

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Parodontologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Thomas F. Flemmig-

**Detektion von *Porphyromonas gingivalis*
mittels
Fluoreszenz in Situ Hybridisation (FISH-Technik)**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Swaneburg, Uwe, geb. Patzer
aus Münster

2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. dent. Dr. med. T. Beikler

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Parodontologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Thomas F. Flemmig-
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. dent. Dr. med. Thomas Beikler
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Helge Karch
Zusammenfassung
Detektion von *Porphyromonas gingivalis* mittels
Fluoreszenz in Situ Hybridisation (FISH-Technik)
Swaneburg, Uwe

Von den über 500 subgingival nachgewiesenen Mikroorganismen stehen nur wenige eng mit der Parodontitis in Verbindung. Zu diesen wird *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) gezählt. In der Therapie ist für die Auswahl eines adjuvanten Antibiotikums die Detektion dieser Spezies von besonderer Bedeutung. Die bisher in der Routinediagnostik zum Einsatz kommenden molekularbiologischen Verfahren sind zeitaufwendig und gestatten keine Quantifizierung. Diese Probleme können mit der Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH-Technik) bei hoher Sensitivität und Spezifität umgangen werden. Hierbei werden mit einem fluoreszierendem Farbstoff markierte DNA-Sonden benutzt, um an spezifische komplementäre Sequenzen der 16S rRNA zu binden um anschließend mittels eines Fluoreszenzmikroskops qualitativ und quantitativ analysiert zu werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der spezifische Nachweis von *P. g.* mit Hilfe dieser Technik möglich sei. Hierzu wurden bereits beschriebene *P. g.*-spezifische Sonden gegen 40 Bakterienisolate getestet. Bei den beiden Sonden handelte es sich um „*P. g. specific*“: GGTTTTCCACCATCAGTCATCTACA und um „*P. g. BG32*“: GTGGAAGCTTGACGGTATATCGCAAACCTCCTA. Die Sonde „*P. g. specific*“ kreuzreagierte mit *Prevotella intermedia* Typ ATCC 25611 und *Prevotella oralis* Typ ATCC 33269, die Sonde „*P. g. BG32*“ kreuzreagierte ihrerseits mit *Prevotella nigrescens* Typ ATCC 33563 und ebenso mit *P. oralis* Typ ATCC 33269. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass beide Sonden eine Sensitivität von 100% bei einer Spezifität beider Sonden von 80% aufweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die FISH-Technik im Vergleich zur PCR eine vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von *P. g.* aufweist. Die untersuchten Sonden erscheinen aber aufgrund der Kreuzreaktionen mit einigen *Prevotellaspezies* als für die Routinediagnostik nicht geeignet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Parodontitis	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Klassifikation	2
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese	3
1.1.4 Mikrobiologie	5
1.1.5 Biofilm	8
1.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	11
1.3 Verwandtschaftsverhältnisse	14
1.4 Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH)	18
1.5 FISH in der oralen Medizin	20
1.6 Fragestellung	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Verwendete Bakterienisolate	22
2.2 Nährmedien	23
2.3 PCR	24
2.4 DNA-Sonden, Primer und Kits	27
2.5 Versuchsablauf	29
2.5.1 Vorbereitung der Reagenzien	29
2.5.2 Vorbereitung der Isolate	29
2.5.3 Hybridisierung	30
2.6 Geräte und Chemikalien	32
3. Ergebnisse	35
3.1 Positivprobe mit <i>Porphyromonas gingivalis</i> -Isolaten	35
3.2 Nachweis der Spezifität der verwendeten DNA-Sonden anhand von Negativproben	39

3.3	Untersuchung auf Eigenfluoreszenz	42
3.4	Optionale DAPI-Färbung	44
3.5	PCR-Nachweis verwandter Spezies einer anderen Gattung	47
4.	Diskussion	48
5.	Zusammenfassung	56
6.	Literaturverzeichnis	57
7.	Danksagung	77
8.	Lebenslauf	78
9.	Anhang	I
9.1	Abbildungsverzeichnis	I
9.2	Tabellenverzeichnis	I

1. Einleitung

1.1 Parodontitis

1.1.1 Epidemiologie

Bei der Parodontitis handelt es sich primär um eine bakteriell induzierte entzündliche Infektionserkrankung des Parodontiums, die unbehandelt zu einem Verlust des parodontalen Stützgewebes und letztendlich zum Zahnverlust führen kann (62). Von den über 500 subgingival nachgewiesenen Mikroorganismen (150) stehen nur wenige eng mit der Parodontitis in Verbindung. Zu diesen wird *Porphyromonas gingivalis* gezählt, welcher darüber hinaus eine der „Schlüsselfunktionen“ bei der Parodontitis einnimmt (124). In der Bundesrepublik Deutschland ist die Parodontitis mit 27.3% bei den über 40-Jährigen immerhin die häufigste Ursache für Zahnextraktionen, noch vor Karies mit 20.7%. Mit 18.7% folgt die kombinierte Indikation aus Parodontitis und Karies (105). Bei einem Drittel der Erwachsenen können analog dazu maximale Taschensondierungstiefen von 5mm mittels eines CPI-Parodontalstatus erhoben werden. Schwere Parodontitisformen sind bei 14.1% zu verzeichnen (85).

