglichst luftblasenfrei folgendermaßen bestückt: sechs in Anodenpuffer I eingelegte Filterpapiere (Fa. MAGV, Rabenau-Londorf), drei mit Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran, das SDS-PAGE-Gel und letztlich neun in Kathodenpuffer eingelegte Filterpapiere. Nach Schließung der Kammer folgte der Proteintransfer bei konstanten 0,8 mA/cm² Nitrocellulosemembran (RT, 90-100 min). Im Anschluss wurde das Gel zum Nachweis des vollständigen Transfers der Proteine in Coomassie-Brilliantblau-G250-Färbelösung gefärbt und die Nitrocellulosemembran über Nacht in 1 x PBS (4 °C) eingelegt.

Am nächsten Morgen fand zunächst eine Inkubation der Membran in Peptonblockpuffer (Fa. Roche Diagnostics, Penzberg, 1:10 in A. dest. verdünnt) bei RT für 1 h statt, gefolgt von drei Waschschritten mit 1 x PBS-Tween (20 ml, RT, 5 min). Daraufhin wurde die Membran in 20 ml 1 x PBS-Tween, versetzt mit 5 µl Strep-Tactin HRP Konjugat (Fa. IBA, Göttingen), inkubiert (RT, 1 h). Nach zwei Waschschritten mit 1 x PBS-Tween (20 ml, RT, 1 min) und zweien mit 1 x PBS (20 ml, RT, 1 min) wurden die Proteinbanden durch Zugabe von Substratlösung (4 ml Chloronaphtol-Methanol, 6 ml PBS, 10 µl 30 %iges H₂O₂) angefärbt.

Diese Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit A. dest. beendet. Die Aufbewahrung der Westernblots bis zur Dokumentation erfolgte in A. dest. bei 4 °C.

Immunoblot. Die Charakterisierung der tierexperimentell gewonnenen Antiseren fand im Immunoblot statt. Die Durchführung entsprach weitestgehend der im Kapitel „Westernblot“ beschriebenen Methode. Allerdings wurde in diesem Fall als erster Antikörper das zu testende Kaninchenantiserum in einer Verdünnung von 1:500 [v/v] eingesetzt und nach einstündiger Inkubationszeit mit 1 x PBS-Tween 3 x 5 min (RT) gewaschen. Nach Zugabe des zweiten Antikörpers (ECL™Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody, Amersham Biosciences) in einer Verdünnung von 1:1000 [v/v] wurde das oben beschriebene Protokoll fortgeführt. Als Antigen kamen sowohl die einzelnen Impfantigene, als auch Ganzzelllysate des Ursprungsstammes B204 (Standardanzucht, abzentrifugiert bei 2710 x g für 10 min, resuspendiert in A. dest., gekocht mit Lämmli-Puffer) und, zum Nachweis der serotypübergreifenden Wirksamkeit der Antiseren, der übrigen acht Serotypferenzstämme zum Einsatz.

3.6 Zellkulturmethoden

3.6.1 Kultivierung der Zellen

Als Medium für die Kultivierung der Zellen wurde ausschließlich DMEM/HAM'S F-12 (Fa. Biochrom, Berlin, Katalog-Nr. FG 4815) unter Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin (Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 5 % FKS (Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) verwendet.

Auftauen und Pflege der Zellen. Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in Kryotubes (1,8 ml) in flüssigem Stickstoff. Als Einfriermedium kam cryo-safe I (Fa. C.C.Pro, Oberdorla) zur Anwendung. Zur Reaktivierung der Zellen wurden die Kryotubes im Wasserbad (37 °C) bis zum Tauen des Inhalts geschwenkt. Alle weiteren Arbeiten fanden unter Reinraumbedingungen statt. Nach Desinfektion der äußeren Oberfläche der Kryotubes mit Ethanol (75 %, Fa. Merck, Darmstadt), diente eine Einmalpipette (1 ml) zur Überführung der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß (50 ml). Unter vorsichtigem Schwenken wurden 10 ml warmes Medium hinzugesetzt und die Zellen abzentrifugiert (200 x g, 20 °C, 7 min). Der Überstand wurde verworfen und dem vorsichtigen Resuspendieren des Zellpellets in 10 ml Medium folgte ein zweiter Waschschrift. Letztlich konnten die erneut in 10 ml Medium resuspendierten Zellen in eine Zellkulturflasche (Fa. Nunc, Wiesbaden) übertragen werden. Nach der mikroskopischen Kontrolle auf Zellgehalt und -morphologie wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Alle zwei Tage wurde nach vorhergehender mikroskopischer Kontrolle ein Mediumwechsel vorgenommen. Das Volumen an Medium

belief sich auf 5 ml in 40 ml- und 10 ml in 200 ml- Zellkulturflaschen. Für die Versuche wurden die Passagen 4 bis 15 verwendet.

Subkultivierung der Zellen. Zur Subkultivierung dienten HEPES-Puffer (1 x) und Trypsin-Gebrauchslösung (1 x, Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich), die vor Verwendung auf 35-37 °C erwärmt wurden. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen wurde das Medium dekantiert und der Zellrasen einmal mit HEPES-Puffer (1 x) gewaschen, um Mediumreste vom Zellrasen zu entfernen und so die Wirkung des Trypsins zu optimieren. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Zellen mit 5 oder 10 ml Trypsin-Gebrauchslösung (je 40 ml- oder 200 ml-Zellkulturflasche) für 5-10 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) bis zur sichtbaren Ablösung der Zellen von der Grundfläche der Kulturgefäße. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt, die Zellkulturflasche mit äquivalenter Menge Medium gespült und dieses ebenfalls in das Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zentrifugation (200 x g, 20 °C, 7 min) konnte das resultierende Zellpellet nach Verwerfen des Überstandes in 5 oder 10 ml Medium resuspendiert und die Zellen vereinzelt werden. Je nach gewünschter Anforderung wurde ein bestimmtes Volumen dieser Zellsuspension in Zellkulturflaschen übertragen und diese anschließend auf ihr Nennvolumen (5 ml oder 10 ml) mit Medium aufgefüllt.

3.6.2 Studium der Adhärenz von *B. hyodysenteriae* an Darmepithelzellen

Adhäsionsversuche Als Zellkultur für diese Versuche dienten Monolayer der IPEC-J2 Zelllinie (Konfluenzrate 80 – 100 %) in Chamberslides (Lab-Tek® II CC2 System, Fa. Nunc, Wiesbaden, Kat-Nr. 154917) mit chemisch modifizierter Oberfläche. Nach einem einmaligen Waschschrift der Zellkulturen mit BHI (1 ml pro Abteil, 1 x 2 min) wurden die Zellen mit einer Suspension vermehrungsfähiger Brachyspiren überschichtet (je 1 ml pro Abteil). Diese Suspension wurde aus frisch vermehrten Brachyspiren hergestellt und vor Inokulation der Zellkulturen einmal in BHI gewaschen. Eine Kontrolle auf Reinheit erfolgte mittels Dunkelfeldmikroskopie. Anschließend wurden die Kulturen zur Gewährung von Interaktionen zwischen Erreger und Säugerzelle für zwei Stunden unter anaeroben Bedingungen (Anaerobierbox AnaeroPack Rectangular, Fa. Biomerieux, Wien; AnaeroGen, Fa. Oxoid, Hampshire, England) auf einem Schüttler (70 U/min) bei 37 °C inkubiert.

Am Ende des Experiments wurde der Überstand dekantiert und die Kammern gemäß den Angaben des Herstellers von dem Objektträger getrennt. Der Objektträger wurde danach dreimal à zwei Minuten mit je 8 ml PBS bei 20°C gewaschen. Die Waschschriffe erfolgten in Kunststoffschalen mit Kammern zur Aufnahme von vier Objektträgern (Heraeus Quadriperm, Fa. W. C. Heraeus GmbH, Hanau) bei ständiger Bewegung auf einem Wippschüttler mit 60 Kippbewegungen je Minute. Nach Spülung mit A. dest. wurden die Präparate für 7 min bei

4 °C mit eiskaltem Methanol (-20 °C, Fa. Merck, Darmstadt) fixiert und anschließend luftgetrocknet.

Die Detektion der Bakterien erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenztechnik. Als Antiserum dienten gepoolte Seren von rekonvaleszenten Schweinen (Antiserumpool, s.u.) und als Konjugat ein Cy2-konjugiertes affinitätschromatographisch gereinigtes „Goat Anti-Swine“ IgG (H+L)-Konjugat in der Verdünnung von 1:100 (Fa. Dianova, Hamburg). Serum und Konjugat wurden jeweils für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend dreimalige Waschschrte erfolgten mit PBS für jeweils 5 min. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leitz, DM RB, Fa. Leica, Wetzlar) bei 400facher Vergrößerung unter Verwendung eines Leica-Zähllokulars (507806 HC PLANs 10x/22, Fa. Leica, Wetzlar). In jedem Abteil wurden 10 Gesichtsfelder auf einer über 5 Horizontalen mäandrierenden Linie gemustert und die Gesamtzahl der Brachyspiren und Zellen protokolliert. Der äußere umlaufende Rand der Abteile (von der Größe zweier Gesichtsfelder) ging nicht mit in die Beurteilung ein. Aus den ermittelten Zahlenwerten wurde pro Abteil der Quotient von Brachyspirenzahl zu Zellzahl errechnet.

Definitionen:

- 1) absolute Adhäsion_{xy} = Brachyspirenzahl n_B / Zellzahl n_Z
- 2) relative Adhäsion_{xy} [%] = absolute Adhäsion_{xy} / absolute Adhäsion_{PBS} x 100
- 3) Adhäsionsreduktion_{xy} [%] = relative Adhäsion_{PBS} – relative Adhäsion_{xy}

Adhäsionshemmversuche. Bei Versuchen zur Hemmung der Adhäsion wurden die Bakteriensuspensionen zuvor mit den zu untersuchenden Antiseren (**Tabelle 11**) inkubiert (20 min, RT, aerob). Als Positivkontrolle diente ein Pool von acht Seren rekonvaleszenter Schweine (Antiserumpool). Alle Spenderschweine wiesen in der Serumlangsamagglutination Agglutinine gegenüber *B. hyodysenteriae* auf. Dieser Antiserumpool, sowie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Kaninchen hergestellten Antisera, kamen, wenn nicht anders erwähnt, in einer Verdünnung von 1:50 [v/v] zur Anwendung. Als Negativkontrolle diente PBS. Brachyspirensuspension und Antiserum-PBS-Gemisch bzw. PBS wurden jeweils in einem Verhältnis von 800 µl zu 200 µl gemischt und anschließend zur Prüfung der Adhärenz auf die Zellkulturen pipettiert. Alle weiteren Schritte entsprechen den Angaben zu den Adhäsionsversuchen.

Tabelle 11: Polyklonale Antiseren

Antiserum (Bezeichnung)	Spezifikation	Tierart, Herkunft
Antiserumpool	Mischung aus 8 Feldseren von Tieren nach überstandener Dysenterie	Schwein, Frau Dr. N. Rudolph, Wabern
CH047	vor Immunisierung mit rBhlp29,7d	Kaninchen, diese Arbeit
CH048	vor Immunisierung mit rBhlp16	Kaninchen, diese Arbeit
CH049	vor Immunisierung mit Negativkontrolle	Kaninchen, diese Arbeit
CH050	vor Immunisierung mit rBhmp39f	Kaninchen, diese Arbeit
CH051	vor Immunisierung mit rBhmp39h	Kaninchen, diese Arbeit
CH077	nach Immunisierung mit rBhlp29,7d	Kaninchen, diese Arbeit
CH078	nach Immunisierung mit rBhlp16	Kaninchen, diese Arbeit
CH079	nach Immunisierung mit Negativkontrolle	Kaninchen, diese Arbeit
CH080	nach Immunisierung mit rBhmp39f	Kaninchen, diese Arbeit
CH081	nach Immunisierung mit rBhmp39h	Kaninchen, diese Arbeit

Erläuterungen: **Negativkontrolle** = aufgereinigtes Eluat einer Proteinexpression von Stamm MRO

3.7 Tierexperimentelle Methoden

3.7.1 Tierhaltung

Die Haltung der Kaninchen erfolgte über den Versuchszeitraum in Einzelboxen (60 cm breit, 63 cm hoch und 85 cm tief) auf Streu. Gefüttert wurde neben Heu ein pelletiertes Alleinfuttermittel (Hasfit plus, Raiffeisen) ad libitum, die Wasserversorgung war über Flaschentränken sichergestellt. Nach Einstallung wurde den Tieren bis zum Beginn der Versuche eine Eingewöhnungszeit von 21 Tagen gewährt.

3.7.2 Herstellung der Impfstoffe

Zur Gewinnung von spezifischen Antiseren gegen äußere Membranproteine von *B. hyodysenteriae* wurden die affinitätschromatografisch aufgereinigten Proteine rBhlp29,7d, rBhmp39f, rBhmp39h und rBhlp16, sowie eine entsprechenden Präparation des Stammes MR0 als Placebo über Zeba™ Desalt Spin Columns (Fa. Pierce, Bonn) in 1 x PBS umgepuffert. Bei den Chargen der Proteine rBhmp39f und rBhmp39h wurde zuvor mittels Amicon-Säulen (Amicon Ultra-15, 10.000 NMWL, Fa. Millipore, Schwalbach) das Gesamtvolumen der Fraktion eingeeengt. Nach Filtration (0,2 µm) wurde die Proteinkonzentration bestimmt (**Kapitel 3.4.1**) und mittels Zusatz von sterilem PBS die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt. Für die s.k.-Immunisierung wurde das Antigen mit dem gleichen Volumen Al₂(OH)₃ versetzt, bei i.v.-Immunisierung jedoch ohne Adjuvans verwendet. Die

Impfstoffe sind **Tabelle 12** zu entnehmen. Vor Anwendung am Tier wurden alle Impfantigene einer Reinheitskontrolle unterzogen (**Kapitel 3.2.3**).

Tabelle 12: Impfantigenpräparationen

Impfantigene	Adjuvans für die s.k. Injektion	Antigenmenge je Tier und Impfung	Gesamt-volumen
rBhlp29,7d (in PBS)	Al ₂ (OH ₃)	50 µg	500 µl
rBhmp39f (in PBS)	Al ₂ (OH ₃)	30 µg	500 µl
rBhmp39h (in PBS)	Al ₂ (OH ₃)	30 µg	500 µl
rBhlp16 (in PBS)	Al ₂ (OH ₃)	50 µg	500 µl
Negativkontrolle	Al ₂ (OH ₃)	3,3 µg	500 µl

Erläuterungen: **Negativkontrolle** = aufgereinigtes Eluat einer Proteinexpression von Stamm MRO, **Al₂(OH₃)** = Alu-Gel-S (Aluminiumhydroxid), Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg, Kat-Nr. 12261, **s.k.** = subkutan

3.7.3 Herstellung rOMP-spezifischer Antiseren im Kaninchen

Der Tierversuch Nr. 142 war gem. § 8 Abs. 7, Nr. 2 (Impfungen, Blutentnahmen oder sonstige diagnostische Maßnahmen nach bereits erprobten Verfahren zur Erkennung insbesondere von Krankheiten, Körperschäden usw. bei Mensch oder Tier) des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (BGBl. I S. 2936) genehmigungsfrei. Der Versuch wurde nach § 8a Abs. 1 und 2 dem Regierungspräsidium Giessen mit Datum vom 31.10.07 angezeigt.

Für die Herstellung der benötigten Antiseren wurden fünf neun Wochen alte Kaninchen an den Tagen 1, 14, 21, 28 und 41 nach vorheriger Blutabnahme von 2 ml bis 4 ml aus der Vena auricularis caudalis mit den zuvor hergestellten Impfstoffen (**Kapitel 3.7.2**) immunisiert. An den Tagen 1 und 14 erfolgte eine subkutane (s.k.), an den Tagen 21, 28 und 41 eine intravenöse (i.v.) Applikation des Impfantigens. Am 48. Versuchstag wurden die Tiere nach Prämedikation mit Atropin (0,5 mg/kg KG, s.k., Fa. B. Braun Melsungen, Melsungen) unter Verwendung von Ketamin (25 mg/kg KG, i.m., Selectavet Dr. Otto Fischer, Weyarn-Holzolling) und Xylazin (5 mg/kg KG, i.m., Fa. CP-Pharma, Burgdorf) in Narkose gelegt. Nach Feststellung eines hyporeflektorischen Lidreflexes bei normoreflektorischem Cornealreflex fand die Tötung der Kaninchen unter Blutentzug zwecks terminaler Blutentnahme statt. Die Blutproben wurden nach etwa einstündiger Ruhezeit bei Raumtemperatur für 10 min bei 1300 x g abzentrifugiert (u. U. auch mehrfach) und das Serum in ein neues Gefäß überführt. Die Lagerung der Sera erfolgte bei -20 °C.

3.8 Datenhaltung und Auswertung

3.8.1 Bilddokumentation und Auswertung

Die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese wurden mit dem Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. RH, Typ RH-3 (Fa. Herolab, Wiesloch) unter UV-Beleuchtung sowohl fotografisch als auch digital festgehalten. Die Ergebnisse von SDS-PAGE und Westernblot/Immunoblot wurden digital mittels des Scanners CanoScan LIDE 600F (Fa. Canon Deutschland, Krefeld) dokumentiert. Die Ergebnisse der Adhäsionsversuche wurden beispielhaft mit der Digitalkamera Nikon Coolpix 4500 (Fa. Nikon, Düsseldorf) festgehalten. Die weitere Bearbeitung der Abbildungen erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop Elements 3.0 (Fa. Adobe Systems, München).

3.8.2 Auswertung von DNS-Sequenzdaten

Die Sequenz-Rohdaten wurden mit Hilfe des Software-Pakets „Lasergene 2000[®]“ (Fa. Dnastar Ltd., London, UK) aufgearbeitet und analysiert. Primersequenzen für die PCR und Sequenzierungsreaktionen wurden mit den Programmen „Primer D´Signer 1.1[®]“ (Fa. IBA GmbH, Göttingen) und „Oligo[®]“ Version 4.0 (Fa. MedProbe, Oslo, Norwegen) ermittelt.

3.8.3 Statistische Auswertung

Im Rahmen der Adhärenzversuche wurde aus den ermittelten Zahlenwerten pro Abteil der Quotient von Brachysporenzahl zu Zellzahl errechnet. Die Daten wurden mittels Student's t-Test (Programm Microsoft Office Excel 2003, Fa. Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) statistisch ausgewertet. Die Signifikanzschwellen sind in **Tabelle 13** aufgeführt.

Tabelle 13: In der vorliegenden Arbeit verwendete Signifikanzschwellen

Signifikanz	p-Wert	Abkürzungen
hoch signifikant	$p \leq 0,001$	***
signifikant	$0,001 < p \leq 0,01$	**
schwach signifikant	$0,01 < p \leq 0,05$	*
nicht signifikant	$p > 0,05$	n.s.

4 ERGEBNISSE

4.1 Vorkommen der für äußere Membranproteine kodierenden Gene (*bhlp16*, *bhlp29,7d*, *bhmp39f* und *bhmp39h*) bei verschiedenen Referenzstämmen dieser Spezies

Die Genausstattung der in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira hyodysenteriae*-Referenzstämme wurde mittels Insert-PCR überprüft und ist **Tabelle 14** zu entnehmen. Es wird ersichtlich, dass nach den Untersuchungsergebnissen der PCR alle Serotyp-Referenzstämme über *bhlp29,7d* und *bhmp39f* sowie, bis auf Stamm B8044, über *bhlp16* verfügen. Das *bhmp39h* konnte dagegen lediglich bei zwei Stämmen (B204 und B6933) unter Verwendung von Primern, die nach der *bhmp39h*-Sequenz des Stammes B204 synthetisiert wurden, detektiert werden.

Tabelle 14: Nachweis verschiedener OMP-kodierender Gene bei den Serotyp-Referenzstämmen von *Brachyspira hyodysenteriae* mittels PCR

<i>B. hyodysenteriae</i> Stammbezeichnung	Serotyp / -gruppe	Nachweis OMP-kodierender Gene mittels PCR			
		<i>bhlp16</i>	<i>bhlp29,7d</i>	<i>bhmp39f</i>	<i>bhmp39h</i>
B78	1	+	+	+	-
B204	2	+	+	+	+
B169	3	+	+	+	-
A1	4	+	+	+	-
B8044	5/2	-	+	+	-
B6933	6/1	+	+	+	+
ACK 300/8	7/2	+	+	+	-
Vic2	H	+	+	+	-
NSW1	J	+	+	+	-

4.2 Rekombinante Herstellung der Proteine Bhlp16, Bhlp29,7d, Bhmp39f und Bhmp39h

4.2.1 Klonierung der Gene *bhlp16*, *bhlp29,7d*, *bhmp39f* und *bhmp39h* in *E. coli* BLR(DE3)

Um ausreichende Proteinmengen der Proteine Bhlp16, Bhlp29,7d, Bhmp39f und Bhmp39h für die Immunisierung der Kaninchen zu gewinnen, wurden die entsprechenden Gene in einem *E. coli* K12-Derivat namens BLR(DE3) überexprimiert. Dazu mussten zunächst, die für *bhlp16*, *bhlp29,7d*, *bhmp39f* und *bhmp39h*-kodierenden DNS-Abschnitte des *B. hyodysenteriae*-Stammes B204 mittels PCR amplifiziert (**Abbildung 2**) und anschließend mit dem geschnittenen Vektor pASK-IBA3plus ligiert werden.

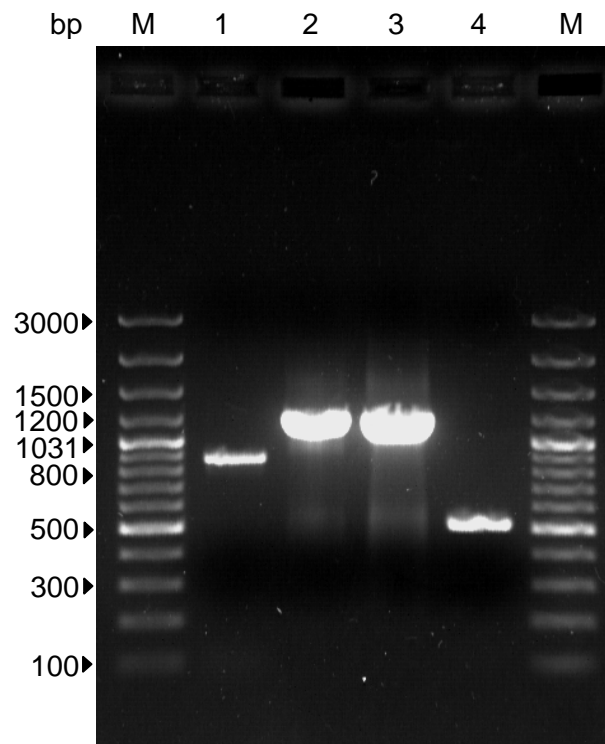


Abbildung 2: Darstellung der vier Insert-Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese

Erläuterungen: 1 = *bhlp29,7d* (585 ng), 2 = *bhmp39f* (869,2 ng), 3 = *bhmp39h* (902,8 ng), 4 = *bhlp16* (879 µg), M = Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100bp DNS Ladder Plus), bp = Basenpaare

Für die spätere Aufreinigung der rekombinanten Proteine war im Rahmen der Ligation entscheidend, dass die Verknüpfung der Inserts mit den DNS-Sequenzen des Ligationssystems dazu führte, dass am carboxyterminalen Ende der Genprodukte ein Streptavidin-Marker (Strep-Tag) angehängt wurde. Diesbezüglich fand mittels der eingesetzten

Primer (*bhlp16*-f/r, *bhlp29,7d*-f/r, *bhmp39f*-f/r, *bhmp39h*-f/r (**Tabelle 8, Kapitel 3.3.8**)) eine Modifikation von Anfang und Ende der Gene statt: Sowohl vor dem Start - als auch vor dem Stopcodon wurde eine *Bsal*-Schnittstelle eingefügt, um mit einer gerichteten „sticky-end“-Ligation die gewünschte Orientierung des Inserts sicherzustellen, da die Erkennungssequenz für *Bsal* zwar auf beiden Strängen identisch ist, aber die Schnittstellen je nach Strang verschieden sind. Die vor die Ligation geschaltete Restriktion der Inserts mit *Bsal* wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. **Abbildung 3** belegt den Erfolg dieses Schrittes. Der Größenunterschied zwischen geschnittenen und ungeschnittenen Inserts lag exakt im Erwartungsbereich. Kolonien erfolgreich transformierter *E. coli* BLR(DE3)-Zellen konnten zunächst anhand ihrer Ampicillin-Resistenz erkannt und mittels Kontroll-PCR und Sequenzierung (Strang und Gegenstrang) selektiert werden.

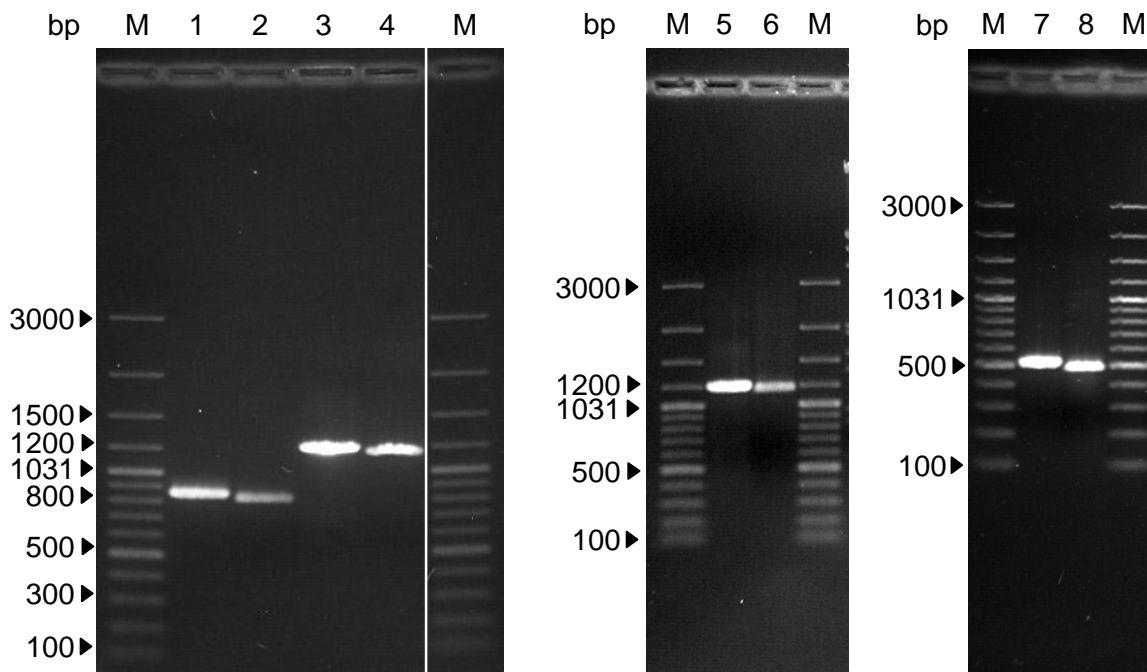


Abbildung 3: Agarosegelelektrophorese der Inserts vor und nach Restriktion mit *Bsal*

Erläuterungen: **1** = *bhlp29,7d* vor Restriktion (292,5 ng), **2** = *bhlp29,7d* nach Restriktion (51,7 ng), **3** = *bhmp39f* vor Restriktion (434,6 ng), **4** = *bhmp39f* nach Restriktion (220,2 ng), **5** = *bhmp39h* vor Restriktion (1354,2 ng), **6** = *bhmp39h* nach Restriktion (336,9 ng), **7** = *bhlp16* vor Restriktion (1318,5 ng), **8** = *bhlp16* nach Restriktion (390,3 ng), **M** = Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100bp DNS Ladder Plus), **bp** = Basenpaare

Es gelang für jedes Insert entsprechende *E. coli*-Klone zu gewinnen, deren rekombinantes Plasmid mittels Kontroll-PCR nachgewiesen werden konnte. In **Abbildung 4** ist am Beispiel von *bhlp16* deutlich zu erkennen, dass alle getesteten Kolonien sowohl in der internen, als auch in der umgreifenden PCR eine Bande auf der erwarteten Höhe aufwiesen, also über

das rekombinante Plasmid verfügten. Die Plasmide erhielten die Bezeichnungen pHIT-7-01 (für Insert *bhlp29,7d*), pHIT-7-02 (für Insert *bhmp39f*), pHIT-7-03 (für Insert *bhmp39h*) und pHIT-7-04 (für Insert *bhlp16*). Die bei der Firma GENTERprise GmbH (Mainz) durchgeführten Sequenzierungen ermöglichten die Identifizierung der Klonkolonien, deren Gensequenz vollständig mit der jeweils veröffentlichten Ursprungssequenz (**Tabelle 8, Kapitel 3.3.8**) übereinstimmte. Diese Klone konnten dann für die weiteren Arbeiten verwendet werden. Bei Gen *bhmp39f* und *bhmp39h* wiesen von sechs bzw. fünf untersuchten Klonkolonien nur jeweils eine das Gen in vollständiger Übereinstimmung (Nukleotidsequenzhomologie von 100%) mit der Matritze auf. Die Größen der rekombinanten Proteine sind **Tabelle 9 (Kapitel 3.4.3)** zu entnehmen.

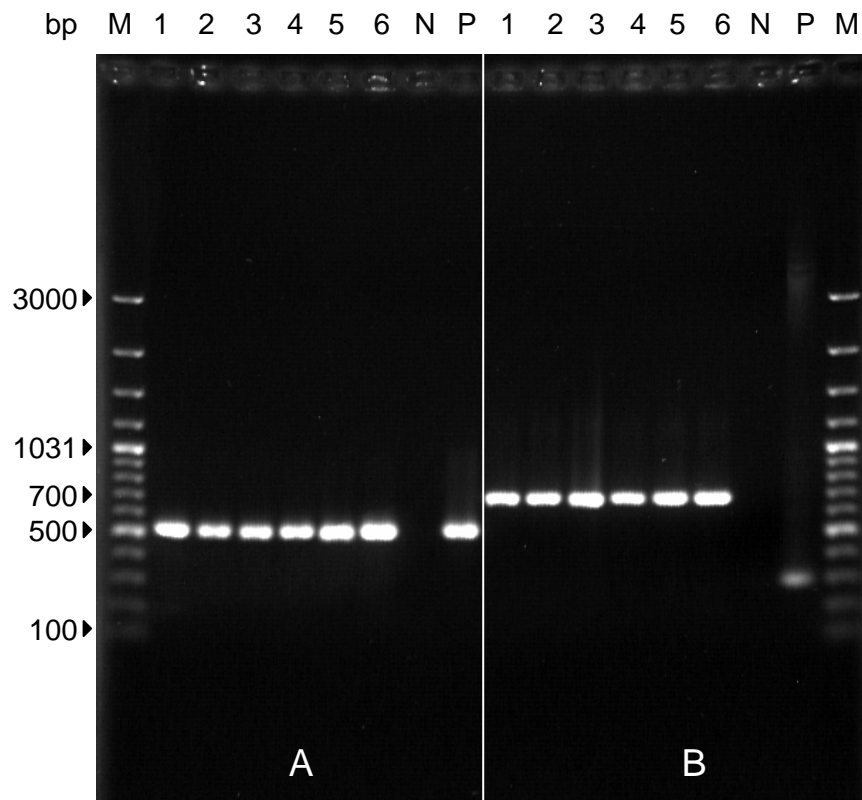


Abbildung 4: Nachweis von *bhlp16*-Gensequenzen in transformierten *E. coli* BLR(DE3)

Erläuterungen: **A** = interne PCR mit den Primern *bhlp16-f* und *bhlp16-r* (**Tabelle 8**), **B** = umfangreiche PCR mit den Primern *Seq-f* und *Seq-r* der Fa. IBA (**Tabelle 8**), **M** = Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus), **bp** = Basenpaare, **1-6** = die jeweiligen Klonkolonien, **N** = Negativkontrolle (A. dest), **P** = Positivkontrolle (für die interne PCR das jeweilige geschnittene und aufgereinigte Insert, für die umfangreiche PCR der ungeschnittene leere Vektor)

4.2.2 Ergebnisse der Proteinexpression und -aufreinigung

rBhlp29,7d aus Stamm MR1. Das Protein rBhlp29,7d war nach Expression und Aufreinigung im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel als 29,7 kDa großes Protein deutlich zu erkennen (**Abbildung 5A**). Die stärksten Banden zeigten sich, wie laut Herstellerangaben zu erwarten, in den Elutionsfraktionen zwei und drei, ebenso wie im Westernblot. Daneben waren in den Elutionsfraktion zwei und drei mittels Coomassie-Färbung weitere Banden detektierbar, bei denen es sich um Proteine des Empfängerorganismus handelte. Dementsprechend konnte im Westernblot die gewünschte Proteinbande mittels Strep-Tactin HRP Konjugat fast solitär dargestellt werden (**Abbildung 5B**). Lediglich in den Elutionsfraktionen drei bis sechs trat eine weitere deutliche Bande bei knapp über 22 kDa (ca. 25 kDa) auf, die im Hinblick auf die Bandenstärke im Westernblot kein entsprechendes Pendant im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel aufwies, sowie eine schwache Zusatzbande bei etwa 16 kDa.

rBhmp39f aus Stamm MR2 und rBhmp39h aus Stamm MR3. Die Proteine rBhmp39f (**Abbildung 6**) und rBhmp39h (**Abbildung 7**) waren dagegen lediglich als sehr schmale Banden im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel und im Westernblot (mittels Strep-Tactin HRP Konjugat) darstellbar. Auch hier waren die Elutionsfraktionen zwei und drei offensichtlich proteinreicher als die restlichen Eluate. Interessanterweise konnte mit der Coomassie-Färbung jeweils eine starke Co-Expression eines zusätzlichen Proteins mit einer Größe von etwa 60 kDa dargestellt werden. Diese Bande war unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats jedoch nicht im Westernblot detektierbar. Dagegen wurde, wie bereits oben beschrieben, auch nach Aufreinigung dieser Proteine eine Bande knapp über 22 kDa (ca. 25 kDa) nachgewiesen.

rBhlp16 aus Stamm MR4. Von der Strep-Tactin-Säule eluiertes Protein (Fraktionen 2 und 3) stellte sich im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel als deutlich erkennbare Bande in dem zu erwartenden Größenbereich dar. Im Westernblot ließ sich diese Bande mittels Strep-Tactin HRP Konjugat ebenfalls gut nachweisen. Neben dieser dominierenden Reaktion erschienen im angefärbten Westernblot weitere deutliche Banden in den Größenordnungen von ca. 36 kDa und > 250 kDa, sowie drei schwächere Banden bei 64 kDa, knapp über 22 kDa (siehe oben) und etwa 16 kDa (**Abbildung 8**).

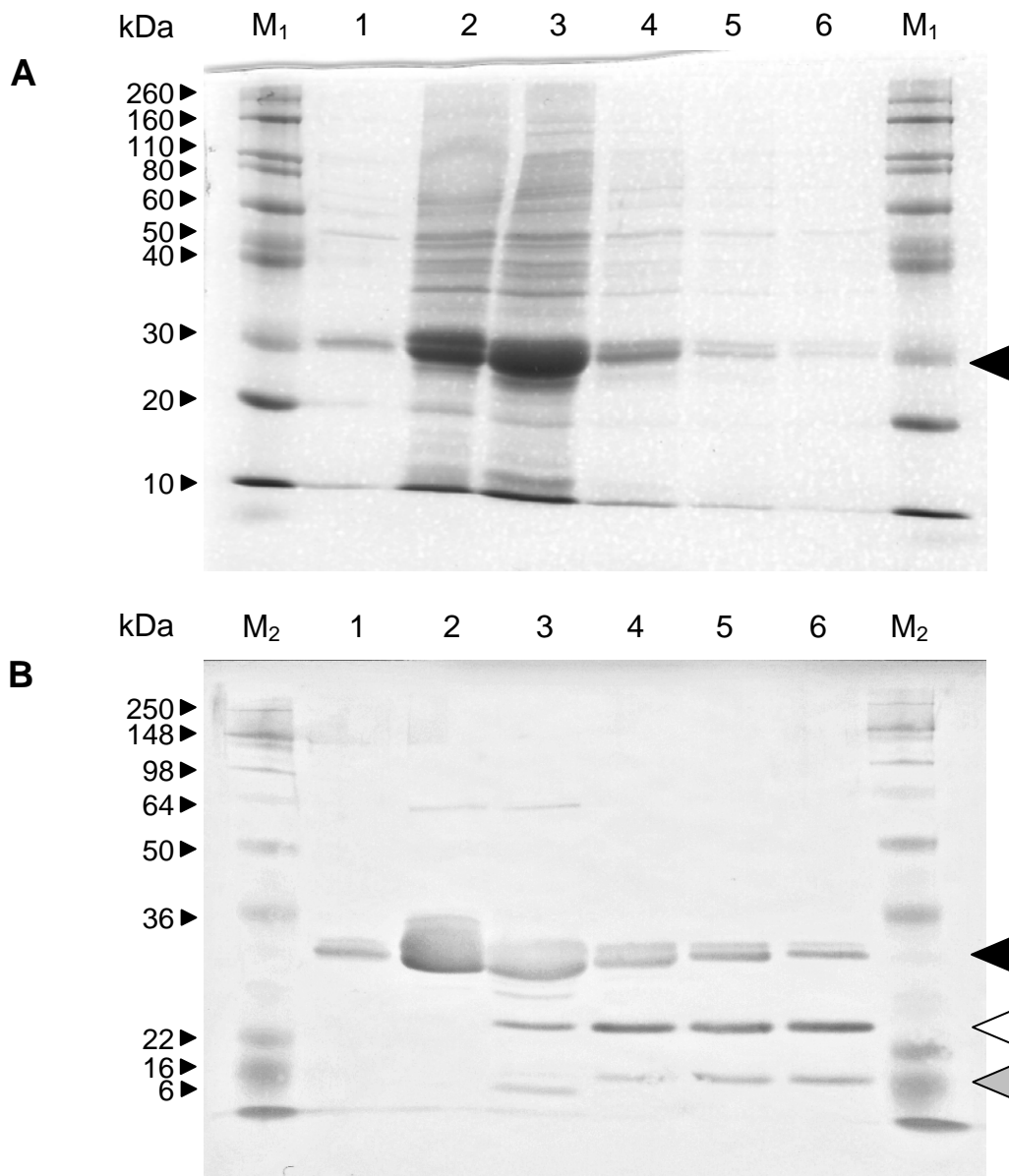


Abbildung 5: SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats der Eluate im Rahmen der affinitätschromatographischen Aufreinigung des rBhlp29,7d

Erläuterungen: **M1** = Molekularmassenstandard (Novex® Sharp Protein Standard),
M2 = Molekularmassenstandard (SeeBlue® Plus2)
1-6 = Elutionsfraktionen 1-6, Auftrag von je 15 µl Probe

▲ = rBhlp29,7d (= 29,7 kDa)
 △ = Kontaminante ≈ 25 kDa
 ▴ = Kontaminante ≈ 16 kDa

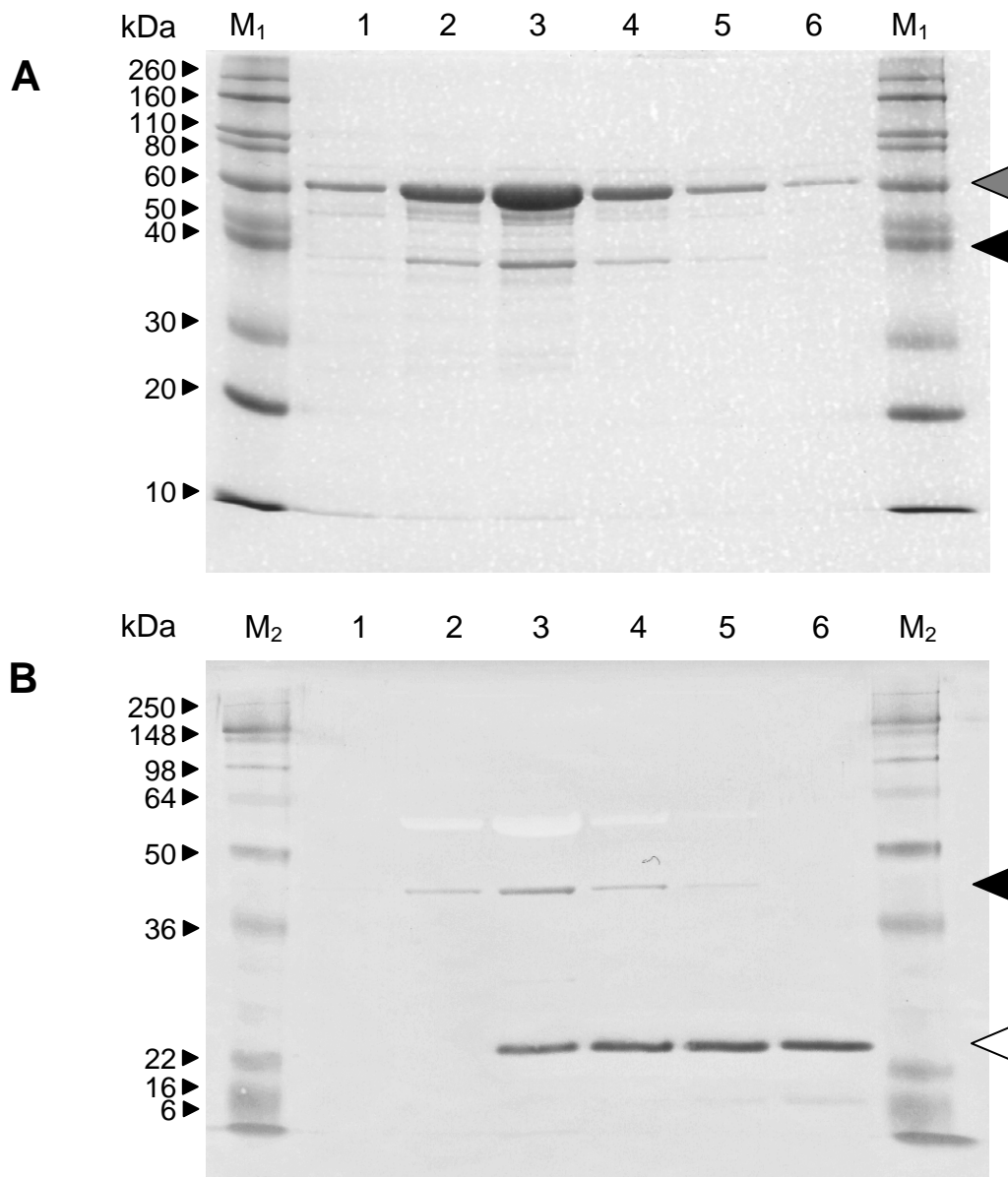


Abbildung 6: SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats der Eluate im Rahmen der affinitätschromatographischen Aufreinigung des rBhmp39f

Erläuterungen: M₁ = Molekularmassenstandard (Novex[®] Sharp Protein Standard),
M₂ = Molekularmassenstandard (SeeBlue[®] Plus2)
1-6 = Elutionsfraktionen 1-6, Auftrag von je 15 µl Probe

- ▶ = rBhmp39f (= 39 kDa)
- ◻ = Kontaminante ≈ 25 kDa
- ◼ = Kontaminante ≈ 60 kDa

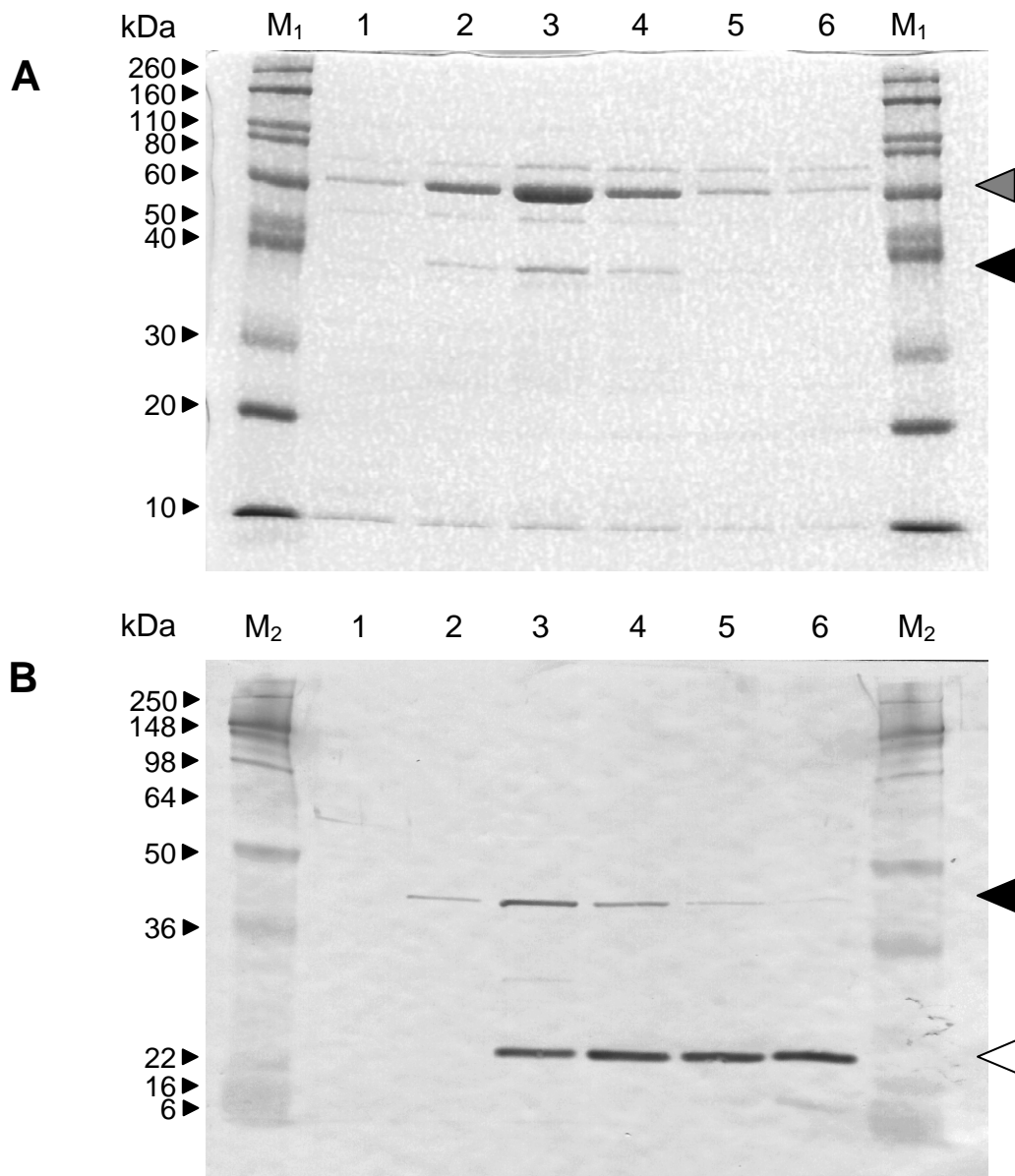


Abbildung 7: SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats der Eluate im Rahmen der affinitätschromatographischen Aufreinigung des rBhmp39h

Erläuterungen: M₁ = Molekularmassenstandard (Novex[®] Sharp Protein Standard),
M₂ = Molekularmassenstandard (SeeBlue[®] Plus2)
1-6 = Elutionsfraktionen 1-6, Auftrag von je 15 µl Probe

▲ = rBhmp39h (= 39 kDa)
◁ = Kontaminante ≈ 25 kDa
◄ = Kontaminante ≈ 60 kDa

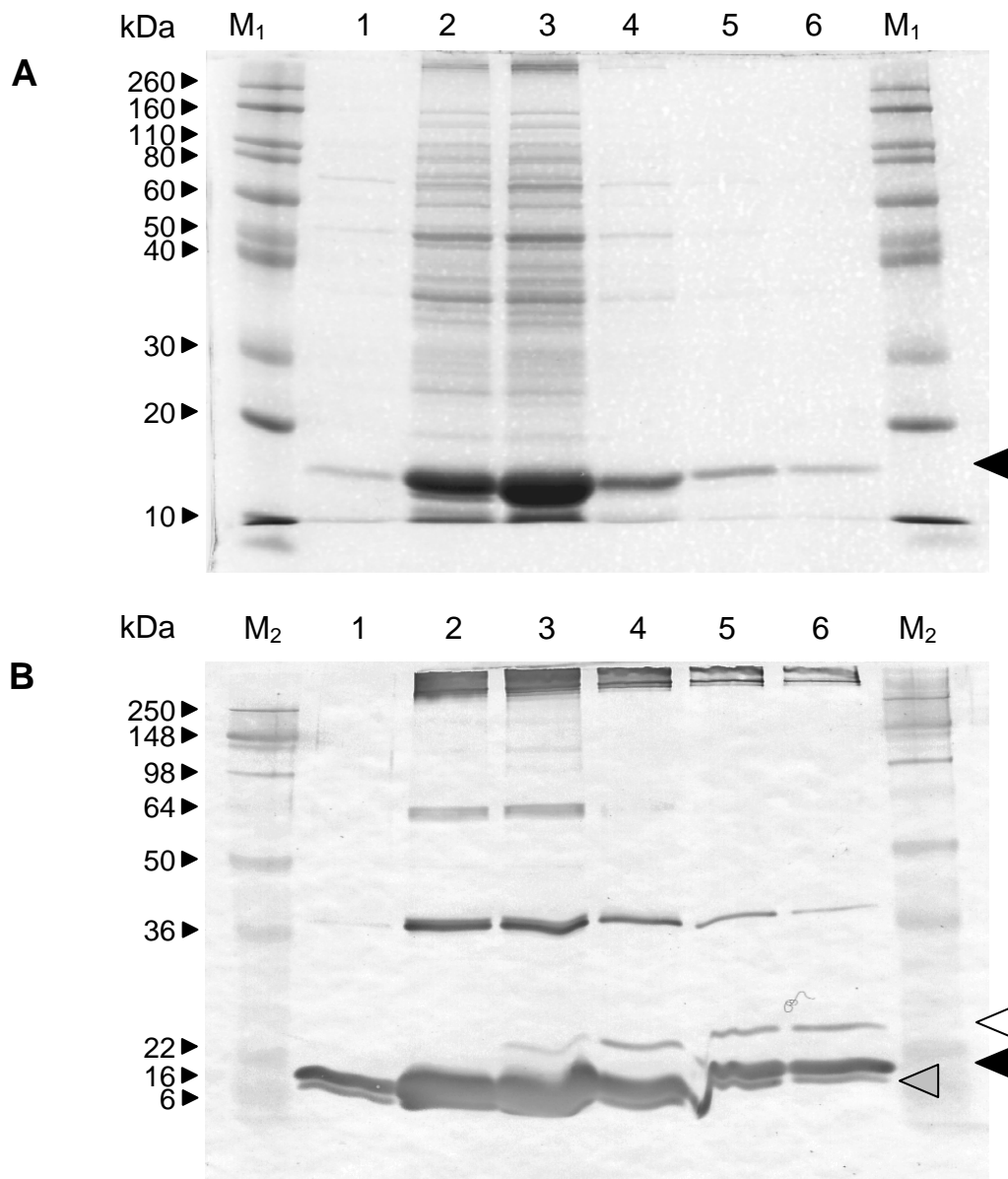


Abbildung 8: SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats der Eluate im Rahmen der affinitätschromatographischen Aufreinigung des rBhlp16

Erläuterungen: **M1** = Molekularmassenstandard (Novex® Sharp Protein Standard),
M2 = Molekularmassenstandard (SeeBlue® Plus2)
1-6 = Elutionsfraktionen 1-6, Auftrag von je 15 µl Probe

- ▲ = rBhlp16 (= 16 kDa)
- △ = Kontaminante ≈ 25 kDa
- ◐ = Kontaminante ≈ 16 kDa

Negativkontrolle (Produkt einer Proteinexpression von Stamm MR0). Die Negativkontrolle wies keine Banden in den Größenordnungen der gewünschten Proteine auf. Im Westernblot waren allerdings mittels Strep-Tactin HRP Konjugat Banden im Bereich von etwa 25 kDa und 16 kDa zu erkennen (**Abbildung 9**).