Die Prävalenz der Diagnose Parodontitis nimmt eindeutig mit dem Alter zu, zum Beispiel liegen bei lediglich 10% der 20-29-Jährigen klinische Attachmentverluste von 3-4mm an mehr als vier Stellen vor, bei den 60-69-Jährigen sind es jedoch schon 62% (97).

9-35% der 18-35-Jährigen sowie 18-70% der 36-55-Jährigen und 44-81% der über 55-Jährigen haben klinische Attachmentverluste von 3-4mm, gleichermaßen zeigt sich eine Zunahme auch bei den klinischen Attachmentverlusten von mindestens 5mm: bei den 18-35-Jährigen lediglich 0.3-6%, 12-27% bei den 36-55-Jährigen und 35-51% bei den über 55-Jährigen (2, 24, 25).

Bei allein 40-100% der Patienten mit „chronischer Parodontitis“ ist dieses Bakterium nachweisbar (117). Damit korreliert, dass der Anteil von *P. gingivalis* an der subgingivalen Mikroflora der parodontalen Taschen bei den tiefen

Taschen proportional beträchtlich höher ist als bei den schwach Ausgeprägten (117). Die Spezies ist darüber hinaus ein Hauptpathogen sowohl bei periimplantitisbedingten Implantatverlusten, bei Misserfolgen der regenerativen Therapien sowie bei akuten parodontalen Abszessen (80, 95, 116).

1.1.2 Klassifikation

Die bisherige Klassifikation der Parodontitiden, die sich nach dem Lebensalter des Auftretens sowie der Progressionsrate richtete, wurde durch die auf dem „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ im Jahre 1999 erstellte Klassifikation der parodontalen Erkrankungen und Zustände (8) aufgegeben und ist in Tabelle Nr. 1 dargestellt. Begriffe wie „juvenile Parodontitis“ oder „adulte Parodontitis“ wurden verlassen und durch die Gliederung in „chronische Parodontitis“ und „aggressive Parodontitis“ ersetzt, da sie das Augenmerk auf das Ausmaß und die Schwere der Erkrankung in Relation zum Alter verstärken (42).

Tabelle Nr. 1: Klassifikation parodontaler Erkrankungen und Zustände (gekürzt: Armitage et al., 1999 (8)); Gingivopathien werden hier nicht berücksichtigt.

* weitere Einteilung nach Schweregrad: leichter (1-2 mm), moderater (3-4 mm) und schwerer (≥ 5 mm) klinischer Attachmentverlust.

<p>I Chronische Parodontitis *</p> <p>A lokalisiert (< 30 sites betroffen)</p> <p>B generalisiert (> 30 sites betroffen)</p> <p>II Aggressive Parodontitis *</p> <p>A lokalisiert (< 30 sites betroffen)</p> <p>B generalisiert (> 30 sites betroffen)</p> <p>III Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen</p> <p>A assoziiert mit hämatologischen Störungen</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 erworbener Neutropenie 2 Leukämie 3 andere <p>B assoziiert mit genetischen Störungen</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Familiäre oder zyklische Neutropenie 2 Down-Syndrom 3 Leukozyten-Adhäsions-Syndromen 4 Papillon-Lefèvre-Syndrom 5 Chediak-Higashi-Syndrom 6 Histiozytose 7 Glykogenosen 8 Infantile Agranulozytose 9 Cohen-Syndrom 10 Ehlers-Danlos-Syndrom (IV und VIII) 11 Hypophosphatasie 12 andere <p>C nicht andersweitig klassifiziert</p>	<p>IV Nekrotisierende parodontale Erkrankungen</p> <p>A Nekrotisierende ulzerative Gingivitis</p> <p>B Nekrotisierende ulzerative Parodontitis</p> <p>V Abszesse des Parodontiums</p> <p>A Gingivaler Abszess</p> <p>B Parodontaler Abszess</p> <p>C Perikoronaler Abszess</p> <p>VI Parodontitis assoziiert mit endodontalen Läsionen</p> <p>A Kombiniert parodontal-endodontale Läsion</p> <p>VII Entwicklungsbedingte oder erworbene parodontale Deformitäten oder Zustände</p> <p>A Lokalisierte zahnbedingte Faktoren, die zu plaque-induzierten gingivalen oder parodontalen Erkrankungen prädisponieren</p> <p>B Peridentale mukogingivale Deformitäten oder Zustände</p> <p>C Mukogingivale Deformitäten oder Zustände im zahnlosen Kiefer</p> <p>D Okklusales Trauma</p>
---	---

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Um Parodontalerkrankungen entstehen zu lassen, sind Pathogene erforderlich. Die zur Zeit vorhandenen Daten lassen aber den Schluss zu, dass diese für sich genommen nicht ausreichen, das pathologische Geschehen zu erklären. Wenn auch Plaque über den Weg der Gingivitis für die häufigsten Parodontitiden eine Grundvoraussetzung ist, so führt dieser Biofilm alleinig respektive dass Vorhandensein von parodontopathogenen Bakterien nicht unbedingt direkt zu einer Parodontitis (113). Hierzu ist zu erwähnen, dass auch nicht aus jeder Gingivitis wiederum eine Parodontitis entsteht, letzterer jedoch immer eine Gingivitis voraus geht. Auch gibt es nach der „Burst-Hypothese“ keine kontinuierliche Progression von Attachmentverlusten, sondern ein Wechselspiel zwischen Exazerbationsphasen und Remissionsphasen, welche in den oben angedeuteten Interaktionen zwischen dem Wirt und den parodontopathogenen Bakterien wurzelt (119).