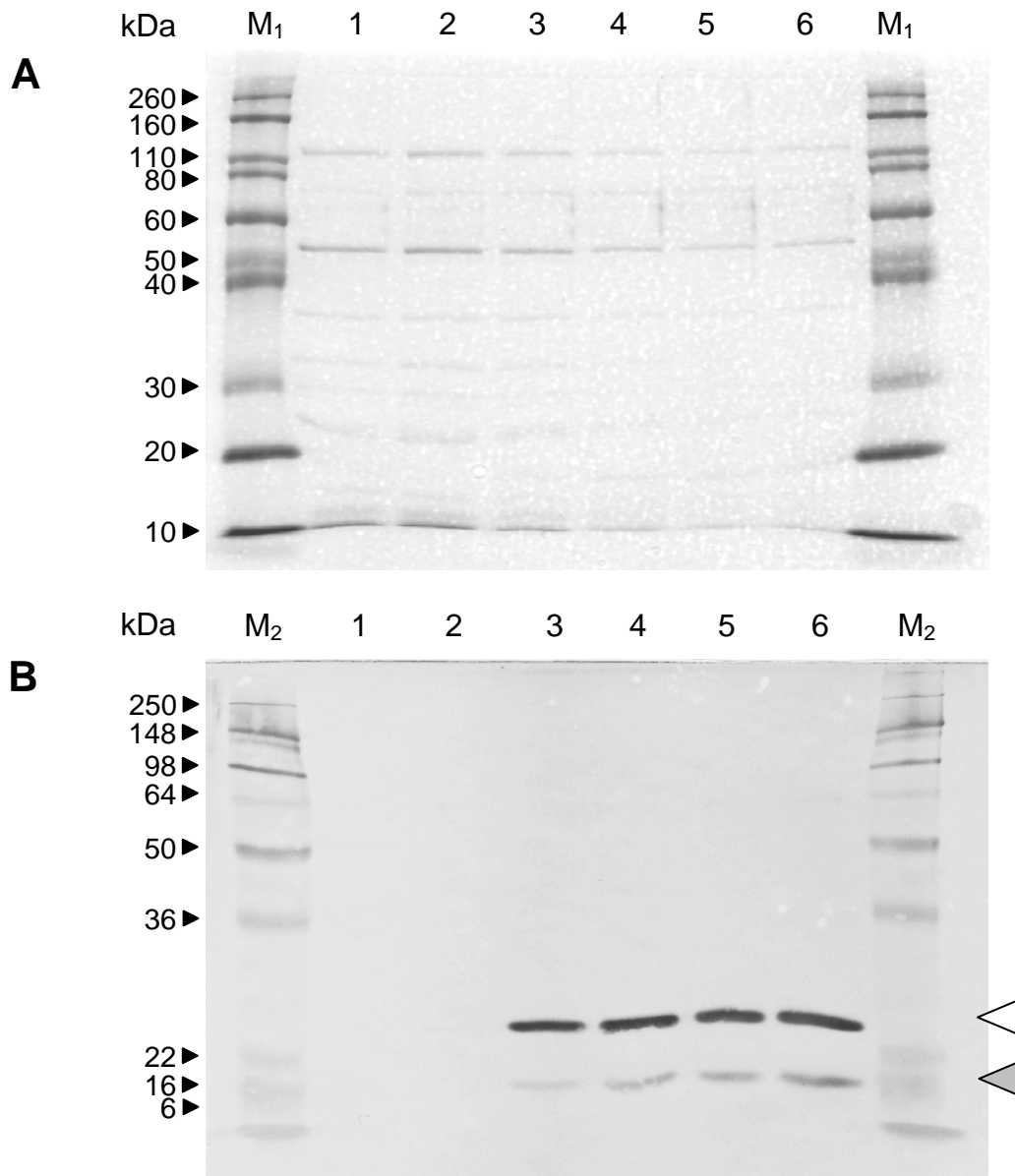


Abbildung 9: SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats der Eluate im Rahmen der affinitätschromatographischen Aufreinigung einer Proteinexpression von Stamm MR0 (Negativkontrolle)

Erläuterungen: M₁ = Molekularmassenstandard (Novex[®] Sharp Protein Standard),
M₂ = Molekularmassenstandard (SeeBlue[®] Plus2)
1-6 = Elutionsfraktionen 1-6, Auftrag von je 15 µl Probe

◁ = Kontaminante ≈ 25 kDa
◁ = Kontaminante ≈ 16 kDa

Versuche zum Ausschluss des 60 kDa-Proteins bei der Eluierung der rBhmp39f/ rBhmp39h-Proteine. Mit allen in **Tabelle 15** aufgeführten Versuchsansätzen war eine isolierte Aufreinigung der Proteine rBhmp39f und rBhmp39h ohne das 60 kDa-Protein nicht möglich. Sowohl im Coomassie-gefärbten Gel als auch im Westernblot mittels Strep-Tactin HRP Konjugat wurde entweder nach wie vor eine 60 kDa Bande oder aber weder diese Kontaminante noch rBhmp39 nachgewiesen.

Tabelle 15: Versuche zur isolierten Aufreinigung von rBhmp39f und rBhmp39h

Verfahren	Prinzip	Beschreibung	Ergebnis	Referenzen
French Press	Dissoziation von Multimeren bei einem Druck ab 1 kbar	Lysatherstellung mit French Press (anstelle des üblicherweise verwendeten Ultraschalls), 2 Durchläufe bei 32000 PSI Cell Pressure ($\approx 2,2$ kbar)	keine Veränderung	(91)
Lysat 5 min Kochen	Dissoziation der Protein-komplexe durch Hitzeeinwirkung	vor der Aufreinigung über die Säule	weder das 60 kDa-Protein noch rBhmp39 nachweisbar	eigene Überlegungen
Einsatz von 1 M und 2 M NaCl	Verwendung von 400-600 mM NaCl zur Gewinnung von GroE	Waschschritte 1 und 2 unter Zusatz von NaCl zum Waschpuffer (Endkonzentration 1 M und 2 M): jeweils 5 min stehen lassen, dann 3 normale Waschschritte	keine Veränderung	1) Empfehlung von Fa. IBA 2) (35)
Einsatz von ATP und MgCl ₂	Freisetzung der Proteine aus den Chaperonen ist ein ATP-abhängiger Prozess	Inkubation des Lysats vor der Aufreinigung über die Säule mit 5 mM ATP und 20 mM MgCl ₂ (5 min RT, 5 min 4 C)	keine Veränderung	1) Empfehlung von Prof. Dr. Johannes Buchner, Department Chemie, TU München 2) (114)

4.2.3 Optimierung der Proteinexpression

Versuche zur Optimierung der Proteinexpression von Bhmp39f/Bhmp39h. Nach Induktion der Proteinexpression der in dieser Arbeit hergestellten *E. coli*-Stämme MR0 bis MR4 (Tabelle 3) mit AHT in einer Konzentration von 20 µg/100 ml, wiesen die Klone MR2 und MR3 im Gegensatz zu den Stämmen MR0, MR1 und MR4 nach fünfstündiger Inkubation eine deutlich geringere OD₅₅₀ auf. Zwar zeigte auch Stamm MR1 nach fünf Stunden Inkubation eine etwas geringere OD₅₅₀ als die Stämme MR0 und MR4, aber keineswegs einen derartigen Abfall der OD₅₅₀ wie bei den Stämmen MR2 und MR3 (Abbildung 10).

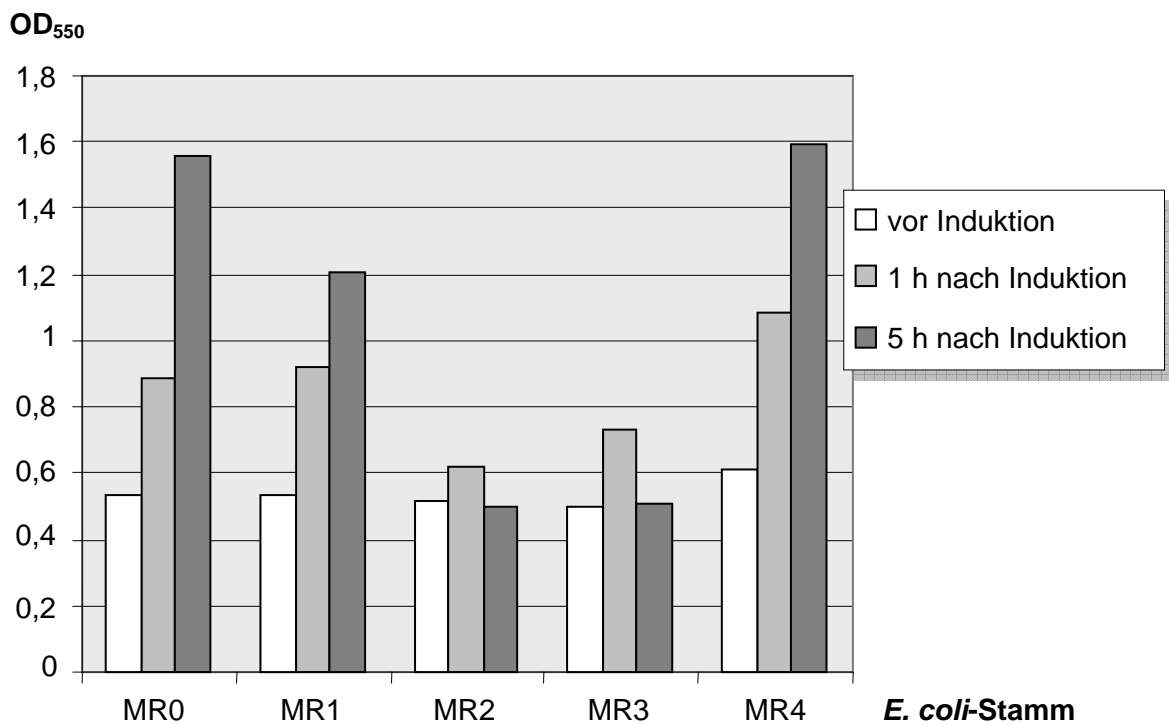


Abbildung 10: Optische Dichte (OD₅₅₀) der *E. coli*-Klone MR0, MR1, MR2, MR3 und MR4 zu verschiedenen Zeiten nach Induktion mit 20 µg AHT/100 ml

Wie aus **Abbildung 11** hervorgeht, war die für Stamm MR2 und MR3 festgestellte Wachstumseinschränkung abhängig von der eingesetzten AHT-Konzentration. Beide Stämme zeigten bei einer Dosis von 0,08 µg/100 ml ein gutes Wachstum. Während Stamm MR3 bereits bei einer Konzentration von 0,31 µg/100 ml nach dreistündiger Inkubation eine deutlich verringerte OD₅₅₀ aufwies, zeigte Stamm MR2 keine diesbezügliche Veränderung. Eine Konzentration von 1,25 µg/100 ml wurde hingegen von beiden Stämmen nicht mehr vertragen, was sich darin äußerte, dass die OD₅₅₀ nach dreistündiger Inkubation bereits niedriger war als eine Stunde nach Induktion.

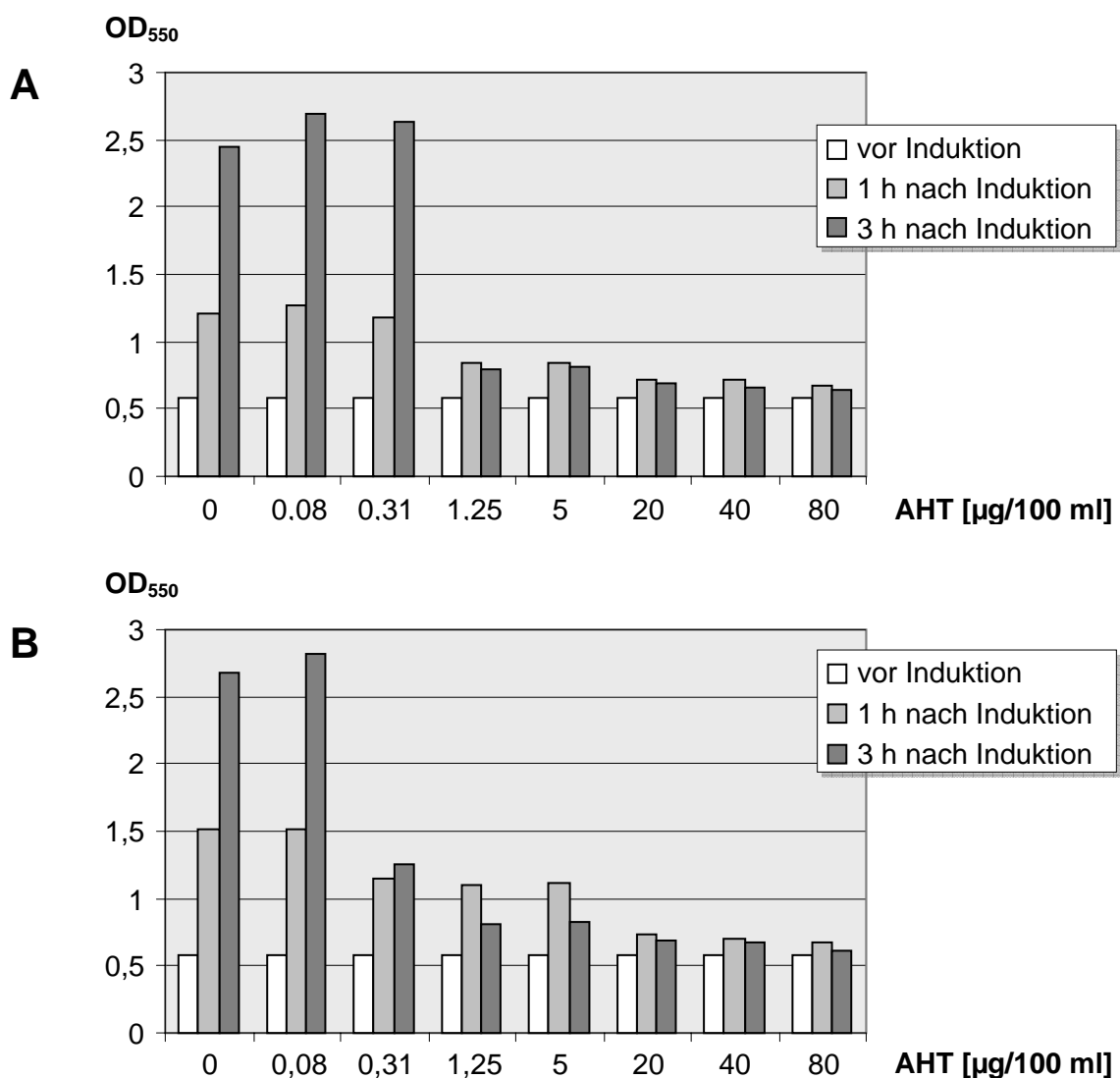


Abbildung 11: OD₅₅₀ der *E. coli*-Klone MR2 (A) und MR3 (B) zu verschiedenen Zeiten nach Induktion mit steigenden AHT-Mengen

4.2.4 Proteingehalte der rOMP-Präparationen

Die erhaltenen Proteinmengen nach Umpufferung und Sterilfiltration der Eluate sind in **Tabelle 16** dargestellt. Insbesondere bei dem Vergleich der Proteinmenge je Liter Ausgangskultur wird deutlich, dass die Expression von rBhmp39f und rBhmp39h wesentlich geringere Mengen ergab als die der anderen beiden Proteine.

Tabelle 16: Ergebnisse der Proteinbestimmung

gemessenes Protein	Methode	Proteinmenge in	
		[µg/ml]	[µg/l Ausgangskultur]
rBhlp29,7d	colorimetrisch	1577,07	1971,34
rBhmp39f	densitometrisch	ca. 200	16,67
rBhmp39h	densitometrisch	ca. 200	13,32
rBhlp16	colorimetrisch	1323,38	1654,23
Expressionsprodukt von Stamm MR0	colorimetrisch	87,5	n.b.

Erläuterungen: n.b. = nicht bestimmt

4.3 Ergebnisse der Immunisierungsversuche

4.3.1 Nachweis der rOMP-spezifischen Antikörper beim Kaninchen

Bei allen Kaninchen konnten nach ein- bis dreimaliger Impfung im Immunoblot nachweisbare Antikörper gegen das homologe Antigen detektiert werden. Wie aus **Tabelle 17** ersichtlich wird, bildeten die mit rBhlp29,7d bzw. rBhlp16 geimpften Tiere 7-14 Tage früher Antikörper aus, als die mit den beiden übrigen Proteinen geimpften Kaninchen. Die in der Tabelle aufgeführten Ergebnisse resultierten aus Immunoblotanalysen, von denen exemplarisch die Untersuchungsergebnisse des mit rBhlp16-geimpften Kaninchens in **Abbildung 12** gezeigt sind.

Bei den mit rBhmp39f und rBhmp39h geimpften Kaninchen fiel auf, dass zeitlich vor dem Nachweis spezifisch gegen diese Proteine gerichteter Antikörper Banden im Bereich von 60 kDa auftraten.

Das Serum des Kontrolltieres zeigte im Immunoblot weder bei den einzelnen Impfantigenen noch bei dem als Antigen eingesetzten Ganzzelllysate des Spenderstammes B204 eine Reaktion (**Abbildung 13**).

Tabelle 17: Antikörperentwicklung im Immunoblot nach Immunisierung von Kaninchen mit rOMPs von *B. hyodysenteriae* unter Verwendung der homologen rOMPs als Antigene

Entnahmetage der Serumproben	Reaktion der homologen Antiseren mit den rOMPs			
	rBhlp29,7d	rBhmp39f	rBhmp39h	rBhlp16
1	-	-	-	-
14	+++	-	-	+
21	+++ ¹⁾	+	-	+++ ¹⁾
28	+++ ¹⁾	++	+++	+++ ¹⁾
41	+++ ¹⁾	+++ ¹⁾	+++ ¹⁾	+++ ¹⁾
48	+++ ¹⁾	+++ ¹⁾	+++ ¹⁾	+++ ¹⁾

Erläuterungen: - = negativ, + = schwache Reaktion, ++ = mittelgradige Reaktion, +++ = starke Reaktion, 1) = gleichzeitiges Vorkommen nicht spezifischer Banden

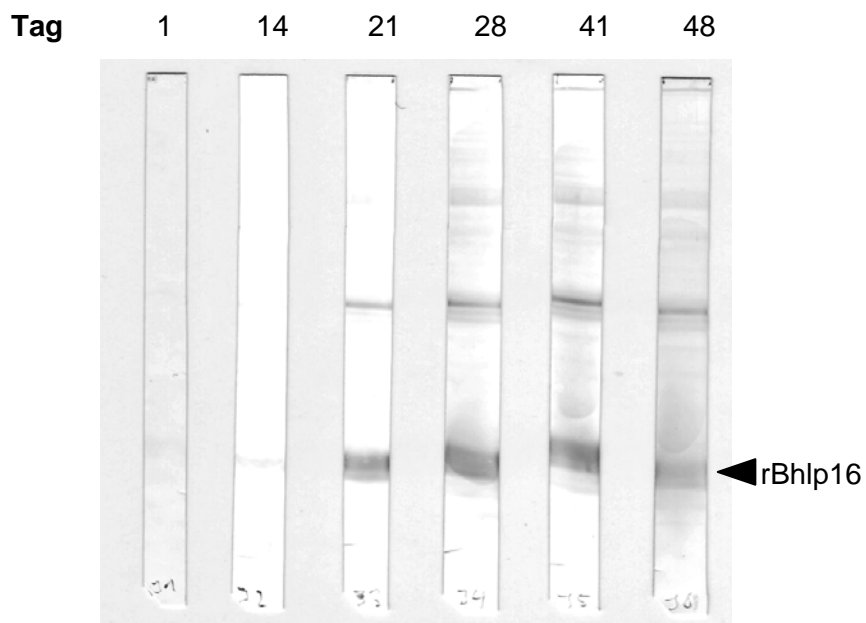


Abbildung 12: Antikörpernachweis bei einem Kaninchen nach Immunisierung mit affinitätschromatografisch aufgereinigtem rBhlp16 im Immunoblot

Erläuterungen: Einsatz des Antiserums 1:500 [v/v], **Antigen** = Impfantigen rBhlp16

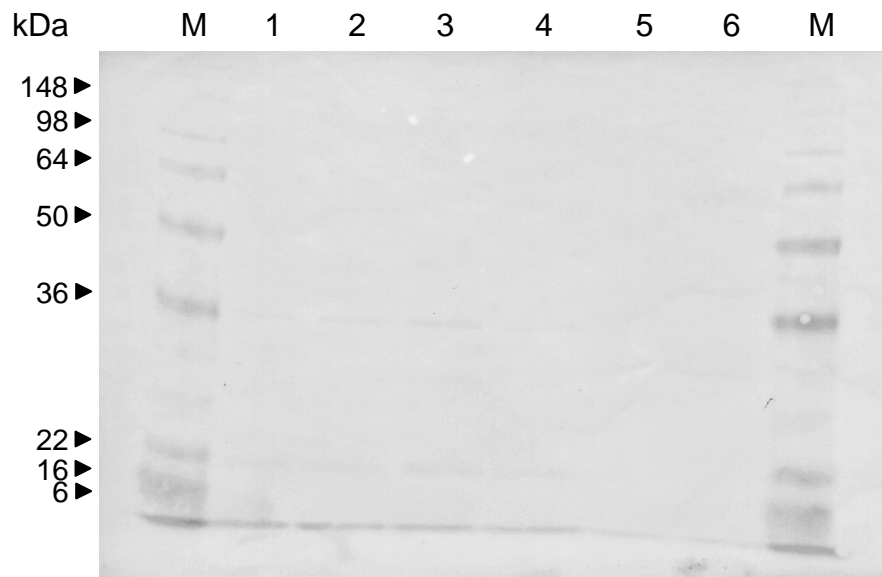


Abbildung 13: Reaktion des Negativantiserums CH079 des Kontrollkaninchens auf verschiedene Antigene im Immunoblot

Erläuterungen: Einsatz des Antiserums 1:500 [v/v], **1** = rBhlp29,7d-Impfantigen, **2** = rBhmp39f-Impfantigen, **3** = rBhlp16-Impfantigen, **4** = rBhmp39h-Impfantigen, **5** = Negativkontrolle-Impfantigen, **6** = Ganzzelllysat von *B. hyodysenteriae*, Stamm B204, **M** = Molekularmassenstandard (SeeBlue® Plus2)

4.3.2 OMP-Detektion in Ganzzelllysaten von *B. hyodysenteriae* durch die rOMP-spezifischen Antiseren

Bei Analyse der rOMP-spezifischen Antiseren im Immunoblot unter Verwendung von Ganzzelllysaten von *B. hyodysenteriae* (Stamm B204) als Antigen detektierten alle Antiseren eine Proteinbande in der erwarteten Größe. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in **Abbildung 14** dargestellt. Das gegen MRO erzeugte Antiserum reagierte mit keiner Proteinbande aus dem Ganzzelllysat von Stamm B204.

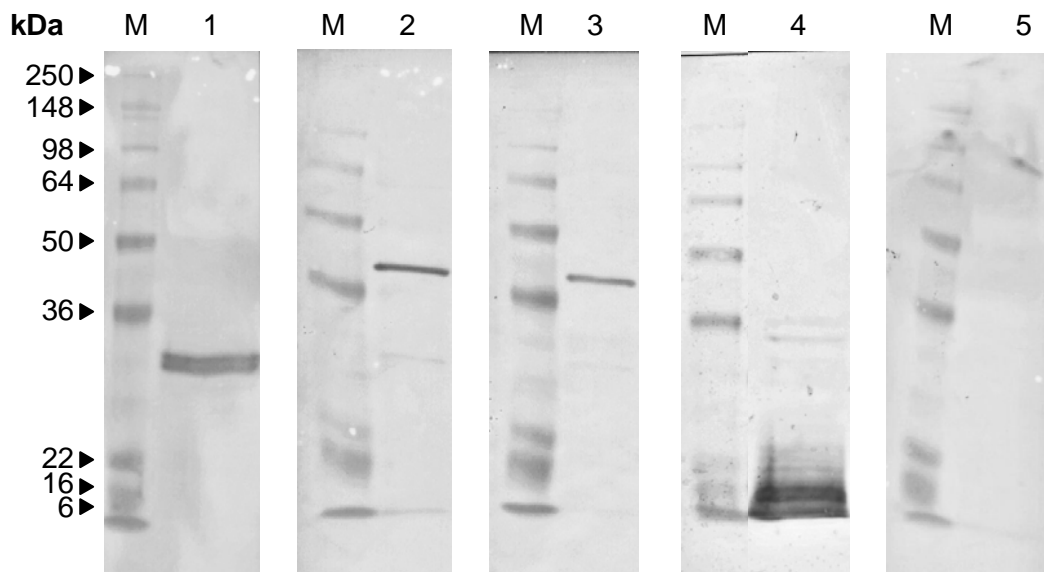


Abbildung 14: OMP-Detektion in einem Ganzzelllysat von *B. hyodysenteriae* (Stamm B204) durch rOMP-spezifische Antiseren vom Kaninchen im Immunoblot

Erläuterungen: Einsatz der Antiseren 1: 500 [v/v],
Antigen: 5 μ l Ganzzelllysat von *B. hyodysenteriae* Stamm B204 je Spur
1 = Anti-rBhlp29,7d (CH077),
2 = Anti-rBhmp39f, (CH080)
3 = Anti-rBhmp39h, (CH081)
4 = Anti-rBhlp16, (CH078)
5 = Anti-Negativkontrolle (CH079),
M = Molekularmassenstandard (SeeBlue[®] Plus2).

4.3.3 OMP-Detektion in Ganzzelllysaten der neun *B. hyodysenteriae* - Serotyp-Referenzstämme durch die rOMP-spezifischen Antiseren vom Kaninchen

Außerdem sollte getestet werden, ob die in Kaninchen hergestellten Hyperimmunsereen gegen äußere Membranproteine auch in der Lage sind, die entsprechenden Proteine bei *B. hyodysenteriae*-Isolaten anderer Serotypen zu erkennen. Hierfür wurden von den *B. hyodysenteriae*-Serotypstämmen 1 bis 9 hitzeinaktivierte Ganzzelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und die Seren im Immunoblot-Verfahren getestet. Wie aus **Abbildung 15** hervorgeht, wiesen alle 9 Serotyp-Referenzstämme von *B. hyodysenteriae* in der für einen anschließenden Westernblot durchgeführten SDS-PAGE ein vergleichbares Bandenmuster auf. Auffällig war lediglich eine sich durch ihre Intensität von den anderen Stämmen abhebende Bande bei Stamm B169 (Spur 3) im Bereich von 55-60 kDa.

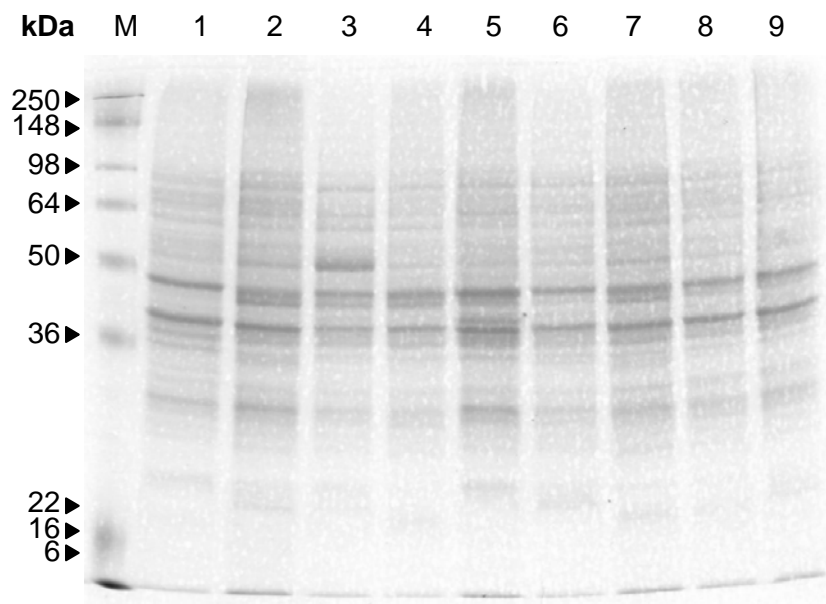


Abbildung 15: SDS-PAGE von Ganzzelllysaten der neun *B. hyodysenteriae*-Serotyp-Referenzstämme

Erläuterungen: 12,5 %iges SDS-PAGE-Gel nach Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung, Antigenauftrag je 10 µg Gesamtprotein/Spur

1 = *B. hyodysenteriae* Stamm B78 (Serotyp 1),

2 = *B. hyodysenteriae* Stamm B204 (Serotyp 2),

3 = *B. hyodysenteriae* Stamm B169 (Serotyp 3),

4 = *B. hyodysenteriae* Stamm A1 (Serotyp 4),

5 = *B. hyodysenteriae* Stamm B8044 (Serotyp 5/2),

6 = *B. hyodysenteriae* Stamm B6933 (Serotyp 6/1),

7 = *B. hyodysenteriae* Stamm ACK300/8 (Serotyp 7/2),

8 = *B. hyodysenteriae* Stamm Vic2 (Serogruppe H),

9 = *B. hyodysenteriae* Stamm NSW1 (Serogruppe J),

M = Molekularmassenstandard (SeeBlue® Plus2)

Abbildung 16A vermittelt, dass das rBhlp29,7d-Antiserum (CH077) bei allen getesteten Serotyp-Referenzstämmen eine deutliche Bande bei ca. 30 kDa detektierte. Bei den Stämmen B204 und ACK300/8 war in diesem Größenbereich allerdings eine deutliche Doppelbande vorhanden.

Bei Einsatz des rBhlp16-Antiserums (CH078, **Abbildung 16B**) waren die entsprechenden Banden nicht ganz deutlich begrenzt und zudem interessanterweise je nach Serotyp von unterschiedlicher Farbintensität. Während die Stämme B78, B204, A1 und ACK300/8 starke Signale aufwiesen, war bei Stamm B169 nur eine schwache und bei den Stämmen B6933, Vic2 und NSW1 eine als sehr schwach zu bezeichnende Reaktion im Immunoblot nachweisbar. B8044 war der einzige Stamm, bei dem auch in Wiederholungsversuchen keine 16 kDa-Bande von dem Antiserum gegen das rBhlp16 detektiert werden konnte.

Die Antiseren gegen rBhmp39f (CH080, **Abbildung 17A**) und rBhmp39h (CH081, **Abbildung 17B**) reagierten bei allen Serotyp-Referenzstämmen mit einer Bande von der gewünschten Größe. Mit dem Anti-rBhmp39f ergaben sich augenscheinlich übereinstimmende Bandenstärken, wogegen unter Verwendung des Anti-rBhmp39h Unterschiede in der Signalstärke zu sehen waren. So war die Bandenintensität der Stämme B169 und A1 geringer, als die der anderen Stämme. Weiterhin zeigte sich bei Stamm B8044 eine deutliche Doppelbande. Von beiden Antiseren wurde je nach Stamm noch eine Zahl von bis zu 4 zusätzlichen Banden erkannt, die bestimmte Muster bildeten. Interessant ist zudem das Auftreten einer schwachen Bande bei etwa 60 kDa, die bei fast allen Stämmen präsent war.

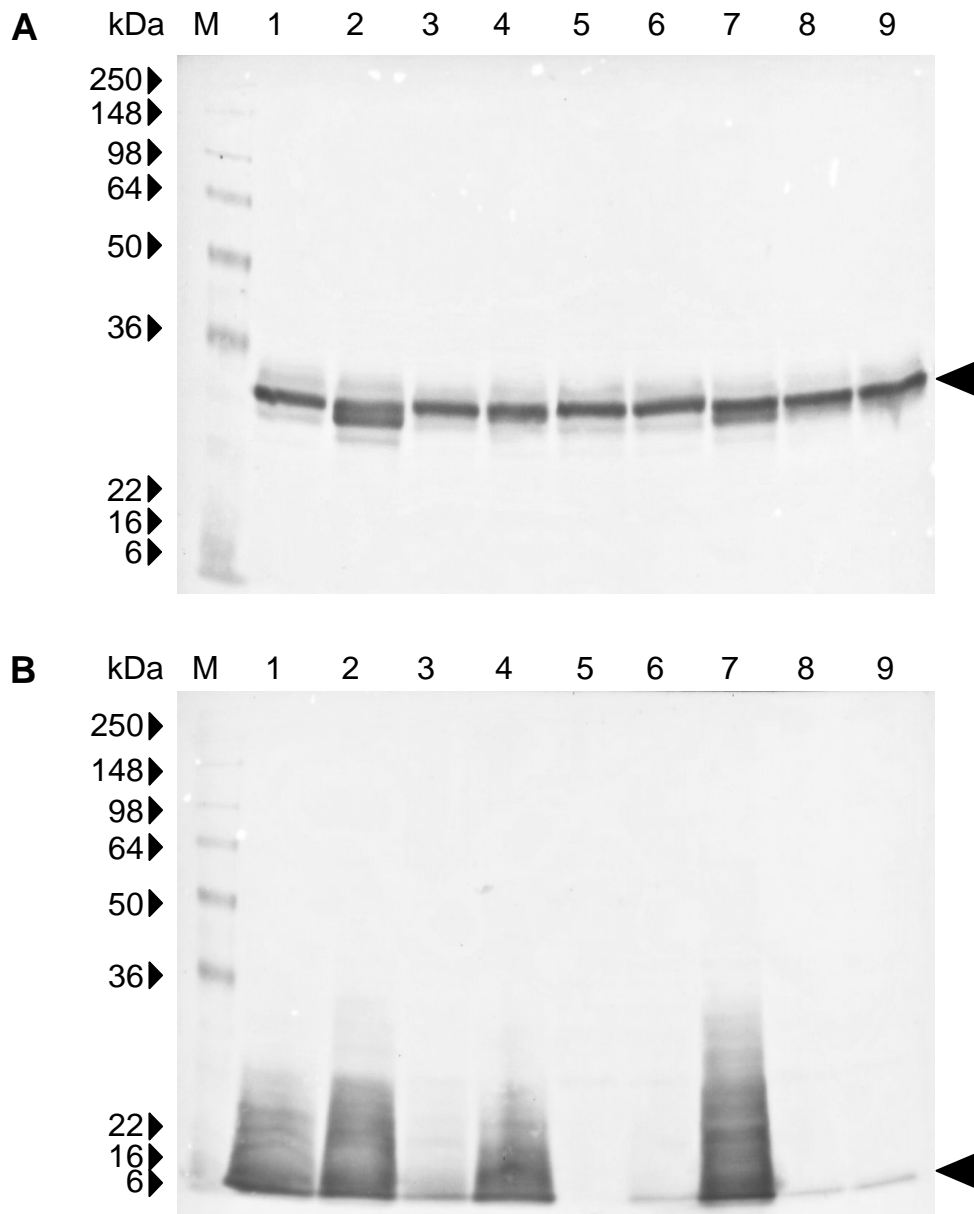


Abbildung 16: OMP-Detektion in Ganzzelllysaten der neun *B. hyodysenteriae* Serotypstämme durch rBhlp29,7d- (A) und rBhlp16-(B) spezifische Antiseren vom Kaninchen im Immunoblot

Erläuterungen:

Verdünnung der Antiseren 1:500 [v/v],
Antigenauftrag 10 µg Gesamtprotein/Spur
1 = *B. hyodysenteriae* Stamm B78 (Serotyp 1),
2 = *B. hyodysenteriae* Stamm B204 (Serotyp 2),
3 = *B. hyodysenteriae* Stamm B169 (Serotyp 3),
4 = *B. hyodysenteriae* Stamm A1 (Serotyp 4),
5 = *B. hyodysenteriae* Stamm B8044 (Serotyp 5/2),
6 = *B. hyodysenteriae* Stamm B6933 (Serotyp 6/1),
7 = *B. hyodysenteriae* Stamm ACK300/8 (Serotyp 7/2),
8 = *B. hyodysenteriae* Stamm Vic2 (Serogruppe H),
9 = *B. hyodysenteriae* Stamm NSW1 (Serogruppe J),
M = Molekularmassenstandard (SeeBlue® Plus2)
◀ = gewünschtes Protein

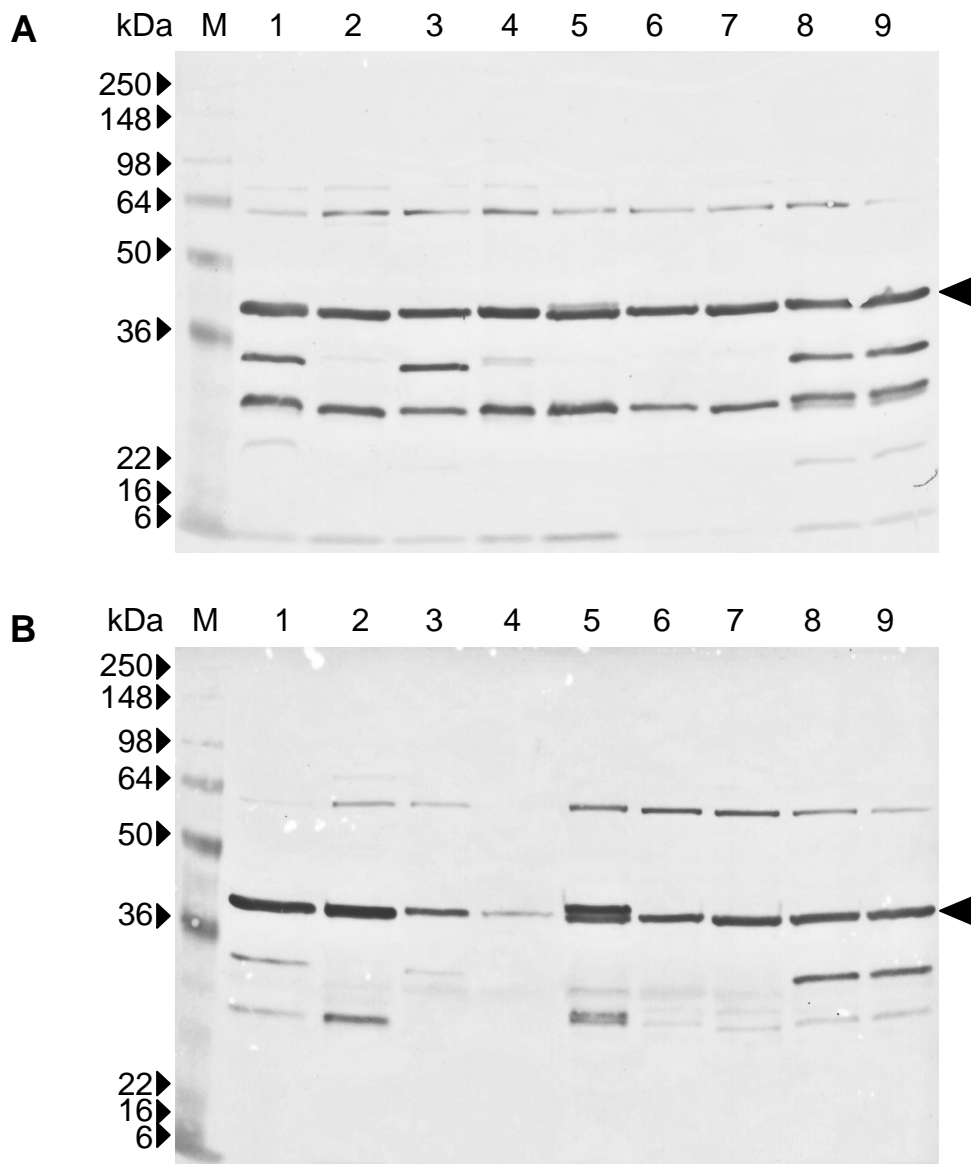


Abbildung 17: OMP-Detektion in Ganzzelllysaten der neun *B. hyodysenteriae* Serotypstämme durch rBhmp39f- (A) und rBhmp39h-(B) spezifische Antiseren vom Kaninchen im Immunoblot

Erläuterungen:

Verdünnung der Antiseren 1:500 [v/v],
 Antigenauftrag 10 µg Gesamtprotein/Spur
 1 = *B. hyodysenteriae* Stamm B78 (Serotyp 1),
 2 = *B. hyodysenteriae* Stamm B204 (Serotyp 2),
 3 = *B. hyodysenteriae* Stamm B169 (Serotyp 3),
 4 = *B. hyodysenteriae* Stamm A1 (Serotyp 4),
 5 = *B. hyodysenteriae* Stamm B8044 (Serotyp 5/2),
 6 = *B. hyodysenteriae* Stamm B6933 (Serotyp 6/1),
 7 = *B. hyodysenteriae* Stamm ACK300/8 (Serotyp 7/2),
 8 = *B. hyodysenteriae* Stamm Vic2 (Serogruppe H),
 9 = *B. hyodysenteriae* Stamm NSW1 (Serogruppe J),
 M = Molekularmassenstandard (SeeBlue® Plus2)
 ◀ = gewünschtes Protein

4.4 Adhäsionsversuche

4.4.1 Adhäsion der Brachyspiren an Darmepithelzelllinien von Schwein, Ratte und Mensch

Die qualitativen Versuche zur Bemessung der Eignung von Darmepithelzellen unterschiedlicher Herkunft für das Studium der Zelladhärenz von *B. hyodysenteriae* belegten eindeutig, dass der Erreger unter sehr stringenten Bedingungen an die IEC-18- wie auch an die IPEC-J2-Zellen adhärierte, nicht jedoch an die humanen HRT-18-Zellen. In **Abbildung 20** sind jeweils repräsentative Ausschnitte wiedergegeben, die das Adhäsionsmuster an diese Zelllinien dokumentieren. Basierend auf diesem Ergebnis wurden alle weiteren Versuche daher nur mit IEC-18- oder IPEC-J2-Zellen durchgeführt.

4.4.2 Hemmung der Adhärenz von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 durch Rekonvaleszentenserum von Schweinen und Ganzzelllysate von IEC-18 und IPEC-J2-Zellen

Bei Verwendung eines im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten quantitativen Auswertungsverfahrens zur Bemessung der Adhäsion der Bakterien- an die Zellkulturzellen, wurden für die beiden animalen Epithelzelllinien eine absolute Adhäsion (Definitionen siehe **Kapitel 3.6.2**) von ca. 19 Bakterien- pro 100 Zellkulturzellen (IPEC-J2) und ca. 22 Bakterien- pro 100 Zellkulturzellen (IEC-18) nachgewiesen. Nach Vorinkubation der Brachyspiren mit dem Antiserumpool (**Tabelle 11**) wurde die Adhärenz bei beiden Kulturzellen hoch signifikant ($p < 0,001$) gehemmt (**Abbildung 18**). Diese Hemmwirkung war bei den IPEC-J2-Zellen höher (Adhäsionsreduktion um 92,7 %) als in den Versuchen mit den IEC-18-Zellen (Adhäsionsreduktion um 62,8 %) und ist beispielhaft anhand repräsentativer Ausschnitte für die IPEC-J2-Zellen in **Abbildung 21** dargestellt. Auch eine Vorinkubation mit Ultraschalllysaten aus IEC-18- und IPEC-J2-Zellen führte zu einer signifikanten Hemmung der bakteriellen Adhäsion an IEC-18-Zellen (**Abbildung 18**). Dabei zeigte sich, dass die Adhäsion bei dem homologen Ganzzelllysate mit ca. 3 Bakterien pro 100 Zellen geringer ausfiel als bei dem IPEC-J2-Ganzzelllysate mit ca. 7 Brachyspiren pro 100 Zellen.

Mit zunehmender Verdünnung des Antiserumpools von 1:50 [v/v] über 1:100 [v/v], 1:300 [v/v] bis 1:500 [v/v] reduzierte sich die Hemmwirkung bei Versuchen an den IPEC-J2 Zellen entsprechend und betrug bei dem in einer Konzentration von 1:500 [v/v] verwendeten Serum nur noch weniger als die Hälfte (Adhäsionsreduktion von 43,5%) der bei der Serumverdünnung von 1:50 [v/v] vorhandenen Adhäsionsreduktion von 92,7%. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in **Abbildung 19** dargestellt.

absolute Adhäsion

[Anzahl Brachyspiren / 100 Zellen]

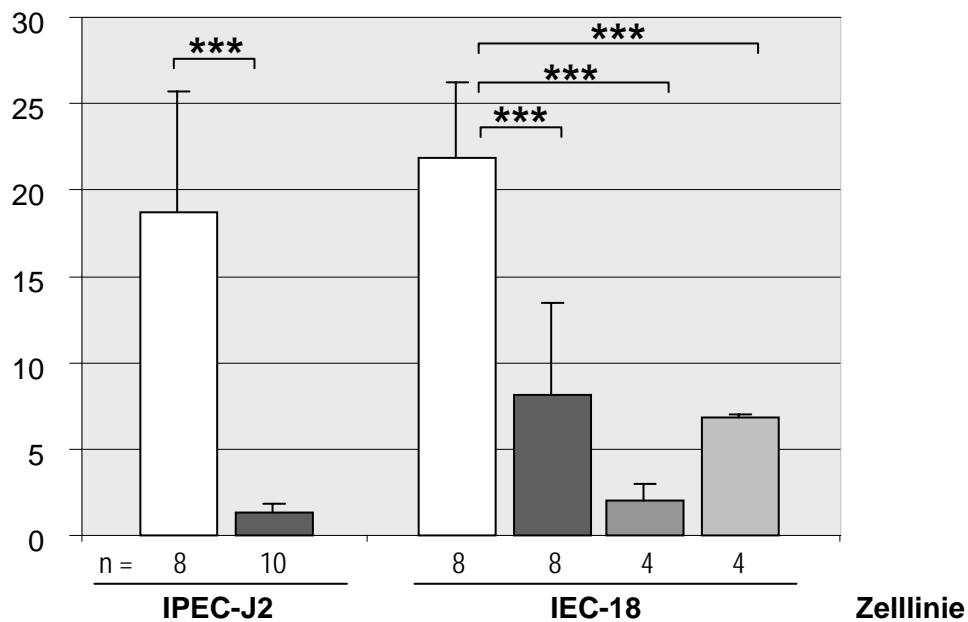


Abbildung 18: Adhäsion von *B. hyodysenteriae* an IPEC-J2- und IEC-18-Zellen nach Vorinkubation (20 min) mit dem Antiserumpool vom Schwein (■) IEC-18- (▒) und IPEC-J2-Ganzzelllysate (▓) sowie PBS (□) als Kontrolle

Erläuterungen: Mittelwert und Standardabweichung, n = Anzahl der Versuche

absolute Adhäsion

[Anzahl Brachyspiren / 100 Zellen]

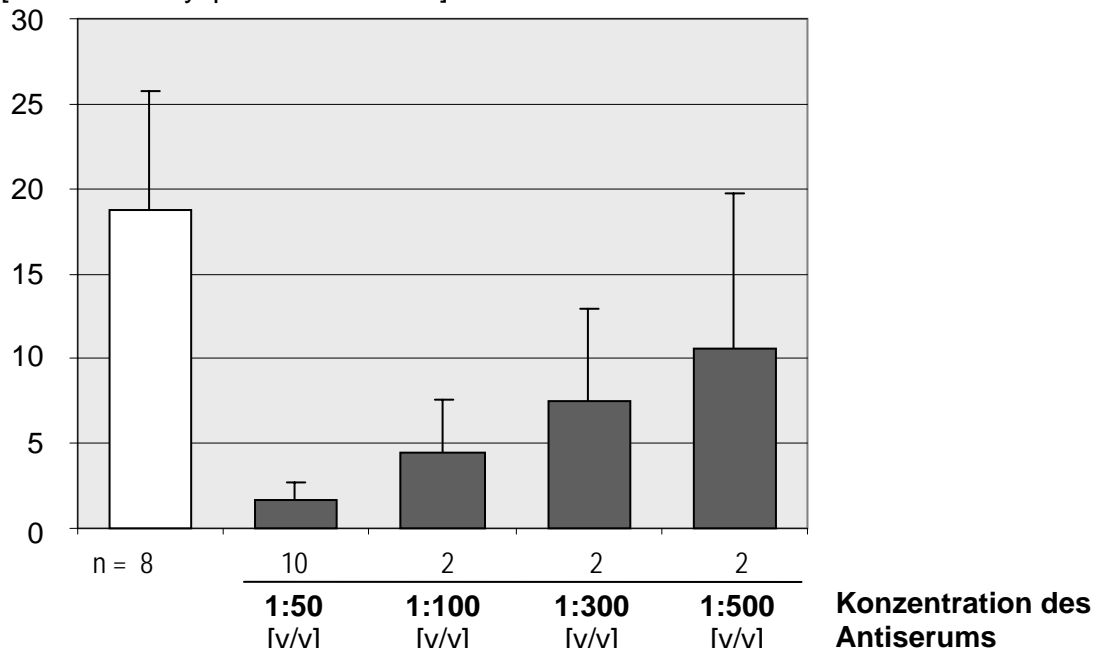


Abbildung 19: Adhäsion von *B. hyodysenteriae* an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation (20 min) mit verschiedenen Verdünnungen des Antiserumpools vom Schwein (■) und PBS (□) als Kontrolle

Erläuterungen: Mittelwert und Standardabweichung, n = Anzahl der Versuche

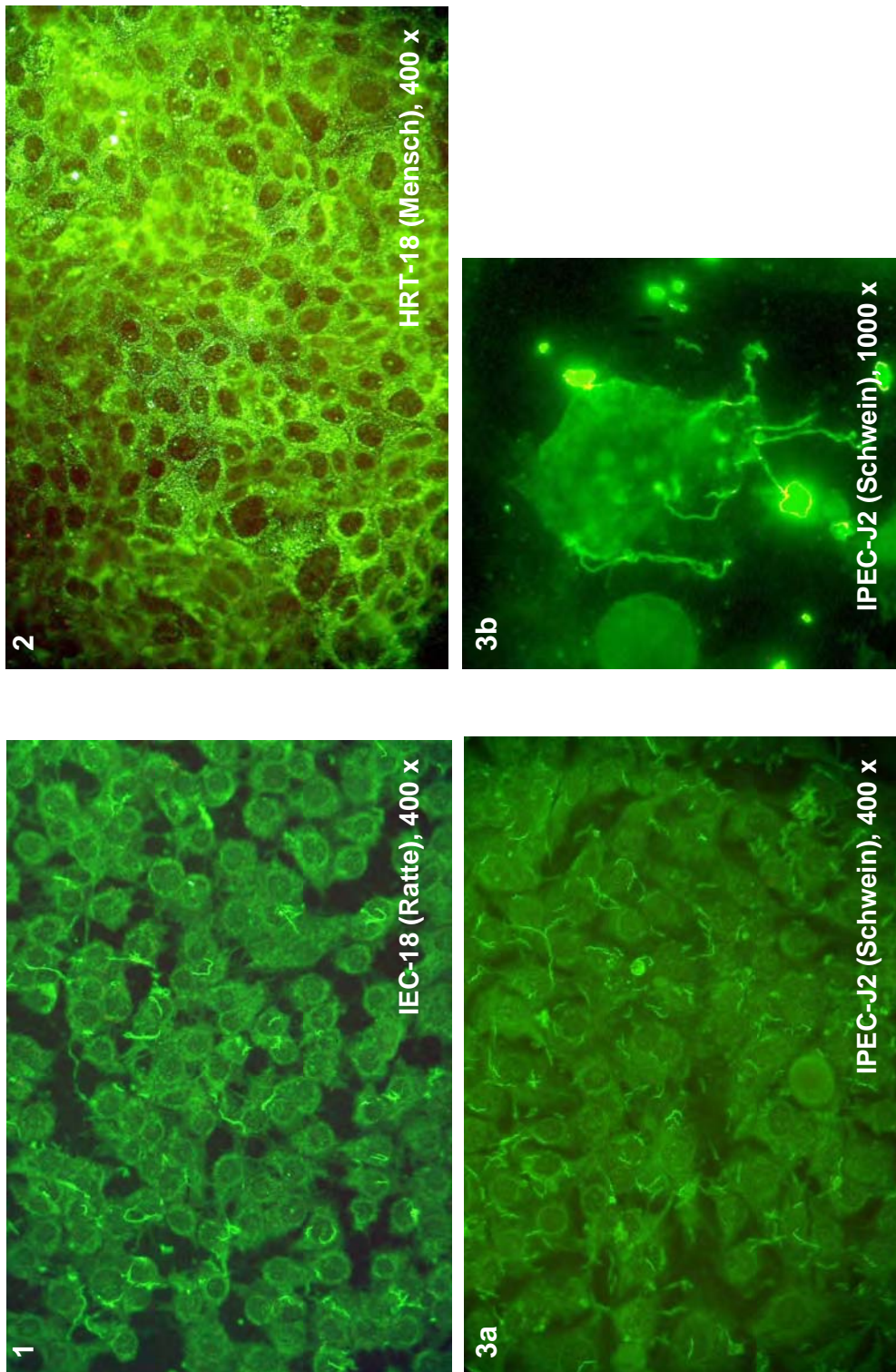


Abbildung 20: Darstellung der Adhäsion von *B. hyodysenteriae* Stamm B204 an verschiedene Darmepithelzelllinien mittels indirekter Immunfluoreszenz