Die lokalen Umweltbedingungen in der parodontalen Tasche dürften bei der Regulation der Expression von Virulenzfaktoren durch pathogene Spezies gleichsam von Bedeutung sein: Voraussetzung ist, dass es sich um einen

virulenten Typus handelt, welcher chromosomale und extrachromosomale genetische Faktoren besitzt, um die Erkrankung zu initiieren, ebenso muss der Wirt eine gewisse Anfälligkeit für dieses Pathogen mitbringen, darüber hinaus müssen die Bakterien in ausreichender Anzahl vorhanden sein und eine individuelle Schwelle für den Wirt übersteigen, andere Bakterienspezies haben den Vorgang zu begünstigen oder ihn zumindest nicht zu hemmen, die Mikroorganismen müssen am entsprechendem Ort lokalisiert sein und die lokalen Umweltbedingungen sollten der Expression von speziesvirulenten Eigenschaften zuträglich sein (122). Es hat sich herauskristallisiert, dass neben *P. gingivalis* nur einige bestimmte Bakterienspezies an der Parodontitis beteiligt sein können, was die Theorie der spezifischen Plaquehypothese unterstützt (122).

Des Weiteren gestaltet sich die individuelle Anfälligkeit für die Parodontitis in Abhängigkeit von der Potenz des Immunsystems eines Wirts, woraus folgt, dass es exogene und/oder endogene Faktoren gibt, welche die lokale und/oder die systemische Immunabwehr negativ beeinflussen. Risikofaktoren oder Risikoverhaltensweisen für Parodontitis scheinen neben HIV unter anderem eine genetische Prädisposition zum Beispiel bedingt durch einen IL-1-Gen-Polymorphismus, Dysfunktionserkrankungen der Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN) wie beispielsweise beim Papillon-Lefèvre-Syndrom sowie weitere Anomalien der Immunabwehr zu sein. Weiterhin sind zu nennen, jedoch auch noch kontrovers diskutiert sind endokrinologische Erkrankungen wie die Osteopenie und die Osteoporose, vielleicht die Hormonersatztherapie bei Frauen in der Postmenopause, wohl sicher aber auch psychosozialer Stress und Rollenstress, Rauchen und Diabetes mellitus (106, 107, 135, 49, 35, 58).

Neben möglichen Variationen in der Expression von Virulenzfaktoren von *P. gingivalis*, welche sich durch unterschiedlich virulente Stämme bedingt, sind in erster Linie lokale und/oder systemische Immunstörungen verantwortlich (98, 96, 134, 113). Etwas allgemeiner lässt sich formulieren, dass sich die Anfälligkeit eines Wirts für eine Parodontitis aus dem Zusammenspiel zwischen Bakterien, dem Wirt und Umweltfaktoren ergibt (113).

Bei der Pathogenese marginaler Parodontitiden können prinzipiell unterschiedliche Zustände differenziert werden. Existiert eine adäquate Antwort des spezifischen und/oder unspezifischen Immunsystems ist es unwahrscheinlich, dass parodontopathogene Bakterien eine Parodontitis erzeugen. Allerdings kann sich bei den oben bereits angesprochenen exogenen oder endogenen Störfaktoren der lokalen und/oder systemischen Immunabwehr die Situation zu Gunsten dieser Bakterien auswirken und die Erkrankung induzieren. Auch bei einer eigentlich adäquaten lokalen und systemischen Immunabwehr können parodontopathogene Bakterien eine überschiessende Immunantwort bewirken (zum Beispiel bei einem hyperinflammatorischen Reaktionstyp). Wiederum kann es besonders virulenten parodontopathogenen Bakterien einer adäquaten Immunabwehr zum Trotz gelingen, eine Parodontitis zu induzieren. Gerade *P. gingivalis* scheint eine paradoxe Situation herbeiführen zu können, da es die Fähigkeit besitzt, zum einen Komponenten der angeborenen Immunabwehr zu aktivieren als auch andere zu supprimieren, was sich unter anderem in komplexen Zytokin- und Lipopolysaccharid-Interaktionen begründet (siehe unter Kap. 1.2) (73). Der größte Teil des Gewebeschadens entsteht bei dieser Infektionserkrankung jedoch aufgrund der Immunantwort des Wirts und nicht durch das infektiöse Agens selbst (140, 134).