Erläuterungen: 1 = Inokulationstiter $10^{7,25}$ WbE₅₀/ml, 2 = Inokulationstiter $10^{7,5}$ WbE₅₀/ml, 3a, 3b = Inokulationstiter $10^{10,5}$ WbE₅₀/ml

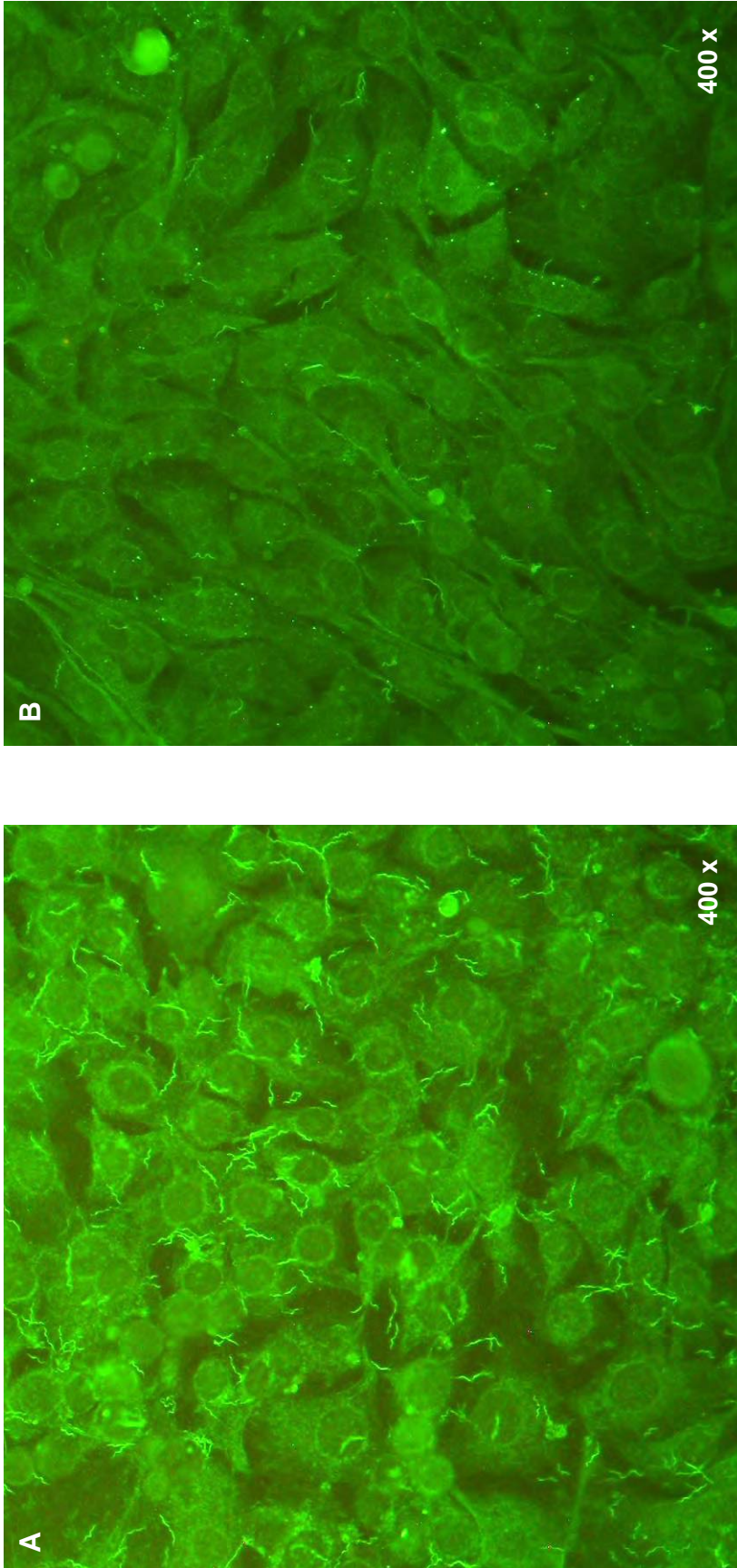


Abbildung 21: Darstellung der Adhäsion von *B. hyodysenteriae* Stamm B204 an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit PBS (A) und dem Antiserumpool vom Schwein (B, 20 min, 1:50 [v/v]) mittels indirekter Immunfluoreszenz

Erläuterungen: Inokulationstiter $10^{10,5}$ WbE₅₀/ml

4.4.3 Hemmung der Adhäsion von *B. hyodysenteriae* (Stamm B204) an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit den rOMP-spezifischen Antiseren vom Kaninchen

Alle gewonnenen polyklonalen Kaninchenantisera gegen die einzelnen rOMPs von *B. hyodysenteriae* bewirkten in dem mit den IPEC-J2-Zellen und *B. hyodysenteriae* Stamm B204 etablierten Zellkulturadhärenzmodell eine signifikante Hemmung der Adhäsion der Bakterienzellen (**Abbildung 22**). Anti-rBhlp29,7d (CH077) wies mit einer Adhäsionshemmung von 29,3 % die geringste Wirksamkeit auf. Es folgten Anti-rBhlp16 (CH078) mit 58,6 %, sowie Anti-rBhmp39f (CH080) und Anti-rBhmp39h (CH081) mit 70 %, bzw. 74 %. Die Adhäsionshemmung der Positivkontrolle (Antiserumpool) übertraf mit 86,6 % jedoch die der vorab genannten Seren. Die vor Immunisierung entnommenen Seren, wie auch das Serum des mit der Negativkontrolle (Stamm MR0, leerer Vektor pASK-IBA3plus) geimpften Kaninchens, zeigten hingegen kein signifikantes Hemmvermögen bezogen auf die PBS-Kontrolle.

Bei der anschließenden Untersuchung verschiedener Kombinationen der rOMP-spezifischen Antiseren wurde deutlich, dass nicht nur die Antiseren gegen die einzelnen rOMPs, sondern auch die verschiedenen Kombinationen die Adhäsion von *B. hyodysenteriae* (Stamm B204) an IPEC-J2-Zellen signifikant hemmten (**Abbildung 23**). Anti-rBhlp16 und Anti-rBhmp29,7d bewirkten z. B. in der Mischung gleicher Anteile miteinander eine wesentlich stärkere Adhäsionsreduktion (77,6 %) als bei Verwendung als Einzels Serum. Diese wiesen lediglich Adhäsionsreduktionen von 58,6 % und 29,3 % auf. Hoch interessant war, dass alle Mixturen, die Anti-rBhlp16 und Anti-rBhmp39f enthielten mit 87,7 % bis 89 % die höchsten Reduktionsraten induzierten und damit eine vergleichbar hohe Adhäsionsreduktion der Anheftung verursachten wie die Positivkontrolle mit 86,6 %. Für eine abschließende Klärung der Frage nach einer möglichen serotypübergreifenden Hemmung der Adhäsion fand aufgrund dieser Ergebnisse die Antiserummischung aus Anti-rBhlp16 plus Anti-rBhmp39f Anwendung (**Kapitel 4.4.4**).

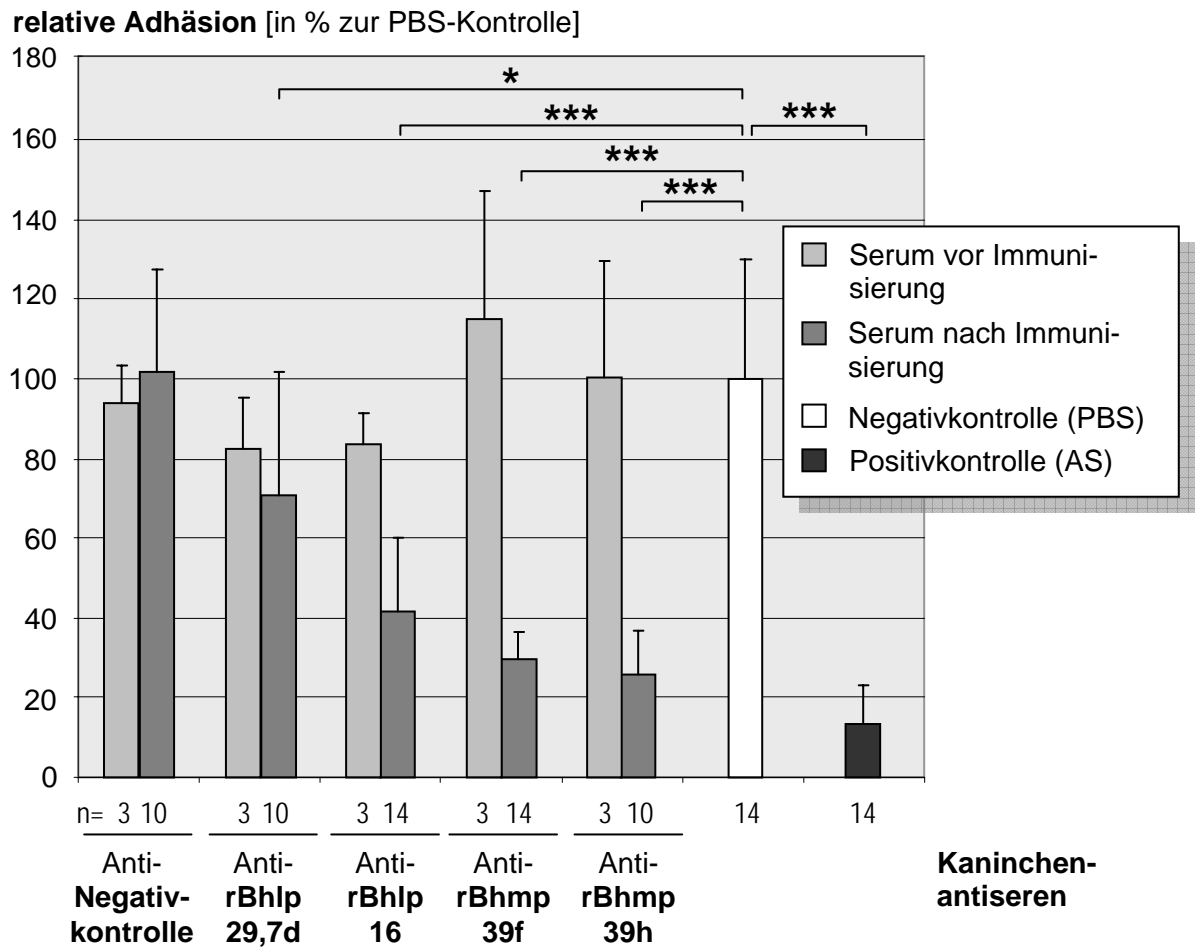


Abbildung 22: Relative Adhäsion von *B. hyodysenteriae* (Stamm B204) an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit den einzelnen rOMP-spezifischen Antiseren vom Kaninchen (20 min, 1:50 [v/v]) in Relation zur PBS-Kontrolle

Erläuterungen: Mittelwert und Standardabweichung, **AS** = Antiserumpool; **n** = Anzahl der Versuche

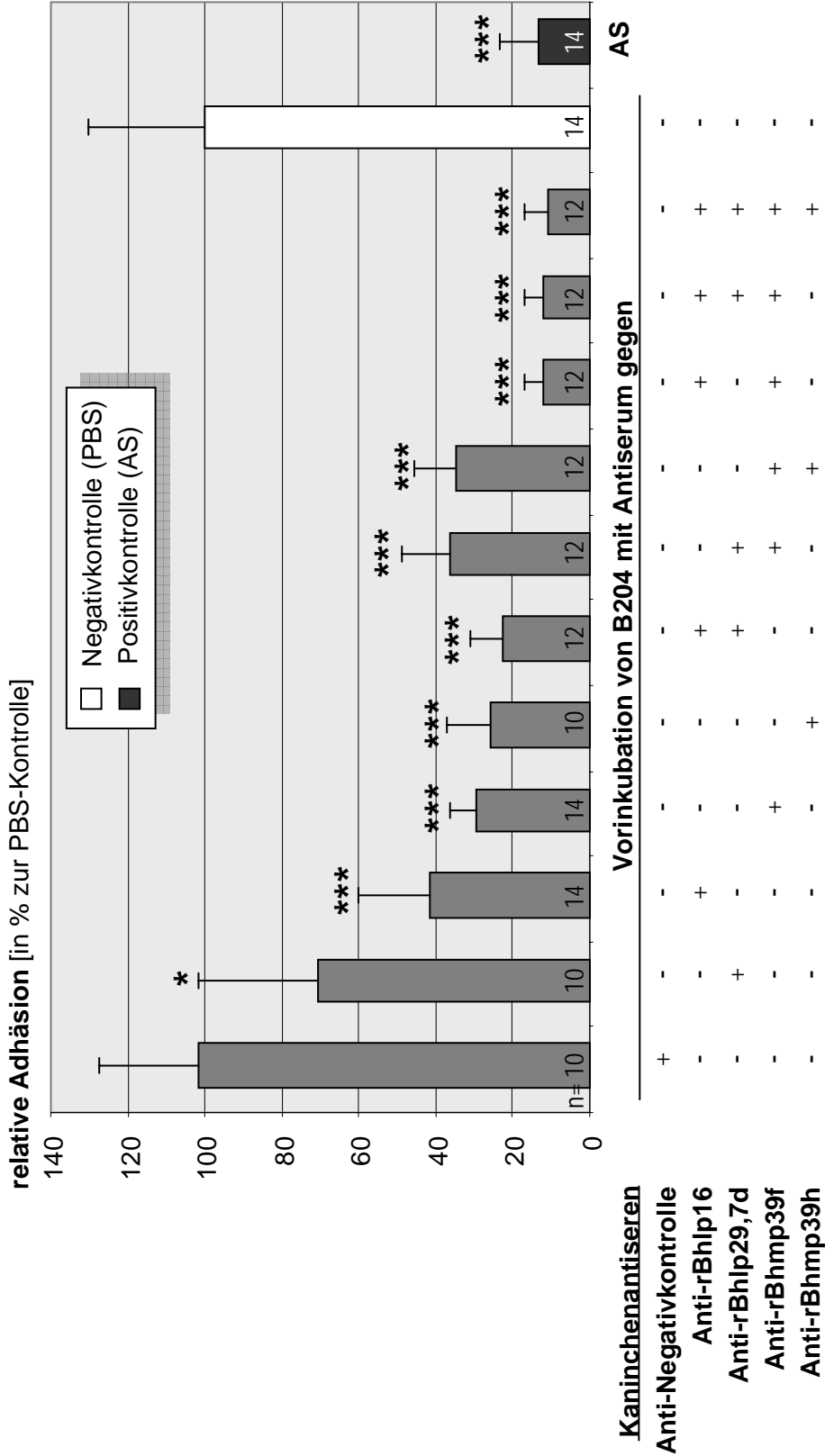


Abbildung 23: Relative Adhäsion von *B. hyodysenteriae* (Stamm B204) an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit den rOMP-spezifischen Antiseren vom Kaninchen, einzeln und in Kombination (20 min, 1:50 [v/v])

Erläuterungen: Mittelwert und Standardabweichung, Signifikanzangaben bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrolle, AS = Antiserumpool; n = Anzahl der Versuche

4.4.4 Hemmung der Adhäsion der neun *B. hyodysenteriae* Serotyp-Referenzstämme an IPEC-J2-Zellen durch Anti-rBhlp16 (CH078) plus Anti-rBhmp39f (CH080)

Die zur Bearbeitung dieser Frage erforderliche Fähigkeit der diversen *B. hyodysenteriae* Serotyp-Referenzstämme zur Adhäsion an IPEC-J2-Zellen war durch Vorversuche belegt. Wie aus **Tabelle 18** hervorgeht, adhärten alle Serotypen an die Epithelzelllinie vom Schwein. Interessanterweise war jedoch die Anzahl der adhärten Brachyspiiren pro 100 Zellen je nach Referenzstamm sehr unterschiedlich. Besonders auffällig war die enorm hohe Zahl adhärter Bakterien des Stammes A1.

Die Vorinkubation der *B. hyodysenteriae* Serotypreferenzstämme mit Anti-rBhlp16 plus Anti-rBhmp39f führte nach Prüfung im Zellkulturadhärenzmodell mit IPEC-J2-Zellen zu einer Hemmung der Adhäsion aller 9 Serotypen. Aus **Abbildung 24** wird ersichtlich, dass das Ausmaß dieser Adhäsionsreduktion von 53 % bis 91% reichte, stets bezogen auf den Mittelwert der jeweiligen PBS-Kontrolle. Sehr hohe Reduktionsraten erfuhren neben dem Stamm B204 (84 %), der den homologen Partner zu der Antiserummischung darstellte, die Stämme A1 (91 %) und ACK300/8 (87 %). Nur geringfügig schwächer wurde Stamm B8044 an der Zelladhäsion gehemmt (78 %). Eine ca. 70 % umfassende Adhäsionsreduktion lag bei den Stämmen B78 (70 %), B169 (71 %) und dem australischen Stamm NSW1 (67 %) vor. Bei dem zweiten australischen Stamm (Vic2) induzierte die Serumkombination eine Adhäsionsreduktion von 62%. Von geringstem Einfluss war das Antiserum dagegen auf die Adhärenz des Stammes B6933 (Adhäsionsreduktion von 53 %). Die Adhäsionsreduktion ist beispielhaft anhand repräsentativer Ausschnitte für die Stämme A1 und B8044 in **Abbildung 25** dargestellt.

Tabelle 18: Adhäsion der *B. hyodysenteriae*-Referenzstämme an IPEC-J2-Zellen

Stamm	Serotyp/ -gruppe	Titer [WbE ₅₀ /ml]	Anzahl der Versuche	Anzahl Brachyspiiren / 100 Zellen	
				Mittelwert	Standardabweichung
B78	1	10 ^{8,75}	2	25	0,76
B204	2	10 ⁷	4	33	1,94
B169	3	10 ⁸	2	27	4,66
A1	4	10 ^{8,5}	2	211	5,64
B8044	5/2	10 ^{8,5}	2	107	5,12
B6933	6/1	10 ¹⁰	2	51	5,97
ACK300/8	7/2	10 ^{7,5}	2	119	12,1
Vic2	H	10 ⁸	2	53	0,48
NSW1	J	10 ⁸	2	55	7,83

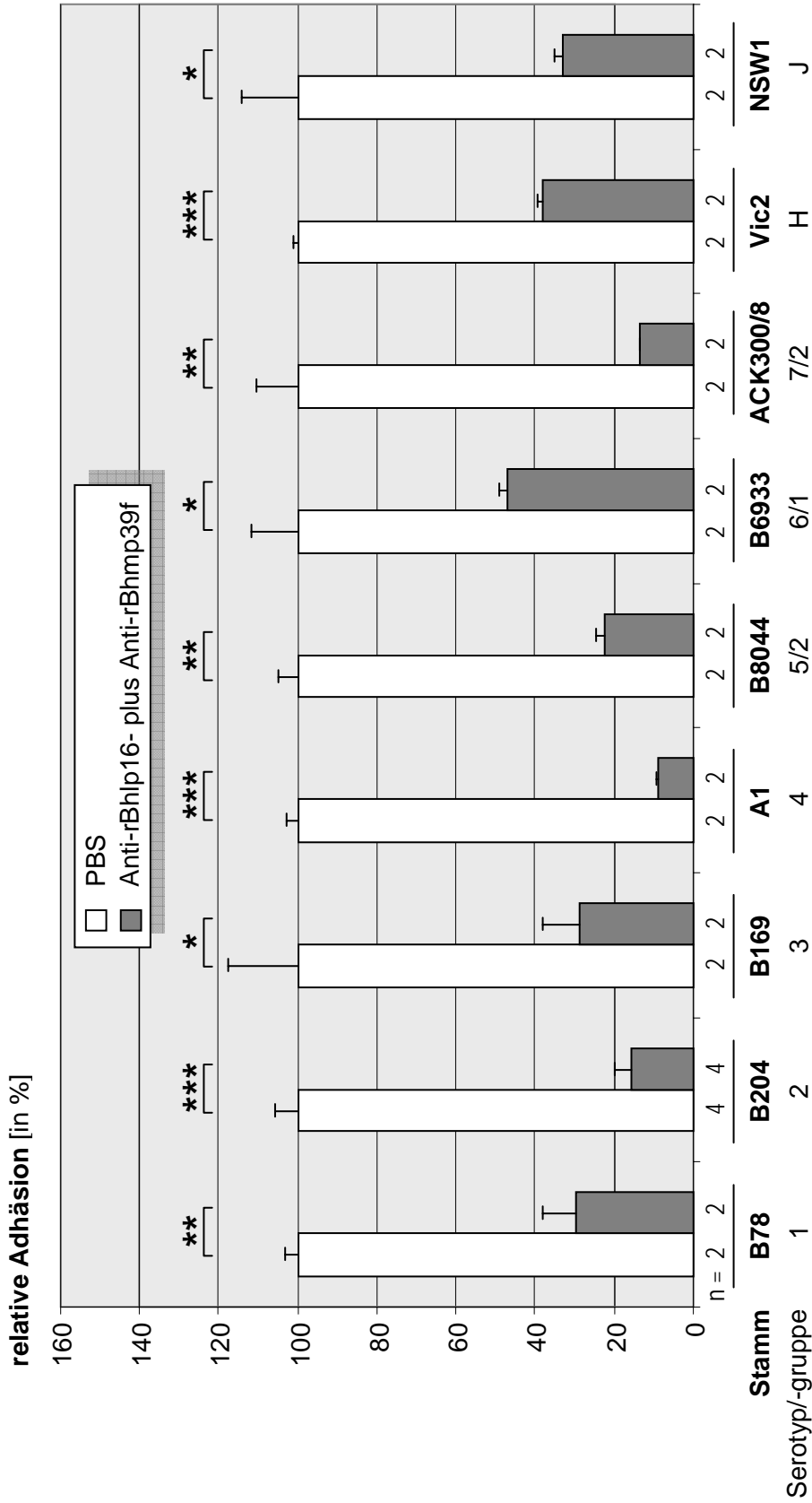


Abbildung 24: Relative Adhäsion der *B. hyodysenteriae*-Serotyp-Referenzstämmen an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit PBS und einer Kombination aus Anti-rBhmp16 plus Anti-rBhmp39f (20 min, 1:50 [v/v])

Erläuterungen: Mittelwert und Standardabweichung, n = Anzahl der Versuche

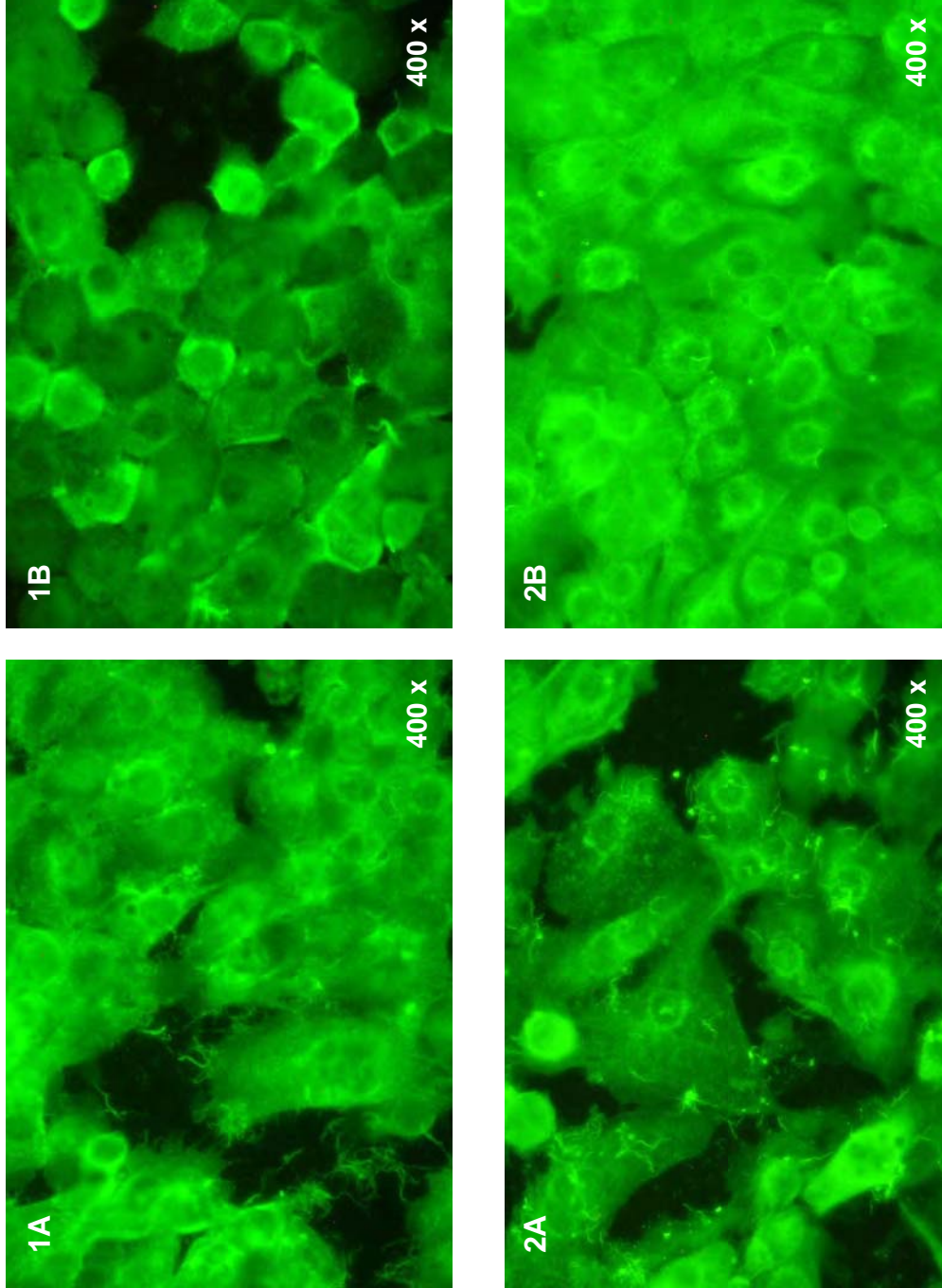


Abbildung 25: Darstellung der Adhäsion von *B. hyodysenteriae* Stamm A1 (1) und B8044 (2) an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit PBS (A) und einer Kombination aus Anti-rBhlp16 plus Anti-rBhmp39f (B, 20 min, 1:50 [v/v]) mittels indirekter Immunfluoreszenz

5 DISKUSSION

In vitro Untersuchungen lassen auf die Existenz einer Erreger-Wirtszellinteraktion als einer der ersten Stadien im Rahmen der Pathogenese der Dysenterie schließen. Nach experimentellen Untersuchungen adhäriert *B. hyodysenteriae* an Epithelzellen (7, 62, 120). Im Rahmen der Frage nach den Vermittlern dieser Interaktionen zwischen Erreger und Wirt erscheinen äußere Membranproteine von *B. hyodysenteriae*, ihrer exponierten Lage in der Zellwand zufolge, als sehr interessante Forschungsobjekte. Dieser Gedankengang bildete die Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen. Nachdem mit ersten eigenen Experimenten eine Anheftung an Epithelzellen nachweisbar war, sollte untersucht werden, ob Antikörper gegen bekannte OMPs von *B. hyodysenteriae* diese Adhärenz hemmen können. Danach war im Hinblick auf die Frage nach dem Grad der Konserviertheit dieser vermuteten biologischen Eigenschaft zu prüfen, ob eine Adhäsionshemmung auch bei allen anderen Serotypen/-gruppen von *B. hyodysenteriae* auftritt.

Die Gewinnung spezifischer Antikörper gegen vier ausgewählte OMPs von *B. hyodysenteriae* (Bhlp29,7d, Bhmp39f, Bhmp39h und Bhlp16) erfolgte durch Immunisierung mit rekombinant hergestellten Proteinen. Diese Strategie versprach sichereren und schnelleren Erfolg als die sehr zeitaufwändige und vom Experimentiergeschick abhängige Produktion monoklonaler Antikörper. Gleichfalls dürften in Anbetracht der geplanten funktionellen Untersuchungen polyklonale Antikörper aufgrund der Erkennung mehrerer Epitope auf den Proteinen weitaus vorteilhafter sein als monoklonale Antikörper. Die Frage, ob Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation bei *E. coli* und den Brachyspiren Bedeutung für die Spezifität der induzierten Antikörper besitzen, blieb hier unberücksichtigt.

Herstellung rekombinanter äußerer Membranproteine (rOMPs) von *B. hyodysenteriae*.

Die für die o. a. Proteine kodierenden Gene konnten erwartungsgemäß alle spontan in *E. coli* kloniert werden. Nach Sequenzierung der Inserts waren jedoch besonders die großen Gene *bhmp39f* und *bhmp39h* bei vielen Klonen fehlerhaft. Ursache hierfür war sehr wahrscheinlich die Verwendung einer Polymerase ohne „proof-reading-activity“. Bei der Expression der Proteine war darüber hinaus nach säulenchromatographischer Aufreinigung im Westernblot eine deutliche Zusatzbande bei etwa 25 kDa vorhanden, manchmal auch eine schwache Bande bei etwa 16 kDa. Da diese Banden jedoch auch bei der Negativkontrolle (Expression des Stammes MR0) auftraten (**Abbildung 9**), stammten sie aller Wahrscheinlichkeit nach von dem Empfängerorganismus. Diese Annahme bestätigte sich. Nach Auskunft des Herstellers (Fa. IBA) handelt es sich bei dem ca. 25 kDa großen Protein um das Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP) von *E. coli*. Dieses bindet wesentlich effizienter an Strep-

Tactin, als das Strep-Tag selbst. Daher fehlte auch eine entsprechende Bande im Coomassie-gefärbten Gel. Das kleinere Protein ist nach Literaturrecherche wahrscheinlich eine degradierte Form des BCCP (88, 99). Alternativ hätte die Möglichkeit bestanden, die BCCP-Kontamination durch Zusatz von Avidin zu verhindern. Auch die Wahl eines anderen Expressionssystems wurde erwogen. Da aber in beiden Fällen ein Erfolg nicht sicher vorauszusehen war, wurde in Anbetracht des Kosten- und Arbeitsaufwands auf weitere Experimente zur isolierten Aufreinigung der gewünschten Proteine ohne BCCP verzichtet. Hinzu kam, dass die Verwendung der mit dieser Kontamination behafteten rekombinanten Proteine als Antigene zur Herstellung spezifischer Anti-rOMP-Seren in Kaninchen als unproblematisch zu erachten ist.

Was den Expressionserfolg der einzelnen rOMPs anbelangt, unterschieden sich die Ergebnisse erheblich. Die Versuche zur Expression von rBhlp29,7d und rBhlp16 führten zu einer hohen Ausbeute. Weitaus geringere Proteinmengen ergaben sich dagegen für rBhmp39f und rBhmp39h (**Tabelle 16**). Die Expression der letztgenannten Proteine in *E. coli* wurde nach dem Stand des vom Autor bearbeiteten Schrifttums bisher noch nicht beschrieben.

Neben den bereits erwähnten Banden außerhalb der zu erwartenden Größe der rOMPs (s. o.) waren bei den einzelnen aufgereinigten Proteinen weitere Banden nach Westernblot detektierbar. Das rBhlp16 wies neben der ausgeprägten Bande bei 17 kDa noch weitere deutliche Banden auf (**Abbildung 8**). Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Multimere des Proteins. So ist die Bande bei etwa 36 kDa vermutlich ein Dimer, bei 64 kDa ein Tetramer und bei über 250 kDa ein Multimer. Dieses Phänomen ist für einige Lipoproteine zwar bekannt, wurde für Bhlp16 aber bislang nicht beschrieben. Bei *E. coli* z. B. bilden die Lipoproteine der äußeren Membran Wza und BfpB Multimere aus. Wza, ein integrales äußeres Lipomembranprotein, bildet dabei ein SDS-stabiles Octamer und gehört zur Gruppe der Sekretine. Dies sind multimere äußere Membranproteine, die im Allgemeinen aus 6 bis 14 identischen Untereinheiten bestehen und ringähnliche, porenartige Strukturen bilden. Diese Strukturen findet man bei Transportproteinen. Wza vermittelt den Export extrazellulärer Polysaccharide, die beispielsweise für die Kolonisation von Oberflächen benötigt werden (15, 77). Auch das BfpB der enteropathogenen *E. coli* zählt zu den Sekretinen und hat neben seiner Bedeutung für den Typ II Sekretionsapparat sowohl Einfluss auf die Pilus-Biogenese, und damit auf die Adhäsion der Bakterien an epitheliale Zellen, als auch auf die Sekretion bioaktiver Moleküle, die für das Überleben der Bakterien im Darm notwendig sind (86). Ein weiterer Erreger, bei dem Multimere bedeutsam sind, ist *Xanthomonas campestris*. Dieses Bakterium verfügt mit XpsD über ein multimeres Lipoprotein der äußeren Membran, das wahrscheinlich aus 12 XpsD-Polypeptiden zusammengesetzt ist. Auch dieses Protein ist Teil eines Typ II Sekretionsapparates, der zur Ausschleusung von Toxinen oder hydrolytischen Enzymen dient (9, 70). Diesen Verwand-

schaften sollte in Untersuchungen zur Aufklärung der biologischen Bedeutung des Bhlp16 Aufmerksamkeit geschenkt werden. Es ist jedoch auch möglich, dass das rBhlp16 sich lediglich aufgrund der großen Proteinmenge, ohne einer spezifischen Ordnung zu folgen, zusammengelagert hat. Diese Annahme ist allerdings nicht wahrscheinlich, da bei rBhlp29,7d, das in ähnlich hohen Proteinkonzentrationen eluiert wurde, derartige Banden nicht auftraten.

Ein völlig anders geartetes Problem trat bei Expression und Isolierung von rBhmp39f und rBhmp39h auf. Die mit diesem Gen transfizierten Klone stellten schon sehr früh nach Induktion das Wachstum ein (**Abbildung 10**). Aus daraufhin durchgeführten Versuchen mit abnehmenden Konzentrationen des Induktors (**Abbildung 11**) wurde geschlossen, dass die Expressionsprodukte die Vermehrung der *E. coli*-Zellen entweder hemmten oder aber toxisch für die Zellen waren. Dieser Überlegung folgend wurde das vom Hersteller empfohlene Expressionsprotokoll für die entsprechenden Klone (MR2 und MR3) geändert. Auf die Induktion mit 5 µg AHT/100 ml folgte nun nur eine einstündige Vermehrung der Zellen. Entsprechend waren die gewonnenen Proteinmengen je Liter Ausgangskultur weit geringer als bei den anderen Klonen (MR1 und MR4, **Tabelle 16**). Zur Kompensation dieses Mangels wurden pragmatischerweise die Ansätze mehrfach wiederholt und das Volumen zusammengeführter Eluate eingengt. Bei Analyse der Expressionsprodukte der entsprechenden Klone war eine ausgeprägte zusätzliche Bande in der Größenordnung von 60 kDa im coomassiegefärbten SDS-Gel nachweisbar, nicht jedoch nach Westernblot und Färbung mit dem Strep-Tactin HRP-Konjugat (**Abbildung 6**, **Abbildung 7**). Dies deutet daraufhin, dass das Protein selbst keine dem Strep-Tag ähnliche Aminosäuresequenz aufweist, denn sonst müsste es im Westernblot ebenfalls detektierbar sein. Hierbei stellte sich allerdings die Frage, wie es dann über die Strep-Tag-Säule aufgereinigt werden konnte. Nach Auskünften des Herstellers handelt es sich bei dem Protein wahrscheinlich um das sogenannte GroEL (87). Eigene Versuche zur Klärung der Identität dieses Proteins wurden jedoch aus Gründen einer anderweitigen Gewichtung der eigentlichen Fragestellung nicht durchgeführt. GroEL ist ein Hitzeschockprotein (Chaperon) der Hsp60-Familie, das bei Stress vermehrt produziert wird und für das Überleben der *E. coli* essentiell ist. Als Bestandteil des ATP-abhängigen GroE-Systems sichert es die korrekte Faltung von Proteinen, die ihre räumliche Struktur nicht alleine ausbilden können und sonst zur Aggregation neigen (113, 115).

Das schwache Wachstum der Klone MR2 und MR3 und die entsprechend geringe Proteinexpression könnten auf einer durch die mögliche Toxizität von Bhmp39f und Bhmp39h bedingten Produktionssteigerung von Hitzeschockproteinen, wie GroE, beruhen. GroE besteht aus 14 GroEL-Untereinheiten (jede misst 57 kDa), von denen je 7 einen Ring bilden, und mehreren GroES-Untereinheiten (je 10 kDa). Die beiden GroEL-Ringe lagern

sich zu einem Zylinder zusammen, dessen Kuppel aus den GroES-Untereinheiten besteht (Bullet-Form). In Gegenwart von ausreichend ATP kann sich auch die Football-Form ausbilden, bei der an beiden GroEL-Ringen jeweils GroES gebunden wird (113, 115). Eine zylinderförmige Umlagerung der fraglichen rOMPs durch GroEL ist eine schlüssige Erklärung für das Auftreten von GroEL in den Eluaten, da die Haftung an die Säulenmatrix in diesem Fall von dem Strep-Tag der rOMPs vermittelt wird. Voraussetzung für diese Theorie ist, dass das Strep-Tag durch die Anlagerung von GroEL sterisch nicht blockiert ist. Die denaturierenden Bedingungen in der SDS-PAGE führten dann zu einer Trennung von GroEL und den rekombinanten Proteinen. Diese Vorstellungen würden die großen Mengen an 60 kDa-Protein erklären. Immerhin kommen auf ein rekombinantes Proteinmolekül 14 GroEL-Untereinheiten. Folgerichtig konnte das 60 kDa-Protein zwar im Coomassie-gefärbten Gel dargestellt werden, jedoch nicht im Westernblot, da es selbst nicht über das Strep-Tag verfügt.

Verschiedene Versuche zur Entfernung des 60 kDa-Proteins aus den Elutionsfraktionen führten nicht zum gewünschten Erfolg (**Tabelle 15**). Auf eine Neuklonierung wurde jedoch verzichtet, da aller Wahrscheinlichkeit nach Antikörper gegen GroEL, mit deren Auftreten bei Immunisierung von Kaninchen mit den beiden rOMPs zu rechnen ist, keine Bedeutung für die Adhäsion von Brachyspiren haben werden. Selbst wenn Brachyspiren über GroE verfügen sollten, ist es als intrazelluläres Protein wahrscheinlich vor dem Angriff von Antikörpern geschützt.

Prüfung des serologischen Verhaltens der ausgewählten OMPs von *B. hyodysenteriae* mit in Kaninchen hergestellten polyklonalen Antiseren (Anti rOMPs).

Aus den Immunisierungsversuchen an Kaninchen ist zu schließen, dass die in *E. coli* produzierten rOMPs ohne Ausnahme antigene Eigenschaften besitzen. Was das Bhmp39f und Bhmp39h anbetrifft, wurde dies in der vorliegenden Arbeit erstmalig belegt. Alle Kaninchen bildeten innerhalb von insgesamt 4 Antigenapplikationen im Immunoblot detektierbare Antikörper (**Tabelle 17**). Weiterhin belegen diese Untersuchungen, dass es sich bei den ausgewählten Proteinen sehr wahrscheinlich nicht um für Kaninchen toxische Eiweiße handelt. Auch der intravenösen Applikation widerstanden die Tiere ohne jegliche klinische Anzeichen einer Intoxikation. In Anbetracht der fehlenden Kenntnisse zur biologischen Funktion dieser Proteine, werden diese Ergebnisse als nicht unbedeutende Nebenbefunde interpretiert.

Im Rahmen der eigentlichen Fragestellung der Arbeit stand nun zur Diskussion, ob die unter Verwendung des Serotyps 2 von *B. hyodysenteriae* generierten Anti-rOMPs nicht nur mit den entsprechenden Proteinbanden dieses Serotyps reagieren, sondern auch mit denen der verbleibenden 8 Serotyp-Referenzstämme. Diese Frage kann nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen mit „ja“ beantwortet werden. Die Antikörper erkannten nicht nur

die entsprechenden Proteine aus Ganzzellpräparationen des homologen Stamms (**Abbildung 14**) sondern auch die der heterologen Stämme. Bhlp29,7d, Bhlp16, Bhmp39f und Bhmp39h scheinen demnach (sofern bei dem jeweiligen Stamm vorhanden) bei den verschiedenen Serotypen antigenetisch einheitlich zu sein. Dies wurde zwar vermutet, aber bisher von keinem Untersucher in einem der vorliegenden Untersuchung vergleichbaren Umfang gezeigt. Einige Beobachtungen bedürfen, trotz dieser klaren Ergebnislage, dennoch einer eingehenden Interpretation.

Bei der Prüfung des Anti-rBhlp16 auf eine spezifische Reaktion mit dem Bhlp16 aus Ganzzelllysaten waren neben einer etwas prominenteren Bande stets viele weitere Banden nachweisbar (**Abbildung 16B**), unabhängig davon, ob ein gefrorenes oder frisch hergestelltes Antigen verwendet wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Ganzzelllysat möglicherweise im Gegensatz zu dem rekombinanten Protein einer schnelleren Degradation unterliegt. Daneben war die Bandenstärke trotz gleicher Proteinmenge der Stämme sehr unterschiedlich. Der Stamm B8044 (Serotyp 5) wurde von Anti-rBhlp16 überhaupt nicht erkannt. Es ist zu vermuten, dass dieses Protein eine antigene Variabilität besitzt. Dies würde die unterschiedliche Reaktionsintensität des Antiserums verständlich machen. Weiterhin ist bekannt, dass nicht alle Stämme über ein Bhlp16 verfügen (41). Nach eigenen Untersuchungen traf dies lediglich für den Stamm B8044 zu (**Tabelle 14**). Folglich war somit ein Proteinnachweis bei diesem Stamm auch nicht zu erwarten. Dieses Ergebnis spricht gleichzeitig für die hohe Spezifität des hergestellten Anti-rBhlp16.

Das Bhlp29,7d präsentierte sich zwar mit etwa gleicher Bandenintensität bei allen neun Serotypen, jedoch wiesen die Stämme B204 und ACK300/8 Doppelbanden auf (**Abbildung 16A**). Dies könnte mit der Abspaltung des Signalpeptids mit einer Größe von 2,2 kDa erklärt werden.

Was das Bhmp39f anbetrifft, war nach den Ergebnissen der PCR davon auszugehen, dass alle Serotypen das entsprechende Gen besitzen. Anders war die Situation bei *bhmp39h*. Dieses Gen trugen, nach der PCR zu urteilen, anscheinend nur die Serotypstämme B204 und B6933. Im Immunoblot wurden bei allen Serotypen Banden entsprechender Größe durch Anti-rBhmp39f erkannt (**Abbildung 17A**). Dies erschien logisch und entsprach den angesprochenen Erwartungen. Aber eine entsprechende Reaktion, mit Ausnahme von Stamm A1, lag auch bei Anwendung des Anti-rBhmp39h vor (**Abbildung 17B**). Dieses Ergebnis war überraschend, da ja lediglich zwei Stämme sicher über das entsprechende Gen verfügten. Eine mögliche Ursache könnten Kreuzreaktionen innerhalb der Bhmp39 Proteine darstellen. Hierfür sprechen hohe Sequenzhomologien der kodierenden Gene (74). Denkbar ist auch, dass ob der hohen Sequenzvariabilität dieser Gene die gewählten Primer

trotz Vorhandenseins des Gens keine komplementären Sequenzen erkannten. Dies trifft bei Richtigkeit dieser Überlegung somit eher für das *bhmp39h* zu als für das *bhmp39f*.

Für die unter Verwendung von Anti-rBhmp39f und -h im Immunoblot zusätzlich aufgetretenen Banden liegen keine logisch ableitbaren Erklärungen vor. Interessanterweise waren sie je nach Antiserum und Serotyp-Referenzstamm von unterschiedlichem Muster. In Kenntnis der Tatsache, dass die zur Herstellung der Antiseren verwendeten rOMP- Präparationen auch Proteine des Empfängerorganismus enthielten, dürfte es sich bei diesen Banden aller Wahrscheinlichkeit nach um Strukturen (Antigene) handeln, die zwischen *E. coli* und *B. hyodysenteriae* eine hohe Übereinstimmung besitzen und damit kreuzreagieren. Dies könnte z. B. auf die 60 kDa Bande zutreffen, bei der es sich vermutlich um GroEL handelt.

Entwicklung eines *B. hyodysenteriae*-Zellkultur-Adhärenzmodells.

Orientierende Experimente bestätigten die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen zur in vitro Adhärenz von Brachyspiren an Epithelzellmonolayer (7, 62, 120). Von den drei in weiteren Versuchen verwendeten Darmepithelzelllinien (Herkunft: Ratte, Schwein und Mensch) eigneten sich lediglich die vom Tier stammenden Darmepithelzellen. Eine Adhärenz an die humane Zelllinie fand nicht statt (**Abbildung 20**). Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Wilcock et al. (120) und Bowden et al. (7), in denen auch über eine Adhärenz an humane HeLa-Zellen (Zervix) und HIE 407-Zellen (Intestinum) berichtet wurde. Es konnte nicht geklärt werden, warum in den eigenen Versuchen keine Adhärenz erfolgte.

Was die Mechanismen der Adhärenz der Brachyspiren anbetrifft, gibt es keinerlei überzeugende Vorstellungen. Sehr wahrscheinlich liegt dies am geringen wissenschaftlichen Interesse an diesem Phänomen. Dieses mangelnde Interesse rührt sicherlich daher, dass nach histologischen Untersuchungen eine Adhärenz in vivo bisher nicht zu beobachten war. Ein Fehlen morphologischer Korrelate ist jedoch kein die Adhärenz ausschließender Beweis. Nach den vorliegenden Untersuchungen wird die Anheftung der Brachyspiren an die Kulturzellen als ein spezifischer Vorgang angesehen. Hierfür sprechen die fehlende Adhäsion an die humane Zelllinie sowie die Hemmung der Adhärenz nicht nur durch Seren von Rekonvaleszenten sondern auch kompetitiv durch Ultraschallpräparationen der entsprechenden Epithelzellen (**Abbildung 18**). Weiterhin ließ sich die Adhäsionshemmung mit abnehmender Konzentration des Antiserumpools ausverdünnen (**Abbildung 19**). Alle weiteren Versuche zur Hemmung der Adhärenz wurden unter Verwendung der Zelllinie vom Schwein durchgeführt. Damit stand ein homologes System zur Verfügung, das zur Beschreibung von beim Schwein relevanten biologischen Abläufen möglicherweise eher geeignet war, als ein Modell mit Rattenzellen.

Hemmung der in vitro Adhärenz verschiedener *B. hyodysenteriae* Serotypen an Darmepithelzelllinien vom Schwein durch rOMP-spezifische Antiseren vom Kaninchen.

Im Laufe der Immunisierung mit den rOMPs (nach der 5. Immunisierung) führten die Serumproben der als Versuchstiere verwendeten Kaninchen zu einer Hemmung der Adhärenz des homologen Brachyspirenstammes an die Epithelzellen (**Abbildung 22**). Diese Eigenschaft, die weder in den Serumproben vor Immunisierung nachweisbar war, noch nach Immunisierung mit der Negativkontrolle (Proteinexpression von Stamm MR0), wurde demzufolge auf die Ausbildung einer spezifischen humoralen Immunantwort gegen die verabreichten rOMPs zurückgeführt. Interessant war, dass die biologische Aktivität der von den Kaninchen gebildeten Antikörper sehr unterschiedlich ausfiel. Anti-rBhlp29,7d führte zu einer schwach signifikanten, Anti-rBhlp16, Anti-rBhmp39f und Anti-rBhmp39h dagegen zu einer hoch signifikanten Reduktion der Adhäsion.

Die Beobachtung, dass alle erzeugten rOMP-Antiseren eine mehr oder weniger ausgeprägte Adhäsionsreduktion induzierten, lässt vermuten, dass die in vitro vorhandene Adhärenz der Brachyspiren an Zellkulturen einen äußerst komplexen Vorgang darstellt, an dem anscheinend nicht nur ein Oberflächenprotein beteiligt ist, sondern aller Wahrscheinlichkeit nach mehrere. Nach der Höhe der Adhäsionsreduktion zu urteilen, haben die Bhmp39-Proteine hieran sehr wahrscheinlich einen wichtigen Anteil, im Gegensatz zu der eher geringen Bedeutung des Bhlp29,7d.

Basierend auf der These einer multikausalen Vermittlung der Adhärenz wurden diverse Kombinationen von Anti-rOMPs auf ihre Adhäsionshemmung geprüft (**Abbildung 23**). Alle Kombinationen führten zu einer hoch signifikanten Reduktion der Adhäsion, die häufig höher war, als nach Anwendung der einzelnen Seren. Dies spricht für die Richtigkeit der o. a. Vermutung. So induzierten Anti-rBhlp29,7d plus Anti-rBhlp16 eine wesentlich höhere Adhäsionsreduktion (77,57 %) als die beiden Einzelseren alleine (29,25 %, bzw. 58,57 %). Wahrscheinlich sind diese Ergebnisse der additiven Wirkung von Adhäsionsmechanismen zuzuschreiben.

Das interessanteste Ergebnis dieser Versuchsreihe war, dass alle Kombinationen in denen Anti-rBhlp16 und Anti-rBhmp39f gemeinsam vorkamen eine der Positivkontrolle (Rekonvaleszentenserum) vergleichbar hohe Adhäsionsreduktion bewirkten. Eine von diesen Proteinen induzierte Immunantwort war demnach, was die Adhärenzhemmung anbetrifft, vergleichbar mit der nach natürlicher Infektion. Da die Immunantwort nach Feldinfektionen vor den Folgen einer Reinfektion zu schützen vermag, wurde hypothetisiert, dass von einer Impfung unter Verwendung von rBhlp16 und rBhmp39f als Antigenen eine ebensolche Schutzwirkung ausgehen könnte. Diese Hypothese hat in Verbindung mit den nachfolgenden Ausführungen einen ausreichend großen Rückhalt, der ihr die Berechtigung verleiht, zukünftig in tierexperimentellen Versuchen geprüft zu werden.