1.1.4 Mikrobiologie

P. gingivalis gehört zu einem von zwei mikrobiologischen Komplexen, die zu den mikrobiellen Hauptverursachern der Parodontitis gezählt werden, dem sogenannten „roten Komplex“ aus *P. gingivalis*, *Tannerella forsythensis* und *Treponema denticola* (siehe Abb.1). Dieser Komplex ist auffallend mit den klinischen Messungen bei parodontal Erkrankten wie der Taschensondierungstiefe und dem Bluten auf Sondierung assoziiert. Der zweite „orangene Komplex“ beinhaltet *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum vincentii*, *Fusobacterium*

nucleatum nucleatum, *Fusobacterium nucleatum polymorphum*, *Fusobacterium periodonticum*. Assoziierte Spezies dieser Gruppe sind wiederum *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* und *Campylobacter gracilis* (123, 71).

Bei parodontal Gesunden überwiegen supra- als auch subgingival *Actinomyces*arten. Diese Dominanz von *Actinomyceten* findet sich noch, aber schon stark reduziert, im supragingivalen Bereich von parodontal Erkrankten (152), ändert sich jedoch massiv in deren subgingivalen Arealen. Die *Actinomyceten* reduzieren sich zu Gunsten der Spezies des roten und orangenen Komplexes. Dies gilt nicht nur für die Relationen, sondern auch für die absoluten Zahlen. Drei weitere Komplexe sind neben den erstgenannten beiden Komplexen noch zu erwähnen (siehe Abbildung 1): Der „grüne Komplex“ (drei *Capnocytophaga*-Spezies, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans serotyp a*), der „gelbe Komplex“ (eine *Streptococce*n-Gruppe mit den wiederum eng verwandten *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* und *Streptococcus oralis*) und schließlich der „violette Komplex“ (*Actinomyces odontolyticus* und *Veillonella parvula*). Alle diese Komplexe spiegeln bevorzugte Gemeinschaften in subgingivaler Plaque bei parodontal Erkrankten wieder. Ist ein Komplex weiter unterteilt, weist dies auf eine engere Verwandtschaft hin. Bakterien außerhalb dieser Komplexe (*Actinomyces*-Spezies wie *Actinomyces naeslundii* *genospezies II* (= *Actinomyces viscosus*, in untenstehender Abbildung blaues Feld), *Selenomonas noxia* und *A. actinomycetemcomitans serotyp b*) haben keine nähere Beziehung untereinander respektive zu den Komplexen (123).

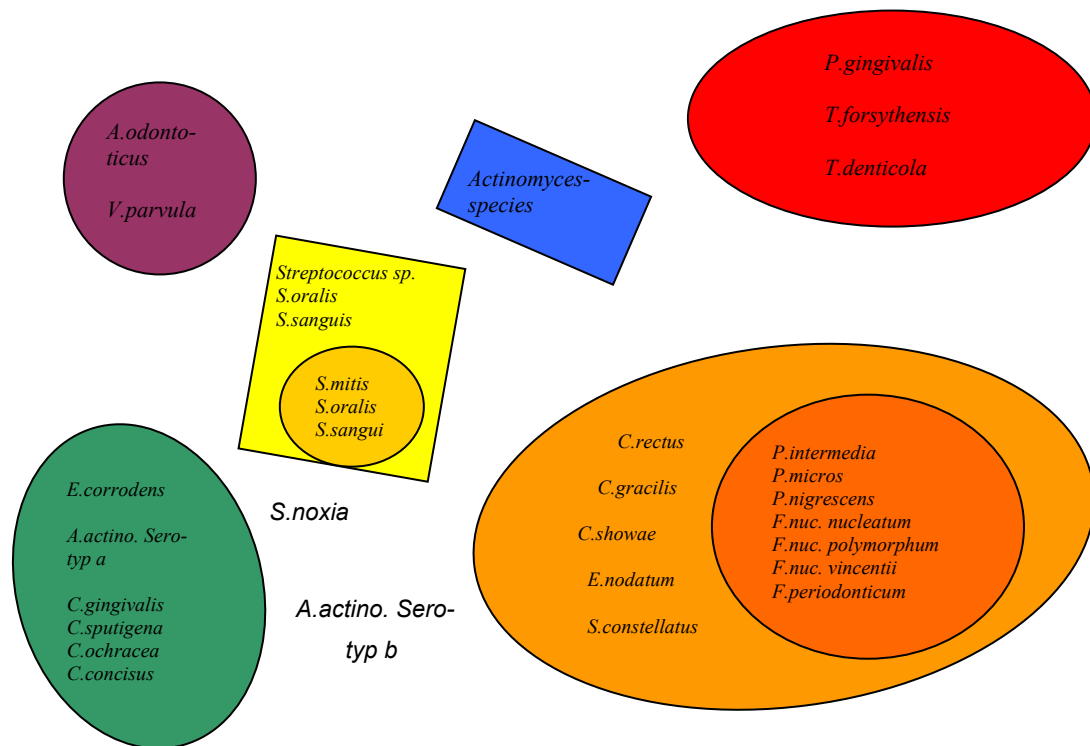


Abb.1: „Subgingivale mikrobiologische Komplexe“ frei nach Socransky et al. (1998) (123)