Aus den anfänglich durchgeführten Untersuchungen wurde abgeleitet, dass die bearbeiteten OMPs serotypübergreifend einheitlich sind. Daraus darf jedoch nicht unbedingt abgeleitet werden, dass dies auch auf die biologischen Funktionen (Adhäsionshemmung) der rOMP-Antiseren zutrifft. In den folgenden Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass die Adhäsionshemmung im Gegensatz zu diesen kritischen Überlegungen, wenn auch in quantitativ unterschiedlichem Ausmaß, serotypübergreifend (**Abbildung 24**) ist. Die unterschiedlichen Stärken der Adhäsionshemmung legen nahe, dass dennoch wahrscheinlich geringe antigene Unterschiede der untersuchten OMPs zwischen den Serotypen existieren.

Weiterhin belegten die Versuche das Vermögen aller untersuchten *B. hyodysenteriae* – Referenzstämme zur Adhärenz an Epithelzellen. Sehr interessant war auch, dass die verschiedenen Stämme sich zum Teil erheblich in ihrem Adhäsionsvermögen unterschieden. Stark ausgeprägt war diese Eigenschaft z. B. bei Stamm A1. Die Adhäsion an IPEC-J2-Zellen war 7-fach höher als die des Stammes B204 und dennoch lag eine Adhäsionsreduktion von 91 % vor (**Tabelle 18**). Überraschend war auch das hohe Adhäsionsvermögen von Stamm B8044, obwohl dieser Stamm anscheinend das Bhlp16 nicht aufwies. Nach der vergleichenden Beurteilung der Adhäsionshemmung durch Anti-rBhlp16 plus Anti-rBhmp39f und Anti-rBhmp39f alleine bei den Stämmen B8044 und B204 wurde angenommen, dass bei den Stämmen ohne Bhlp16 andere Proteine zusätzlich an der Adhäsion beteiligt sein müssen. Tatsächlich wurde kürzlich eine weiteres kleines Membranprotein (SmpB = Bhlp17,6) beschrieben, das Stämme ohne das Bhlp16 aufweisen sollen (41). Versuche zum Nachweis dieses neuen Proteins bei dem Stamm B8044 erscheinen daher aussichtsreich.

Zusammenfassende Schlussfolgerungen.

Aus den Versuchen des vorliegenden Manuskriptes wird abgeleitet, dass *B. hyodysenteriae*-Stämme spezifisch an animale Darmepithelzellen adhären können. An dieser Adhärenz waren äußere Membranproteine (OMP) von *B. hyodysenteriae* mitbeteiligt. Die untersuchten OMPs erwiesen sich als serologisch einheitlich. Gleichzeitig waren Antikörper gegen diese OMPs in der Lage, die Adhärenz der Bakterien an die Zellkulturen serotypübergreifend zu inhibieren. Nach aller Wahrscheinlichkeit wird die Adhärenz aber nicht nur von einem Protein vermittelt. Sie ist eher als Folge der additiven Wirkung mehrerer Proteine anzusehen. Hierbei haben Bhlp16 und Bhmp39f nach den vorliegenden Untersuchungen allerdings einen besonderen Anteil.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Schweinedysenterie ist eine durch *Brachyspira (B.) hyodysenteriae* verursachte mukohämorrhagische Diarrhö, die weltweit große wirtschaftliche Bedeutung besitzt. Habitat des Erregers ist der Dickdarm. Hilfestellung für die dauerhafte Besiedlung dieses Darmabschnitts könnte von Erreger-Wirtszell-Interaktionen ausgehen, die sich bei in vitro Versuchen in einer Adhärenz der Brachyspiren an Epithelzellen darstellen. Vermittler dieser Adhärenz sind nach ihrer exponierten Lage in der Zellwand der Bakterien zu urteilen äußere Membranproteine (OMP) der Brachyspiren. Diese Hypothese war Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Es war zu beantworten, ob Brachyspiren an Säugerzellkulturen, insbesondere an Darmepithelzellen vom Schwein, adhären und ob Antikörper gegen OMPs von *B. hyodysenteriae* diese Adhärenz inhibieren können. Weiterhin sollte an Untersuchungen mit verschiedenen Serotypen von *B. hyodysenteriae* geklärt werden, ob die verwendeten OMPs serologisch einheitlich sind und ob die Inhibierung der Anheftung als serotypübergreifend oder eher als serotypspezifisch zu charakterisieren ist.

Die OMPs von *B. hyodysenteriae* Stamm B204 mit den Bezeichnungen Bhlp16, Bhlp29,7d, Bhmp39f und Bhmp39h wurden in *E. coli* BLR(DE3) kloniert und nach Expression affinitätschromatographisch gereinigt. Zur Herstellung rOMP-spezifischer Antiseren (Anti-rOMP) wurden Kaninchen in Intervallen von jeweils 1-2 Wochen zweimalig subkutan und dreimalig intravenös immunisiert. Die 1 Woche nach der letzten Antigenapplikation gewonnenen Seren wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot auf Reaktivität gegenüber den rOMPs und den entsprechenden Proteinen in den Ganzzelllysaten der Serotyp-Referenzstämme geprüft. Versuche zur Prüfung der Inhibition der Adhäsion der verschiedenen *B. hyodysenteriae* Serotypen erfolgten im Zellkulturadhärenzmodell (s. u.). Zur Prüfung der Adhärenz der Brachyspiren an Kulturzellen dienten verschiedene Darmepithelzelllinien wie IEC-18- (Ratte), IPEC-J2- (Schwein) und HRT-18-Zellen (Mensch). Vermehrungsfähige Brachyspiren in Nährbouillon wurden auf den mit BHI gewaschenen Zellrasen pipettiert und nach zweistündiger Inkubation und dreimaliger Waschung mit PBS die an den Zellen haftenden Bakterien durch Immunfluoreszenzfärbung detektiert und quantifiziert. Adhärenzhemmversuche erfolgten nach vorhergehender 20 minütiger Inkubation der Brachyspiresuspension mit dem fraglichen Antiserum, bzw. einer Ultraschallpräparation aus Kulturzellen in analoger Weise.

Die mit den verschiedenen rOMPs immunisierten Kaninchen bildeten jeweils spätestens nach dreimaliger Antigenapplikation im Immunoblot detektierbare Antikörper gegen die verwendeten Antigene. Bis auf Bhlp16 bei Stamm B8044, der nach eigenen molekularbiologischen Untersuchungen nicht über das entsprechende Protein verfügte, erkannten die

Antiseren Proteine im jeweils erwartenden Größenbereich in Ganzzelllysaten aller 9 Serotyp-Referenzstämme.

Im Rahmen der zellbiologischen Experimente adhärten die Brachyspiren sowohl an IEC-18- als auch an IPEC-J2-Zellen, nicht jedoch an die humanen HRT-18-Zellen. Die Adhäsion war sowohl durch Serum von rekonvaleszenten Schweinen, als auch durch Ultraschalllysate entsprechender Zellen hemmbar. Die Verwendung der rOMP-spezifischen Antiseren reduzierte im Zellkulturadhärenzmodell mit IPEC-J2-Zellen die Adhäsion des Spenderstamms in unterschiedlichem Ausmaß. Bei Prüfung aller möglichen Serumkombinationen wiesen jene die höchsten Hemmeffekte auf, die Anti-rBhlp16 und Anti-rBhmp39f enthielten. Unter Verwendung einer Mischung aus diesen beiden Antiseren war eine Inhibition der Adhäsion von allen 9 *B. hyodysenteriae* Serotypen möglich. Die Adhäsionsreduktion reichte von 53 % bis 91 %.

Aus den Versuchen der vorliegenden Arbeit wird abgeleitet, dass *B. hyodysenteriae*-Stämme spezifisch an animale Darmepithelzellen adhären können und dass an dieser Adhärenz äußere Membranproteine (OMP) von *B. hyodysenteriae* mitbeteiligt sind. Die untersuchten OMPs erwiesen sich als serologisch einheitlich. Gleichzeitig waren Antikörper gegen diese OMPs in der Lage, die Adhärenz der Bakterien an die Zellkulturen serotypübergreifend zu inhibieren. Nach aller Wahrscheinlichkeit wird die Adhärenz aber nicht nur von einem Protein vermittelt. Sie ist eher als Folge der additiven Wirkung mehrerer Proteine anzusehen. Hierbei haben Bhlp16 und Bhmp39f nach den vorliegenden Untersuchungen jedoch einen besonderen Anteil.

SUMMARY

The spirochete *Brachyspira (B.) hyodysenteriae* is the causative agent of swine dysentery, a mucohaemorrhagic diarrhoeal disease of great commercial relevance and worldwide occurrence. The bacterium colonises the large intestine which could probably be promoted by interactions between host cell and causative agent. The potency of *B. hyodysenteriae* to adhere to epithelial cells was shown in cell culture experiments. Localised on the surface of the bacterial cell wall, outer membrane proteins (OMPs) may be implicated in mediating this phenomenon. In order to test this hypothesis the aim of this thesis was to investigate whether *Brachyspira* are really able to adhere to mammalian cells, in particular swine intestine epithelial cells, and if antibodies against OMPs of *B. hyodysenteriae* can inhibit adhesion. Furthermore, it was determined whether OMPs are serologically consistent and whether inhibition of pathogen adhesion is serotype dependent or rather serotype independent.

The OMPs Bhlp16, Bhlp29,7d, Bhmp39f and Bhmp39h of *B. hyodysenteriae* strain B204 were cloned into *E. coli* BLR(DE3), expressed and affinity purified via chromatography. The rOMP-specific antisera (Anti-rOMP) were raised in rabbits by vaccinating them twice subcutaneously, followed by three intravenous boosters in intervals of one to two weeks. The sera, raised one week after the last immunisation, were tested for their reactivity against rOMPs and the corresponding proteins present in whole cell lysates isolated from serotype-reference-strains, using SDS-PAGE and western blot. Experiments aiming to assess the inhibition of the bacterial adhesion of the different serotypes of *B. hyodysenteriae* were performed in a cell culture-adherence model. The adherence capacity of *B. hyodysenteriae* to different intestinal epithelial cell lines, i.e. IEC-18- (rat), IPEC-J2- (swine) and HRT-18-cells (human) was determined. Viable brachyspira cultured in bouillon were inoculated to cell layers (washed with BHI). Adherent bacteria were detected and quantified using indirect immunofluorescence after an incubation time of two hours and three washing steps with PBS. Adherence inhibition tests were performed after preincubating (20 minutes) the brachyspira with the antiserum in question or a whole cell sonicate of cell culture cells.

All of the rabbits immunised with the different rOMPs, produced antibodies against the used antigens (detectable via immunoblot; latest after the third vaccination). Apart from Bhlp16, which was not encoded by the reference strain B8044 (PCR-result), the produced antisera detected proteins of expected size in the whole cell lysates of all 9 serotype-reference-strains.

In the cell culture-adherence model, brachyspira adhered to IEC-18-cells as well as to IPEC-J2-cells, but not to the human HRT-18-cells. Adherence could be inhibited using sera of

reconvalescent pigs as well as whole cell sonicates of the corresponding cell cultures. The application of the rOMP-specific antisera reduced the adhesion of the donor-strain to the IPEC-J2-cells in different degrees. When testing different combinations of antisera, those containing Anti-rBhlp16 and Anti-rBhmp39f showed the highest inhibition effects. Using a mixture of both antisera, inhibition of adhesion of all 9 serotypes was possible. The reduction of adhesion ranged from 53 % to 91 % in comparison to the negative controls.

In conclusion, the results demonstrate that *B. hyodysenteriae* strains can adhere specifically to animal intestinal epithelial cells and that outer membrane proteins (OMPs) of *B. hyodysenteriae* are involved in this process. The investigated OMPs proved to be serological consistent. Furthermore, antibodies against these OMPs were able to inhibit bacterial adhesion of all brachyspira serotypes to cultured IPEC-J2-cells. It seems likely that the adherence is mediated not only from one OMP alone, but is the result of the additive action of different OMPs. The studies revealed that both Bhlp16 und Bhmp39f obviously play an important role in mediating this process.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Achacha, M., and S. Messier.** 1991. Identification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* using two four-hour identification systems. *J. Vet. Diagn. Invest.* **3**:211-214.
2. **Albassam, M. A., H. J. Olander, H. L. Thacker, and J. J. Turek.** 1985. Ultrastructural characterization of colonic lesions in pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*. *Can. J. Comp. Med.* **49**:384-390.
3. **Alexander, T. J., and D. J. Taylor.** 1969. The clinical signs, diagnosis and control of swine dysentery. *Vet. Rec.* **85**:59-63.
4. **Argenzio, R. A., S. C. Whipp, and R. D. Glock.** 1980. Pathophysiology of swine dysentery: colonic transport and permeability studies. *J. Infect. Dis.* **142**:676-684.
5. **Barcellos, D. E., M. R. Mathiesen, M. de Uzeda, Kader, II, and G. E. Duhamel.** 2000. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Vet. Rec.* **146**:398-403.
6. **Baum, D. H., and L. A. Joens.** 1979. Serotypes of beta-hemolytic *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* **25**:792-796.
7. **Bowden, C. A., L. A. Joens, and L. M. Kelley.** 1989. Characterization of the attachment of *Treponema hyodysenteriae* to Henle intestinal epithelial cells in vitro. *Am. J. Vet. Res.* **50**:1481-1485.
8. **Boye, M., S. B. Baloda, T. D. Leser, and K. Moller.** 2001. Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet. Microbiol.* **81**:33-40.
9. **Chen, L. Y., D. Y. Chen, J. Miaw, and N. T. Hu.** 1996. XpsD, an outer membrane protein required for protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a multimer. *J. Biol. Chem.* **271**:2703-2708.
10. **Combs, B. G., D. J. Hampson, and S. J. Harders.** 1992. Typing of Australian isolates of *Treponema hyodysenteriae* by serology and by DNA restriction endonuclease analysis. *Vet. Microbiol.* **31**:273-285.
11. **Cullen, P. A., S. A. Coutts, S. J. Cordwell, D. M. Bulach, and B. Adler.** 2003. Characterization of a locus encoding four paralogous outer membrane lipoproteins of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Microbes. Infect.* **5**:275-283.
12. **Cullen, P. A., D. A. Haake, and B. Adler.** 2004. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:291-318.
13. **Diarra, A. T., K. R. Mittal, and M. Achacha.** 1994. Evaluation of microagglutination test for differentiation between *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae* and *S. innocens* and serotyping of *S. hyodysenteriae*. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1976-1979.
14. **Diego, R., I. Lanza, A. Carvajal, P. Rubio, and P. Carmenes.** 1995. *Serpulina hyodysenteriae* challenge of fattening pigs vaccinated with an adjuvanted bivalent bacterin against swine dysentery. *Vaccine* **13**:663-667.

15. **Dong, C., K. Beis, J. Nesper, A. L. Brunkan-Lamontagne, B. R. Clarke, C. Whitfield, and J. H. Naismith.** 2006. Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature* **444**:226-229.
16. **Fernie, D. S., P. H. Ripley, and P. D. Walker.** 1983. Swine dysentery: protection against experimental challenge following single dose parenteral immunisation with inactivated *Treponema hyodysenteriae*. *Res. Vet. Sci.* **35**:217-221.
17. **Fisher, L. F., and H. J. Olander.** 1981. Shedding of *Treponema hyodysenteriae*, transmission of disease, and agglutinin response to pigs convalescent from swine dysentery. *Am. J. Vet. Res.* **42**:450-455.
18. **Gabe, J. D., R. J. Chang, R. Slomiany, W. H. Andrews, and M. T. McCaman.** 1995. Isolation of extracytoplasmic proteins from *Serpulina hyodysenteriae* B204 and molecular cloning of the *flaB1* gene encoding a 38-kilodalton flagellar protein. *Infect. Immun.* **63**:142-148.
19. **Gabe, J. D., E. Dragon, R. J. Chang, and M. T. McCaman.** 1998. Identification of a linked set of genes in *Serpulina hyodysenteriae* (B204) predicted to encode closely related 39-kilodalton extracytoplasmic proteins. *J. Bacteriol.* **180**:444-448.
20. **Glock, R. D., D. L. Harris, and J. P. Kluge.** 1974. Localization of spirochetes with the structural characteristics of *Treponema hyodysenteriae* in the lesions of swine dysentery. *Infect. Immun.* **9**:167-178.
21. **Glock, R. D., K. J. Schwartz, and D. L. Harris.** 1978. Parenteral immunization of pigs against infection with *Treponema hyodysenteriae*. *Am. J. Vet. Res.* **39**:639-642.
22. **Halter, M. R., and L. A. Joens.** 1988. Lipooligosaccharides from *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Infect. Immun.* **56**:3152-3156.
23. **Hampson, D. J.** 1991. Slide-agglutination for rapid serological typing of *Treponema hyodysenteriae*. *Epidemiol. Infect.* **106**:541-547.
24. **Hampson, D. J., R. F. Atyeo, and B. G. Combs.** 1997. Swine dysentery, p. 175-209. In D. J. Hampson and T. B. Stanton (ed.), *Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans*. CAB International, Wallingford, England
25. **Hampson, D. J., B. G. Combs, S. J. Harders, I. D. Connaughton, and V. A. Fahy.** 1991. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from a wild rat living on a piggery. *Aust. Vet. J.* **68**:308.
26. **Hampson, D. J., T. La, B. Adler, and D. J. Trott.** 2006. Proposed revisions to the nomenclature for *Brachyspira* membrane proteins and lipoproteins. *Microbiology* **152**:1-2.
27. **Hampson, D. J., J. R. Mhoma, and B. Combs.** 1989. Analysis of lipopolysaccharide antigens of *Treponema hyodysenteriae*. *Epidemiol. Infect.* **103**:275-284.
28. **Hampson, D. J., J. R. Mhoma, B. Combs, and J. R. Buddle.** 1989. Proposed revisions to the serological typing system for *Treponema hyodysenteriae*. *Epidemiol. Infect.* **102**:75-84.
29. **Hampson, D. J., J. R. Mhoma, B. G. Combs, and J. I. Lee.** 1990. Serological grouping of *Treponema hyodysenteriae*. *Epidemiol. Infect.* **105**:79-85.

30. **Hampson, D. J., I. D. Robertson, and J. R. Mhoma.** 1993. Experiences with a vaccine being developed for the control of swine dysentery. *Aust. Vet. J.* **70**:18-20.
31. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
32. **Harel, J., M. Belanger, C. Forget, and M. Jacques.** 1994. Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 from Quebec by restriction endonuclease fingerprinting and ribotyping. *Can. J. Vet. Res.* **58**:302-305.
33. **Harris, D. L., T. J. Alexander, S. C. Whipp, I. M. Robinson, R. D. Glock, and P. J. Matthews.** 1978. Swine dysentery: studies of gnotobiotic pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*, *Bacteroides vulgatus*, and *Fusobacterium necrophorum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **172**:468-471.
34. **Harris, D. L. D. J. H. a. R. D. G.** 1999. Swine Dysentery, p. 579-600. In B. E. Straw, S.D.'Allaire, W.L.Mengelling, D.J.Taylor (ed.), *Diseases of Swine*, 8 ed, Blackwell, Oxford
35. **Haslbeck, M., I. Schuster, and H. Grallert.** 2003. GroE-dependent expression and purification of pig heart mitochondrial citrate synthase in *Escherichia coli*. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **786**:127-136.
36. **Heinonen, M., M. Fossi, J. P. Jalli, H. Saloniemi, and V. Tuovinen.** 2000. Detectability and prevalence of *Brachyspira* species in herds rearing health class feeder pigs in Finland. *Vet. Rec.* **146**:343-347.
37. **Heinritzi, K., H. P. Gindele, G. Reiner, and U. Schnurrbusch.** 2006. Schweinekrankheiten, p. 158-160. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
38. **Herbst, W., K. Schlez, J. Heuser, and G. Baljer.** 2007. Detection rates by PCR of *Brachyspira hyodysenteriae* in German pigs and antimicrobial susceptibility of *Brachyspira* species isolates. Presented at the 4th Int. Conf. Col. Spiroch. Inf., Prague, Czech Republic.
39. **Herbst, W., H. Willems, and G. Baljer.** 2004. Distribution of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in healthy and diarrhoeic pigs. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **117**:493-498.
40. **Holden, J., P. J. Coloe, and P. M. Smooker.** 2008. An evaluation of the immunogenicity and protective responses to *Brachyspira hyodysenteriae* recombinant SmpB vaccination. *Vet. Microbiol.* **128**:354-363.
41. **Holden, J., G. Moutafis, T. Istivan, P. J. Coloe, and P. M. Smooker.** 2006. SmpB: a novel outer membrane protein present in some *Brachyspira hyodysenteriae* strains. *Vet. Microbiol.* **113**:109-116.
42. **Holt, S. C.** 1978. Anatomy and Chemistry of Spirochetes. *Microbiological Reviews* **42**:114-160.
43. **Hudson, M. J., T. J. Alexander, R. J. Lysons, and P. D. Wellstead.** 1974. Swine dysentery: failure of an attenuated strain of spirochaete, given orally, to protect pigs against subsequent challenge. *Br. Vet. J.* **130**:xxxvii-xl.
44. **Hughes, R., H. J. Olander, D. L. Kanitz, and S. Qureshi.** 1977. A study of swine dysentery by immunofluorescence and histology. *Vet. Pathol.* **14**:490-507.

45. **Hughes, R., H. J. Olander, and C. B. Williams.** 1975. Swine dysentery: pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*. *Am. J. Vet. Res.* **36**:971-977.
46. **Hyatt, D. R., A. A. ter Huurne, B. A. van der Zeijst, and L. A. Joens.** 1994. Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. *Infect. Immun.* **62**:2244-2248.
47. **Jacobson, M., C. Fellström, R. Lindberg, P. Wallgren, and M. Jensen-Waern.** 2004. Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J. Med. Microbiol.* **53**:273-280.
48. **Joens, L. A.** 1997. Virulence factors associated with *Serpulina hyodysenteriae*, p. 151-172. In D. J. Hampson and T. B. Stanton (ed.), *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. CAB International, Wallingford, England
49. **Joens, L. A., and J. M. Kinyon.** 1982. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from wild rodents. *J. Clin. Microbiol.* **15**:994-997.
50. **Joens, L. A., and R. B. Marquez.** 1986. Molecular characterization of proteins from porcine spirochetes. *Infect. Immun.* **54**:893-896.
51. **Joens, L. A., S. C. Whipp, R. D. Glock, and M. E. Neussen.** 1983. Serotype-specific protection against *Treponema hyodysenteriae* infection in ligated colonic loops of pigs recovered from swine dysentery. *Infect. Immun.* **39**:460-462.
52. **Jonasson, R., B. Essen-Gustavsson, and M. Jensen-Waern.** 2007. Blood concentrations of amino acids, glucose and lactate during experimental swine dysentery. *Res. Vet. Sci.* **82**:323-331.
53. **Kärber, G.** 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **162**:480-483.
54. **Karlsson, M., C. Fellstrom, M. U. Heldtander, K. E. Johansson, and A. Franklin.** 1999. Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**:255-260.
55. **Kennedy, G. A., and A. C. Strafuss.** 1976. Scanning electron microscopy of the lesions of swine dysentery. *Am. J. Vet. Res.* **37**:395-401.
56. **Kennedy, M. J., E. L. Rosey, and R. J. Yancey, Jr.** 1997. Characterization of *flaA*- and *flaB*- mutants of *Serpulina hyodysenteriae*: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility and intestinal colonization. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**:119-128.
57. **Kennedy, M. J., D. K. Rosnick, R. G. Ulrich, and R. J. Yancey, Jr.** 1988. Association of *Treponema hyodysenteriae* with porcine intestinal mucosa. *J. Gen. Microbiol.* **134**:1565-1576.
58. **Kennedy, M. J., and R. J. Yancey, Jr.** 1996. Motility and chemotaxis in *Serpulina hyodysenteriae*. *Vet. Microbiol.* **49**:21-30.
59. **Kim, T. J., S. C. Jung, and J. I. Lee.** 2005. Characterization of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Korea. *J. Vet. Sci.* **6**:335-339.

60. **Kinyon, J. M., and D. L. Harris.** 1979. *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae*. Int. J. Syst. Bacteriol. **29**:102-109.
61. **Knoop, F. C.** 1979. Experimental infection of rabbit ligated ileal loops with *Treponema hyodysenteriae*. Infect. Immun. **26**:1196-1201.
62. **Knoop, F. C., G. D. Schrank, and F. M. Ferraro.** 1979. In vitro attachment of *Treponema hyodysenteriae* to mammalian epithelial cells. Can. J. Microbiol. **25**:399-405.
63. **La, T., N. D. Phillips, M. P. Reichel, and D. J. Hampson.** 2004. Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. Vet. Microbiol. **102**:97-109.
64. **La, T., P. Tan, N. D. Phillips, and D. J. Hampson.** 2005. The distribution of *bmpB*, a gene encoding a 29.7 kDa lipoprotein with homology to MetQ, in *Brachyspira hyodysenteriae* and related species. Vet. Microbiol. **107**:249-256.
65. **Lämmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.
66. **Lau, T. T., and D. J. Hampson.** 1992. The serological grouping system for *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. Epidemiol. Infect. **109**:255-263.
67. **Lee, B. J., and D. J. Hampson.** 1996. Production and characterisation of a monoclonal antibody to *Serpulina hyodysenteriae*. FEMS Microbiol. Lett. **136**:193-197.
68. **Lee, B. J., T. La, A. S. Mikosza, and D. J. Hampson.** 2000. Identification of the gene encoding BmpB, a 30 kDa outer envelope lipoprotein of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, and immunogenicity of recombinant BmpB in mice and pigs. Vet. Microbiol. **76**:245-257.
69. **Lee, J. I., D. J. Hampson, B. G. Combs, and A. J. Lymbery.** 1993. Genetic relationships between isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*, and comparison of methods for their subspecific differentiation. Vet. Microbiol. **34**:35-46.
70. **Lee, M. S., L. Y. Chen, W. M. Leu, R. J. Shiau, and N. T. Hu.** 2005. Associations of the major pseudopilin XpsG with XpsN (GspC) and secretin XpsD of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus revealed by cross-linking analysis. J. Biol. Chem. **280**:4585-4591.
71. **Li, Z. S., M. Belanger, and M. Jacques.** 1991. Serotyping of Canadian isolates of *Treponema hyodysenteriae* and description of two new serotypes. J. Clin. Microbiol. **29**:2794-2797.
72. **Mapother, M. E., and L. A. Joens.** 1985. New serotypes of *Treponema hyodysenteriae*. J. Clin. Microbiol. **22**:161-164.
73. **McCaman, M. T., K. Auer, W. Foley, and J. D. Gabe.** 1999. Sequence characterization of two new members of a multi-gene family in *Serpulina hyodysenteriae* (B204) with homology to a 39 kDa surface exposed protein: *vspC* and *D*. Vet. Microbiol. **68**:273-283.