Der vielleicht wichtigste Faktor für die Zusammensetzung der subgingivalen Mikroflora ist jedoch der parodontale Gesundheitsstatus des Wirts, mit den Parametern gingivale Rötung, Blutung auf Sondierung, Suppuration sowie der Zusammensetzung der mikrobiellen Besiedlung, welche wiederum eng mit der Taschensondierungstiefe korreliert. Damit einher geht das Vorhandensein respektive die Anzahl der Spezies des „roten Komplexes“ als auch des „orangenen Komplexes“, wobei der Vergleich der mikrobiellen Besiedlung zu parodontal nicht Erkrankten interessant ist (63, 123, 121). Daraus geht unter anderem hervor, dass Spezies des „roten Komplexes“ nicht nur an erheblich mehr Messstellen, sondern auch in erheblich größerer Anzahl gefunden werden (63, 121, 123). Veränderungen der lokalen Umweltbedingungen wie beispielsweise der Vertiefung von Zahnfleischtaschen führen zu einem sprunghaften Anstieg sowohl der Bakterienzellzahlen als auch der Häufigkeit der Detektion der Spezies aus den beiden vorgenannten Komplexen, wohin

gehend wiederum *Actinomyces naeslundii* genospecies II davon unbeeindruckt bleibt (63, 121, 123).

1.1.5 Biofilm

Auf den anorganischen Zahnoberflächen können, unterstützt durch die spezifischen Bedingungen der Mundhöhle, ortständige Bakterien sogenannte Biofilme ausbilden. Im Biofilm lebende Bakterien haben gegenüber den planktonisch existierenden Bakterien einige Selektionsvorteile, wie zum Beispiel einen erhöhten Schutz gegen antimikrobielle Substanzen (27) oder körpereigene Abwehrmechanismen (126, 153, 32). Hinzu kommen diverse synergistische Effekte. Durch die Synthese kaum löslicher extrazellulärer Polysaccharide und verschiedener Verankerungsmechanismen mit der Zahnoberfläche sind Biofilme nur relativ schlecht von dieser zu lösen. Jedoch muss man den primären Biofilm als solchen nicht alleinig als den pathologischen Faktor bei der Entstehung von Parodontitiden sehen. Vielmehr verleiht erst die allmähliche Umwandlung eines kommensalischen und somit zuerst noch physiologischen bakteriellen Ökosystems hin zu einer pathogenen Bakterienflora dem Biofilm seinen negativen Charakter (44).

An dieser Stelle sei ein kurzer Blick auf den Aufbau eines Biofilms erlaubt. Biofilme setzen sich zu 75-80% aus einer von den Bakterien synthetisierten, organischen polymeren Matrix sowie zu nur 15-20% aus Bakterienzellen zusammen (127). So genannte Mikrokolonien bilden die morphologische Grundeinheit des Biofilms. Eine solche Mikrokolonie setzt sich wiederum in der Regel aus einer Vielzahl von verschiedenen Bakterienspezies zusammen (39). Die Mikrokolonie sitzt basal fest verankert der besiedelten Oberfläche auf. Zwischen den Einzelkolonien durchziehen den Biofilm ein Netzwerk von wasserführenden Kanälen (44). Diese führen einen Flüssigkeitsstrom, der vermutlich dem Transport von Stoffwechselprodukten, Nährstoffen und der Homöostase innerhalb des Biofilms dient (44). Der biochemische

Informationsaustausch zwischen den Bakterien, das „quorum sensing“ scheint eng mit diesen Kanälen verbunden zu sein (30, 136). Die extrazelluläre Matrix bildet das Gerüst, das die einzelne Bakterienzelle im Verbund hält. Sie besteht aus unterschiedlich verzweigten Polysacchariden mit atypischen Glykosidbindungen, Proteinen, Salzen sowie extrazellulär abgelagerten DNA-Molekülen. Diese Struktur verleiht dem Biofilm unter anderem die mechanische Stabilität, schützt vor Austrocknung, vor antibakteriellen Faktoren und übt eine Pufferfunktion aus (44). Zum Teil dienen diese Polysaccharide auch wiederum als Nährstoff für Biofilmbakterien (130).

Des Weiteren unterliegt der Biofilm einer funktionellen Kompartimentierung (44), das heißt, man findet dort zum Teil eng benachbarte Areale mit Unterschieden im pH-Wert, der Sauerstoffspannung, dem elektrochemischen Potential, der Reproduktionsrate, der Proteinexprimierung oder dem Vorhandensein energiereicher Verbindungen, mit anderen Worten, die Kompartimentierung sorgt für Areale mit unterschiedlichen Aufgaben (31, 68, 125, 154). Bakterien einer Spezies können in einem Kompartiment bevorzugt synthetisieren, in einem anderen eher Zellteilung betreiben. Eine selektive Regulation der Gentranskriptionsrate führt zu diesen verschiedenen phänotypischen Merkmalen innerhalb einer Spezies in einem Biofilm, was eine permanente genetisch gesteuerte Anpassung an sich verändernde Lebensbedingungen in der Mundhöhle bewirkt (64, 111).

Die Entwicklung eines bakteriellen Biofilms kann in drei Phasen differenziert werden: Die primäre Adhäsion planktonischer Bakterien auf der Zahnoberfläche, die Proliferation mit gleichzeitiger Ausbildung von Mikrokolonien unter Formierung des typischen Biofilmgerüsts und schließlich der Ausstoß von Tochterkolonien (32). Dabei sind über 500 orale Bakterienspezies (150) in der Lage, Adhäsine zu synthetisieren, die diese Spezies unter anderem zur interzellulären Ko-Aggregation befähigen (69). Zum Teil wird die Anlagerung weiterer Spezies auch durch das sogenannte „bridging“ ermöglicht, welches die Anheftung von Bakterien an vor allem durch *Streptokokken-sp.* synthetisierte extrazelluläre Polysaccharide vermittelt (108). Kommen interessanterweise epitheliale Zellen mit bakterieller Neuraminidase in

Kontakt, wird das Attachment der *Streptokokken* herabgesetzt sowie das von *P. gingivalis* und *P. intermedia* verstärkt (52, 44, 70).

Damit sich ein funktionierendes „Ökosystem Biofilm“ entwickeln kann, ist eine Synergismen schaffende, sich selbst optimierende Koordination der Einzelprozesse im reifenden Biofilm unabdingbar. Dies erfolgt durch eine Art von interzellulärer Kommunikation, welche als „quorum sensing“ bezeichnet wird und wiederum stark von der Zelldichte abhängt (32, 47). Der Hauptsinn dieses signalmolekülvermittelten Informationsaustausches, welcher darauf basiert, dass Bakterienzellen kontinuierlich Signalmoleküle abgeben, liegt in der gegenseitigen Regulation der Genexpression zum gegenseitigem Nutzen (44). Auch bei der Spezies *P. gingivalis* ist ein solcher Regulationsmechanismus nachgewiesen worden (sogenanntes Autoinduktor-II-System zur Signaltransduktion) (71, 44, 46).

Aber noch etliche weitere, auch durch andere Bakterien verursachte, *P. gingivalis* begünstigende Faktoren müssen sich einstellen, um diesem Bakterium fördernde Wachstumsbedingungen in einem Biofilm zu ermöglichen, wie Veränderungen der Temperatur, des pH-Werts oder des elektrischen Potentials (118, 61).

Trotz schon vieler bekannter und spannender Details sind die Kommunikation der Spezies untereinander, die „Zell zu Zell-Adhärenz“ als auch die sogenannte „Koaggregation“ zur Zeit nur teilweise geklärte Fragen, vieles bleibt noch offen.

1.2 *Porphyromonas gingivalis*

Die meisten oralen obligat anaeroben gramnegativen Stäbchen wurden ursprünglich der *Bacteroides*-Gattung zugeordnet, jedoch änderte sich die Taxonomie dahingehend, dass man die Masse dieser Keime der *Bacteroides fragilis*-Gruppe, welche bevorzugt im Darm vorkommt, zugruppierte. *Bacteroides forsythus* wurde gänzlich neu zu *T. forsythensis* klassifiziert. Es entstanden des Weiteren für die oralen Mikroorganismen die saccharolytische Gattung „*Prevotella*“ sowie die asaccharolytische Gattung „*Porphyromonas*“. Einige Spezies dieser Gattungen, sogenannte „schwarzpigmentierte Anaerobier“, bilden spezifisch auf Blutagar gezüchtet schwarz oder braun pigmentierte Kolonien. Das Pigment stellt eventuell einen Abwehrmechanismus gegen toxisch-oxidative Sauerstoffmetabolite dar, da das eisenporphyrinhaltige, schwarze Pigment Hämatin nicht nur Sauerstoff, sondern auch reaktive Oxidationsmittel von PMN's binden und diesen „oxidativen Stress“ neutralisieren kann (10). Speziell *P. gingivalis* verfügt im besonderen Maße noch über ein Schutzenzym gegen den „oxidativen Stress“, die Superoxiddismutase, welche O_2^- -Ionen mit Protonen wieder zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff reduziert (5, 6). Ein essentieller Wachstumsfaktor für diese „schwarzpigmentierten Anaerobier“ ist folglich das Hämin, welches mittels des bakterieneigenen Hämolytins für die Bildung des Hämatins notwendig ist (98, 26).

Die weitere taxonomische Unterteilung von *P. gingivalis* erfolgt in sechs Serotypen, die sich durch ihre verschiedenen Kapselpolysaccharide (K-Antigene) ergeben (83).

Alle oben genannten Gattungen können unterschiedliche Primärhabitats haben, *P. gingivalis* kommt zum Beispiel hauptsächlich in subgingivalen Regionen vor, vor allem in Zellen und Gewebe von fortgeschrittenen parodontalen Läsionen, wo es das Risiko für Attachment- und Alveolarknochenverluste ansteigen lässt (62, 60, 41, 78, 1, 13, 14, 15, 58, 59). Man kann es jedoch auch in den Sekundärhabitats Zunge und Tonsillen, Speichel oder in bukkalen Epithelien nachweisen (98), wodurch eine Transmission zwischen Wirten ermöglicht

werden könnte (109). *P. gingivalis* kommt nur selten in der Plaque von Gesunden vor, hat jedoch seine ökologische Nische respektive sein Reservoir auf den vorgenannten diversen Schleimhautoberflächen (109, 83). Wie oben angedeutet, ist die Detektionsfrequenz von *P. gingivalis* als auch dessen Quantität in parodontalen Läsionen, besonders auch bei refraktären posttherapeutischen parodontalen Taschen, erhöht (21, 60, 145, 18, 115, 149, 133, 28, 86).