74. **McCaman, M. T., K. Auer, W. Foley, and J. D. Gabe.** 2003. *Brachyspira hyodysenteriae* contains eight linked gene copies related to an expressed 39-kDa surface protein. *Microbes. Infect.* **5**:1-6.
75. **Mhoma, J. R., D. J. Hampson, and I. D. Robertson.** 1992. A serological survey to determine the prevalence of infection with *Treponema hyodysenteriae* in Western Australia. *Aust. Vet. J.* **69**:81-84.
76. **Milner, J. A., and R. Sellwood.** 1994. Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: potential role in intestinal colonization. *Infect. Immun.* **62**:4095-4099.
77. **Nesper, J., C. M. Hill, A. Paiment, G. Harauz, K. Beis, J. H. Naismith, and C. Whitfield.** 2003. Translocation of group 1 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* serotype K30. Structural and functional analysis of the outer membrane lipoprotein Wza. *J. Biol. Chem.* **278**:49763-49772.
78. **Olsen, I., B. J. Paster, and F. E. Dewhirst.** 2000. Taxonomy of spirochetes. *Anaerobe* **6**:39-57.
79. **Olson, L. D., K. I. Dayalu, and G. T. Schlink.** 1994. Exacerbated onset of dysentery in swine vaccinated with inactivated adjuvanted *Serpulina hyodysenteriae*. *Am. J. Vet. Res.* **55**:67-71.
80. **Pluske, J. R., P. M. Siba, D. W. Pethick, Z. Durmic, B. P. Mullan, and D. J. Hampson.** 1996. The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. *J. Nutr.* **126**:2920-2933.
81. **Pohlenz, J. F., S. C. Whipp, and I. M. Robinson.** 1983. Pathogenesis of swine dysentery caused by *Treponema hyodysenteriae*. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **90**:363-367.
82. **Robinson, I. M., S. C. Whipp, J. A. Bucklin, and M. J. Allison.** 1984. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:964-969.
83. **Rohde, J., M. Kessler, C. G. Baums, and G. Amtsberg.** 2004. Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany. *Vet. Microbiol.* **102**:25-32.
84. **Rosey, E. L., M. J. Kennedy, and R. J. Yancey, Jr.** 1996. Dual *flaA1 flaB1* mutant of *Serpulina hyodysenteriae* expressing periplasmic flagella is severely attenuated in a murine model of swine dysentery. *Infect. Immun.* **64**:4154-4162.
85. **Rothkamp, A., J. Rhode, and J. Verspohl.** 2005. *Brachyspira* species isolated from pig herds in Northern Germany in 2002-2004. Presented at the 3rd Int. Conf. Col. Spiroch. Inf., Parma, Italy.
86. **Schmidt, S. A., D. Bieber, S. W. Ramer, J. Hwang, C. Y. Wu, and G. Schoolnik.** 2001. Structure-function analysis of BfpB, a secretin-like protein encoded by the bundle-forming-pilus operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:4848-4859.
87. **Schmidt, T.** 2007. Fa. IBA, Göttingen, persönliche Kommunikation

88. **Schmidt, T.** 2008. Fa. IBA, Göttingen, persönliche Kommunikation
89. **Sellwood, R., F. Walton, W. Thomas, M. R. Burrows, and J. Chesham.** 1995. Expression of the SmpA outer membrane lipoprotein of *Serpulina hyodysenteriae* strain P18A in vivo. *Vet. Microbiol.* **44**:25-35.
90. **Siba, P. M., D. W. Pethick, and D. J. Hampson.** 1996. Pigs experimentally infected with *Serpulina hyodysenteriae* can be protected from developing swine dysentery by feeding them a highly digestible diet. *Epidemiol. Infect.* **116**:207-216.
91. **Silva, J. L., and G. Weber.** 1993. Pressure stability of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**:89-113.
92. **Songer, J. G., R. D. Glock, K. J. Schwartz, and D. L. Harris.** 1978. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from sources other than swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **172**:464-466.
93. **Songer, J. G., and D. L. Harris.** 1978. Transmission of swine dysentery by carrier pigs. *Am. J. Vet. Res.* **39**:913-916.
94. **Sotiropoulos, C., P. J. Coloe, and S. C. Smith.** 1994. Identification and characterization of *Serpulina hyodysenteriae* by restriction enzyme analysis and Southern blot analysis. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1397-1401.
95. **Spearman, C.** 1908. The method of 'right and wrong cases' ('constant stimuli') without Gauss's formulae. *Brit. J. Psychol.* **2**:227-242.
96. **Stanton, T. B., and N. S. Jensen.** 1993. Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *J. Bacteriol.* **175**:2980-2987.
97. **Stanton, T. B., E. L. Rosey, M. J. Kennedy, N. S. Jensen, and B. T. Bosworth.** 1999. Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5028-5034.
98. **Stege, H., T. K. Jensen, K. Moller, P. Baekbo, and S. E. Jorsal.** 2000. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev. Vet. Med.* **46**:279-292.
99. **Sutton, M. R., R. R. Fall, A. M. Nervi, A. W. Alberts, P. R. Vagelos, and R. A. Bradshaw.** 1977. Amino acid sequence of *Escherichia coli* biotin carboxyl carrier protein (9100). *J. Biol. Chem.* **252**:3934-3940.
100. **Szancer, J.** 2005. Eradication of swine dysentery in Danish pig farms. Presented at the 3rd Int. Conf. Col. Spiroch. Inf., Parma, Italy.
101. **Taylor, D. J.** 1984. Swine dysentery survey. *Vet. Rec.* **115**:110-111.
102. **Taylor, D. J., and T. J. Alexander.** 1971. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br. Vet. J.* **127**:58-61.
103. **Taylor, D. J., J. R. Simmons, and H. M. Laird.** 1980. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Rec.* **106**:326-332.
104. **ter Huurne, A. A., and W. Gaastra.** 1995. Swine dysentery: more unknown than known. *Vet. Microbiol.* **46**:347-360.

105. **ter Huurne, A. A., S. Muir, M. van Houten, M. B. Koopman, J. G. Kusters, B. A. van der Zeijst, and W. Gaastra.** 1993. The role of hemolysin(s) in the pathogenesis of *Serpulina hyodysenteriae*. Zentralbl. Bakteriologie. **278**:316-325.
106. **ter Huurne, A. A., S. Muir, M. van Houten, B. A. van der Zeijst, W. Gaastra, and J. G. Kusters.** 1994. Characterization of three putative *Serpulina hyodysenteriae* hemolysins. Microb. Pathog. **16**:269-282.
107. **Thomas, W., and R. Sellwood.** 1992. Monoclonal antibodies to a 16-kDa antigen of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. J. Med. Microbiol. **37**:214-220.
108. **Thomas, W., and R. Sellwood.** 1993. Molecular cloning, expression, and DNA sequence analysis of the gene that encodes the 16-kilodalton outer membrane lipoprotein of *Serpulina hyodysenteriae*. Infect. Immun. **61**:1136-1140.
109. **Thomas, W., R. Sellwood, and R. J. Lysons.** 1992. A 16-kilodalton lipoprotein of the outer membrane of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. Infect. Immun. **60**:3111-3116.
110. **Verspohl, J., C. Feltrup, S. Thiede, and G. Amtsberg.** 2001. Zur Diagnostik von Schweinedysenterie und Spirochaetendiarrhoe. Dtsch. tierärztl. Wschr. **108**:67-69.
111. **Waldmann, K. H., and M. Wendt.** 2001. Lehrbuch der Schweinekrankheiten, vol. 3. Parey Buchverlag, Berlin.
112. **Waldmann, K. H., M. Wendt, and G. Amtsberg.** 2000. Untersuchungen zur *Brachyspira*-Diagnostik und Behandlungsstrategien bei der Schweinedysenterie. Dtsch. tierärztl. Wschr. **107**:486-489.
113. **Walter, S.** 2002. Structure and function of the GroE chaperone. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. **59**:1589-1597.
114. **Walter, S., and J. Buchner.** 2002. Molecular chaperones-cellular machines for protein folding. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **41**:1098-1113.
115. **Walter, S., and J. Buchner.** 2002. Molekulare Chaperone: zelluläre Maschinen für die Proteinfaltung. Angew. Chem. **114**:1142-1158.
116. **Wendt, M., T. Nguyen, A. Rothkamp, F. Seeliger, and W. Baumgärtner.** 2008. Zur Pathogenität verschiedener Brachyspirenarten beim Schwein. Dtsch. tierärztl. Wschr. **115**:204.
117. **Westerman, R. B., R. M. Phillips, and L. A. Joens.** 1995. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for lipooligosaccharide of *Serpulina hyodysenteriae*. J. Clin. Microbiol. **33**:2145-2149.
118. **Whipp, S. C., I. M. Robinson, D. L. Harris, R. D. Glock, P. J. Matthews, and T. J. Alexander.** 1979. Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. Infect. Immun. **26**:1042-1047.
119. **Whiting, R. A., L. P. Doyle, and R. S. Spray.** 1921. Swine dysentery, p. 3-15, Purdue. Univ. Agric. Stn. Bull., vol. 257

120. **Wilcock, B. P., and H. J. Olander.** 1979. Studies on the pathogenesis of swine dysentery. II. Search for a cytotoxin in spirochetal broth cultures and colon content. *Vet. Pathol.* **16**:567-573.
121. **Witchell, T. D., S. A. Coutts, D. M. Bulach, and B. Adler.** 2006. Differential expression of the Bhmp39 major outer membrane proteins of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* **74**:3271-3276.

8 ANHANG

Verwendete Puffer und Medien:

Anodenpuffer I

Tris-Puffer (1 M)	300 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	500 ml

Anodenpuffer II

Tris-Puffer (1 M)	25 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	770 ml

BHI-Medium

Fa. Merck, Darmstadt, Kat.Nr.: 10493	37 g
A. dest.	ad 1.000 ml

BHIF^{CVSSR}-Medium

Fa. Merck, Darmstadt, Kat.Nr.: 10493	37 g
Colistin	6,23 mg
Vancomycin	6 mg
Spectinomycin	200 mg
Spiramycin	15,25 mg
Rifampicin	12,5 mg
A. dest.	ad 1.000 ml
FKS (Fötale Kälberserum) – immer frisch zugesetzt	20 %

Blut-Agar

Fa. Merck, Darmstadt, Kat.Nr.: 1.10886.0500	40 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
A. dest.	ad 1.000 m

Chloronaphthol-Methanol

4-Chloro-1-Naphthol	3 mg
Methanol	1 ml

Coomassie-Brilliantblau-G250-Färbelösung

Brilliantblau G 250	1 g
Essigsäure	100 ml
Methanol	400 ml
A. dest.	500 ml

Coomassie-Entfärbelösung 5 %

Essigsäure	70 ml
Methanol	50 ml
A. dest.	ad 1000 ml

Coomassie-Entfärbelösung 45 %

Essigsäure	100 ml
Methanol	450 ml
A. dest.	450 ml

Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)

Tris	242 g
Eisessig	57,10 g
Na-EDTA x 2 H ₂ O (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

Gassner-Agar

Fa. OXOID GmbH, Wesel, Kat.Nr.: GF601B	77 g
A. dest.	ad 1.000 ml

HEPES-Puffer Stammlösung (10 x, pH 7,4)

NaCl	40 g
KCl	1,5 g
HEPES	11,9 g
D-Glukose (wasserfrei)	10 g
A. dest.	ad 500 ml

HEPES-Puffer (1 x, pH 7,4)

HEPES-Puffer-Stammlösung (10 x)	50 ml
A. dest.	ad 500 ml

Kathodenpuffer

6-Aminocaprinsäure	5,25 g
Tris-Puffer (1 M)	25 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	770 ml

Ladepuffer

Bromphenolblau	12,5 mg
Xylencyanol FF	12,5 mg
Glycerin (30 %)	2,6 ml
A. dest.	7,4 ml

LÄMMLI-Puffer (1970), pH 6,8

Tris-Cl (0,5 M, pH 6,8)	1 ml
Glycerol (87 %)	0,8 ml
SDS (10 %)	1,6 ml
β-Mercaptoethanol	0,4 ml
Bromphenolblau	0,02 g
A. dest.	4 ml
pH-Wert einstellen mit 37 % HCl	

Loading Dye-DNS Ladder Gebrauchsverdünnung

Gene Ruler™ 100 bp DNS Ladder Plus	0,01 ml
6x Loading Dye Solution (Fa. Fermentas, St. Leon-Roth, Kat.Nr. R0611)	0,03 ml
A. dest.	0,12 ml

Luria-Bertani-(LB-) Medium

Bacto-Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
NaOH (1M)	4 ml
A. dest.	ad 1.000 ml
pH mit NaOH 1 N einstellen	8,2

Luria-Bertani-(LB-) Agar

Bacto-Trypton	10 g
Bacto-Agar	16 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
NaOH (1M)	4 ml
A. dest.	ad 1.000 ml
pH mit NaOH 1 N einstellen	8,2

PBS (pH 7,4)

NaCl	10 g
KCl	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,8 g
A. dest.	ad 1000 ml

PBS-Tween (pH 7,2)

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,5 g
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	0,47 g
NaCl	8,18 g
Tween 20 (0,05 %)	0,5 ml
A. dest.	ad 1000 ml

Schädler ohne-Agar (ohne Antibiotika)

Fa. Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA, Kat.Nr.: 212189	41,9 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

SDS-Elektrophorese-Laufpuffer

Glycin	14,4 g
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	1 g
Tris	3,03 g
A. dest.	ad 1000 ml

analyt. SDS-Sammelgel (Mini, 4,5 %)

Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	250 µl
Acrylamid-Bisacrylamid 50:1,5	250 µl
SDS (20 %)	12,5 µl
Harnstoff (8 M)	1,5 ml
APS (10 %)	75 µl
TEMED	2,5 µl
A. dest.	450 µl

Analytisches SDS-Trenngel (Mini, 12,5 %)

Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml
Acrylamid-Bisacrylamid 30:0,8	5 ml
SDS (20 %)	62,5 µl
Harnstoff (8 M)	3,75 ml
APS (10 %)	60 µl
TEMED	10 µl
A. dest.	890 µl

Serumbouillon

Standard-I-Nährbouillon	25 g
Rinderserum	100 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

TFB1 (pH 5,8)

KAc (1 M)	6 ml
MnCl ₂ (1 M)	10 ml
KCl (1 M)	20 ml
CaCl ₂ (1 M)	2 ml
Glycerin (87 %ig)	34,5 ml
A.dest.	ad 200 ml

TFB2 (pH 7,0)

NaMops, pH 7,0 (1 M)	1 ml
CaCl ₂ (1 M)	7,5 ml
KCl (1 M)	1 ml
Glycerin (87 %ig)	17,25 ml
A. dest.	ad 100 ml

Tris-Puffer (1 M, ungepuffert)

Tris	121,14 g
A. dest.	ad 1000 ml

TSA^{CVSSR}-Agar (mit Schafblut)

Caso-Agar: Fa. Merck, Darmstadt, Kat.Nr.: 1.05458.0500	40 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
Colistin	6,23 mg
Vancomycin	6 mg
Spectinomycin	200 mg
Spiramycin	15,25 mg
Rifampicin	12,5 mg
A. dest.	ad 1.000 ml

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

9.1 Abbildungen

Abbildung 1:	Genkarte des rekombinanten Plasmids pHIT-7-01	18
Abbildung 2:	Darstellung der vier Insert-Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese	36
Abbildung 3:	Agarosegelelektrophorese der Inserts vor und nach Restriktion mit <i>Bsal</i>	37
Abbildung 4:	Nachweis von <i>bhlp16</i> -Gensequenzen in transformierten <i>E. coli</i> BLR(DE3)	38
Abbildung 5:	SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats der Eluate im Rahmen der affinitätschromatographischen Aufreinigung des rBhlp29,7d	40
Abbildung 6:	SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats der Eluate im Rahmen der affinitätschromatographischen Aufreinigung des rBhmp39f	41
Abbildung 7:	SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats der Eluate im Rahmen der affinitätschromatographischen Aufreinigung des rBhmp39h	42
Abbildung 8:	SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats der Eluate im Rahmen der affinitätschromatographischen Aufreinigung des rBhlp16	43
Abbildung 9:	SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) unter Verwendung des Strep-Tactin HRP Konjugats der Eluate im Rahmen der affinitätschromatographischen Aufreinigung einer Proteinexpression von Stamm MR0 (Negativkontrolle)	44
Abbildung 10:	Optische Dichte (OD_{550}) der <i>E. coli</i> -Klone MR0, MR1, MR2, MR3 und MR4 zu verschiedenen Zeiten nach Induktion mit 20 μ g AHT/100 ml	46
Abbildung 11:	OD_{550} der <i>E. coli</i> -Klone MR2 (A) und MR3 (B) zu verschiedenen Zeiten nach Induktion mit steigenden AHT-Mengen	47
Abbildung 12:	Antikörpernachweis bei einem Kaninchen nach Immunisierung mit affinitätschromatografisch aufgereinigtem rBhlp16 im Immunoblot	49
Abbildung 13:	Reaktion des Negativantiserums CH079 des Kontrollkaninchens auf verschiedene Antigene im Immunoblot	50

Abbildung 14: OMP-Detektion in einem Ganzzelllysate von <i>B. hyodysenteriae</i> (Stamm B204) durch rOMP-spezifische Antiseren vom Kaninchen im Immunoblot.....	51
Abbildung 15: SDS-PAGE von Ganzzelllysaten der neun <i>B. hyodysenteriae</i> -Serotyp-Referenzstämme	52
Abbildung 16: OMP-Detektion in Ganzzelllysaten der neun <i>B. hyodysenteriae</i> Serotypstämme durch rBhlp29,7d- (A) und rBhlp16-(B) spezifische Antiseren vom Kaninchen im Immunoblot.....	54
Abbildung 17: OMP-Detektion in Ganzzelllysaten der neun <i>B. hyodysenteriae</i> Serotypstämme durch rBhmp39f- (A) und rBhmp39h-(B) spezifische Antiseren vom Kaninchen im Immunoblot	55
Abbildung 18: Adhäsion von <i>B. hyodysenteriae</i> an IPEC-J2- und IEC-18-Zellen nach Vorinkubation (20 min) mit dem Antiserumpool vom Schwein (■) IEC-18- (■) und IPEC-J2-Ganzzelllysate (■) sowie PBS (□) als Kontrolle	57
Abbildung 19: Adhäsion von <i>B. hyodysenteriae</i> an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation (20 min) mit verschiedenen Verdünnungen des Antiserumpools vom Schwein (■) und PBS (□) als Kontrolle	57
Abbildung 20: Darstellung der Adhäsion von <i>B. hyodysenteriae</i> Stamm B204 an verschiedene Darmepithelzelllinien mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	58
Abbildung 21: Darstellung der Adhäsion von <i>B. hyodysenteriae</i> Stamm B204 an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit PBS (A) und dem Antiserumpool vom Schwein (B, 20 min, 1:50 [v/v]) mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	59
Abbildung 22: Relative Adhäsion von <i>B. hyodysenteriae</i> (Stamm B204) an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit den einzelnen rOMP-spezifischen Antiseren vom Kaninchen (20 min, 1:50 [v/v]) in Relation zur PBS-Kontrolle.....	61
Abbildung 23: Relative Adhäsion von <i>B. hyodysenteriae</i> (Stamm B204) an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit den rOMP-spezifischen Antiseren vom Kaninchen, einzeln und in Kombination (20 min, 1:50 [v/v])	62
Abbildung 24: Relative Adhäsion der <i>B. hyodysenteriae</i> -Serotyp-Referenzstämmen an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit PBS und einer Kombination aus Anti-rBhlp16 plus Anti-rBhmp39f (20 min, 1:50 [v/v])	64

Abbildung 25: Darstellung der Adhäsion von *B. hyodysenteriae* Stamm A1 (1) und B8044 (2) an IPEC-J2-Zellen nach Vorinkubation mit PBS (A) und einer Kombination aus Anti-rBhlp16 plus Anti-rBhmp39f (B, 20 min, 1:50 [v/v]) mittels indirekter Immunfluoreszenz65

9.2 Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über die Serotypzuordnung diverser *B. hyodysenteriae*-Isolate.....5

Tabelle 2: Verwendete *Brachyspira hyodysenteriae*-Referenzstämme 17

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme..... 17

Tabelle 4: Verwendete Plasmide 18

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien..... 19

Tabelle 6: Parameter für die Induktion transformierter *E. coli*-Zellen..... 20

Tabelle 7: Größe der PCR-Amplifikate 23

Tabelle 8: Verwendete Primer 24

Tabelle 9: Erwartete Größe der rekombinanten Proteine 27

Tabelle 10: Verwendete Konjugate 28

Tabelle 11: Polyklonale Antiseren..... 32

Tabelle 12: Impfantigenpräparationen 33

Tabelle 13: In der vorliegenden Arbeit verwendete Signifikanzschwellen 34

Tabelle 14: Nachweis verschiedener OMP-kodierender Gene bei den Serotyp-Referenzstämmen von *Brachyspira hyodysenteriae* mittels PCR..... 35

Tabelle 15: Versuche zur isolierten Aufreinigung von rBhmp39f und rBhmp39h 45

Tabelle 16: Ergebnisse der Proteinbestimmung 48

Tabelle 17: Antikörperentwicklung im Immunoblot nach Immunisierung von Kaninchen mit rOMPs von *B. hyodysenteriae* unter Verwendung der homologen rOMPs als Antigene 49

Tabelle 18: Adhäsion der *B. hyodysenteriae*-Referenzstämme an IPEC-J2-Zellen 63

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich nun bei allen bedanken, ohne die diese Doktorarbeit nicht in dieser Form entstanden wäre.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung bei der Finanzierung der Arbeit.

Meinem Betreuer Dr. Werner Herbst möchte ich danken für die nette Betreuung und das stetige Anhalten zur selbstständigen Arbeit („mach doch einfach mal“), sowie die schnelle Korrektur der Dissertationsschrift.

Der H.-Wilhelm-Schaumann-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen eines Doktorandenstipendiums.

Mein besonderer Dank gilt Carsten Heydel, ohne dessen Hilfe die molekularbiologischen Arbeiten kaum so zügig vorangekommen wären – danke für Deinen Einsatz!

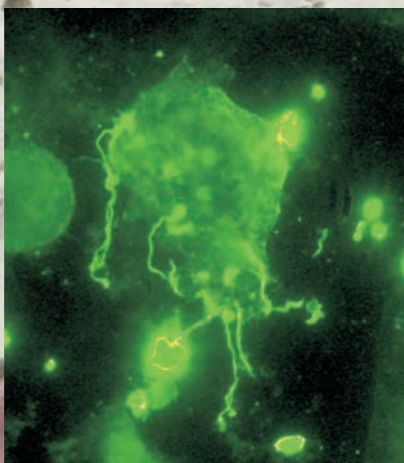
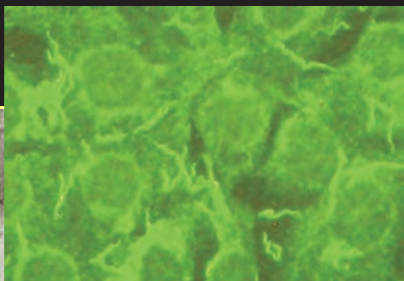
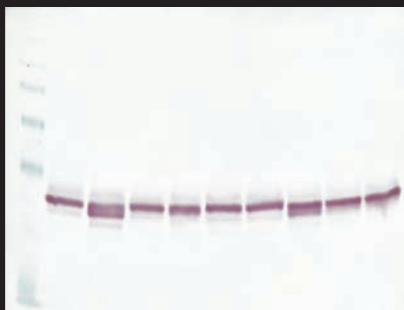
Weiterhin möchte ich auch meine Arbeitskollegen hervorheben, die mich allesamt stets unterstützt haben: Jörg Heuser - hauptberuflich Fragenbeantworter, Ideenlieferant und stets zu einem Scherz aufgelegt; Regina Weil – mein fleißiges Heinzelmännchen in Sachen PCR (irgendwie wars immer rechtzeitig fertig) und nicht zuletzt auch Dr. Stefanie Barth – spät dazugestoßen, aber rechtzeitig, um mir diverse nützliche Tips für das Abfassen der Dissertationsschrift zu geben. Danke euch allen für die nette Zeit!

Und natürlich kann man sie nicht vergessen: Die ganze Doktorandenbande unseres Instituts! Wir hatten eine wirklich spaßige, tolle Zeit im Doktorandenzimmer! Keiner zickig (trotz hohem Frauenanteil), alle hilfsbereit – einfach klasse! Ich werde den mittäglichen Mensagang mit Euch vermissen! Ein herzlicher Dank geht auch an alle übrigen Mitarbeiter/Innen des Instituts für das stets angenehme Arbeitsklima.

Ganz wichtig in der Doktorandenzeit waren auch mein Freund Robert und sämtliche Freunde in Gießen, die mir immer Rückhalt gegeben haben.

Und schließlich möchte ich noch meinen Eltern danken, die mich während der Doktorarbeit (wie auch in allen anderen Lebenslagen) stets unterstützt und gefördert haben. Ohne euch wäre ich nicht dort, wo ich heute bin! Danke!

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8357-5417-7



9 785835 195419