P. gingivalis gilt im Tierversuch als hoch virulent, allerdings ist diese Virulenz nicht bei jedem *P. gingivalis*-Typstamm von gleicher Ausprägung. Nicht erstaunlich ist, dass je virulenter ein Typstamm ist, er auch umso eher mit parodontal Erkrankten assoziiert ist und bei gesunden *P. gingivalis*-Trägern eher die avirulenten Typstämme zu finden sind (56, 143, 82, 93, 129, 11, 57, 7, 17). Die Expression von Virulenzfaktoren wird durch die lokalen Umweltfaktoren, wie die Kalzium-, Eisen- oder Magnesiumkonzentration, osmotischer Druck oder die Temperatur beeinflusst. So kann interessanterweise speziell die Eisenkonzentration die Membranproteinsynthese von *P. gingivalis* verändern und ein Eisenmangelstress das Wachstum sogar zum Stillstand bringen (84, 12, 22).

Die Virulenz dieser Spezies resultiert aus etlichen potentiellen Virulenzfaktoren, welche helfen, die Wirtsabwehr zu umgehen und Gewebe zu destruieren. Dieses sind unter anderem der „fibroblast inhibitory factor“, der „bone resorption inducing factor“ (62) wie auch eine Vielzahl von Proteasen (zum Beispiel die Gingipaine, welche spezifisch für arginin- oder lysinhaltige Peptidbindungen sind und mit Oberflächenadhäsinen komplexieren). Des Weiteren sind Wirtsmoleküle wie Immunglobuline, Komplementfaktoren, häm- oder eisenbindende Proteine, Glykoproteine oder Moleküle, welche die Wirtsentzündungsreaktion modulieren oder inaktivieren können, zu nennen. Hinzu kommen kollagenabbauende Enzyme (16), Fettsäuren (98), Hämolysin (37), zytotoxische Stoffwechselprodukte wie beispielsweise NH_3 , H_2S und Indol sowie Kapselantigene und Fimbrien (94, 147, 98), wobei die letztgenannten wiederum für die Adhärenz an oralen Epithelzellen und an speichelbenetzten Zahnoberflächen sorgen. *P. gingivalis* kann die Migration von PMN's durch

epitheliale Barrieren hemmen (81) und ebenso die Zytokinsynthese als auch den Zytokinabbau in epithelialen Gingivazellen (zum Beispiel IL-8) beeinflussen (34, 43, 110). Dabei lässt das Bakterium, wie schon unter Kap. 1.1.3 angedeutet, immunologisch eine paradoxe Situation entstehen (73). Es entfaltet zum einen antiinflammatorische Effekte, da es durch seine Lipopolysaccharide (LPS) die IL-1ra-Ausschüttung von PMN's und Monozyten/Makrophagen fördert. Ebenso entsteht ein solcher Effekt durch die Fimbrien des Bakteriums, welche die IL-4-Synthese von T-Zellen begünstigt. Dem gegenüber stehen jedoch mannigfaltige proinflammatorische Effekte, von denen die paradoxen nur einen kleineren Ausschnitt darstellen. Unter anderem fördern die LPS auch die proinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-8 und TNF- α von PMN's und Monozyten/Makrophagen, während die Fimbrien die ebenso proinflammatorische IL-2-, TNF- α - und IFN- γ -Ausschüttung von T-Zellen fördern (73).

1.3 Verwandtschaftsverhältnisse

Nachfolgend stehen 10 Phyla (Divisionen, Sektionen), durch die die Welt der „eubacteria“ unterteilt wird (151); das Phylum Nr. 6 wird „CFB“-Phylum genannt:

1. Purple bacteria
2. Gram-positive eubacteria
3. Cyanobacteria and chloroplasts
4. Spirochetes and relatives
5. Green sulfur bacteria
6. Bacteroides, flavobacteria and relatives
7. Planctomyces and relatives
8. Chlamydiae
9. Radioresistant micrococci and relatives
10. Green non-sulfur bacteria and relatives

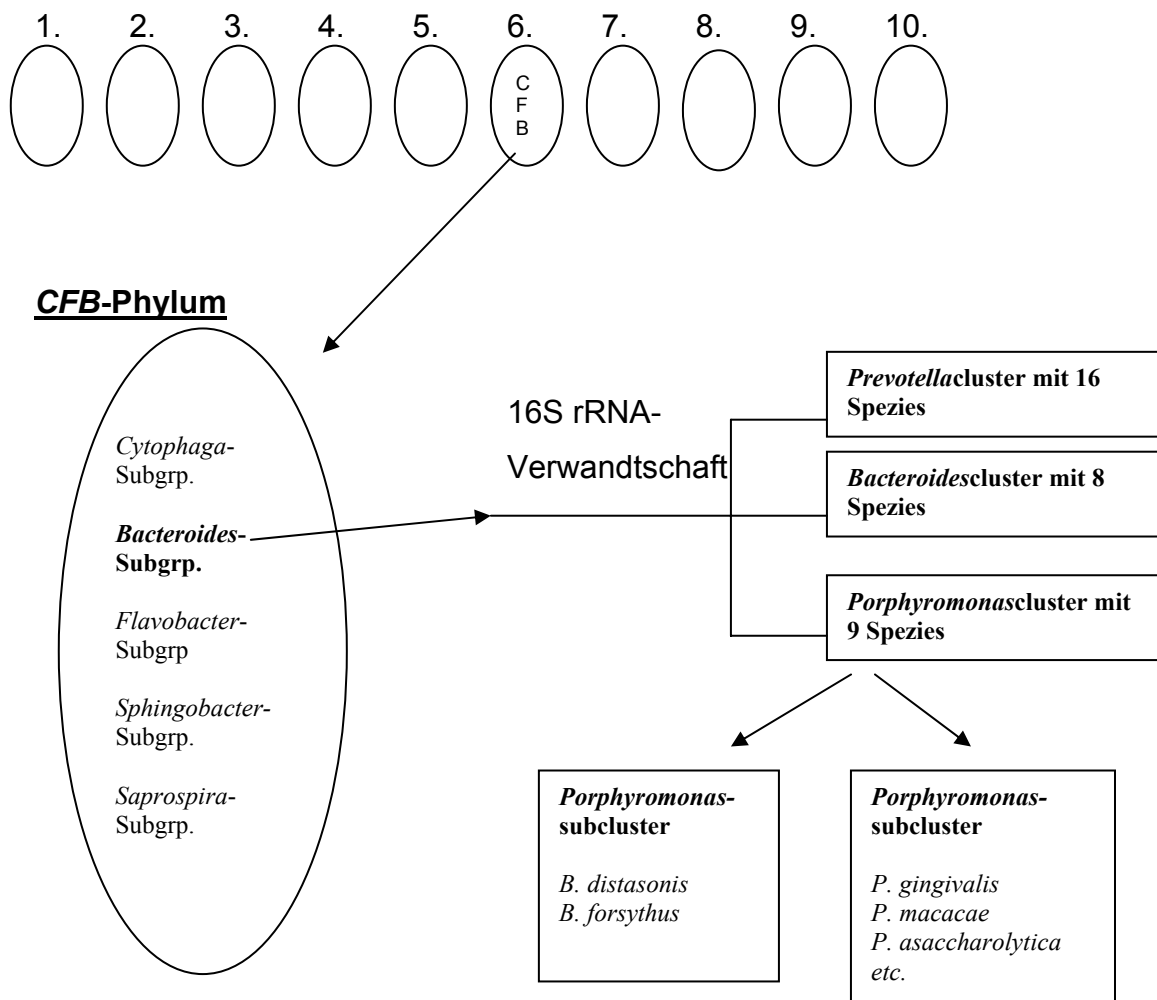


Abb.2: Das *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides*-Phylum (CFB-Phylum) (100)

1994 wurde die Verwandtschaftsnähe anhand der 16S rRNA beschrieben (100). Demzufolge repräsentiert die *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides*-Gruppe (CFB) eines von insgesamt alle Bakterien umfassenden zehn Phyla. Das CFB-Phylum ist wiederum aus fünf Subgruppen zusammengesetzt: *Cytophaga*, *Flavobacter*, *Sphingobacter*, *Saprospira* und *Bacteroides* (Abb.2).

In der *Bacteroides*subgruppe des CFB-Phylums werden wiederum drei große phylogenetische Cluster unterteilt, welche die meisten der Spezies von *Prevotella*, *Bacteroides* und *Porphyromonas* umfassen. Die phylogenetische Untersuchung der 16S rRNA führt im Einzelnen zur folgenden Einteilung: dem *Prevotella*cluster, dem *Bacteroides*cluster und dem *Porphyromonas*cluster. Der *Prevotella*cluster umfasst 16 *Prevotellaspezies*, unter anderem *P. intermedia*, *P. nigrescens* (früher *P. intermedia serotype II* (114)) und *P. oralis*. Der *Bacteroides*cluster enthält acht Spezies, unter anderem *B. fragilis*. Der *Porphyromonas*cluster beinhaltet neun Spezies, beispielsweise genannt seien *P. asaccharolytica*, *P. gingivalis*, *B. macacae* (heute *Porphyromonas macacae*) und *B. forsythus* (heute *T. forsythensis*) und wird wiederum in zwei Subcluster unterteilt, wobei der eine davon ausschließlich *B. forsythus* und *B. distasonis* umfasst.

Im *Prevotella*cluster stimmt die 16S rRNA durchschnittlich zu 91% überein, im *Bacteroides*cluster zu 93% und im *Porphyromonas*cluster zu annähernd 87%. Zwischen den beiden Clustern *Prevotella* und *Porphyromonas* gibt es eine durchschnittliche Übereinstimmung von annähernd 80% und zwischen Mitgliedern des *Porphyromonas*- und des *Bacteroides*cluster von ca. 84%. Zwischen den beiden *Porphyromonas*subclustern wiederum liegt die Übereinstimmung im Durchschnitt bei 86% (100). Eine Veranschaulichung der verwandtschaftlichen Beziehung von *P. gingivalis* bietet der aus der 16S rRNA-Sequenzierung entstandene phylogenetische Baum in Abbildung 3.

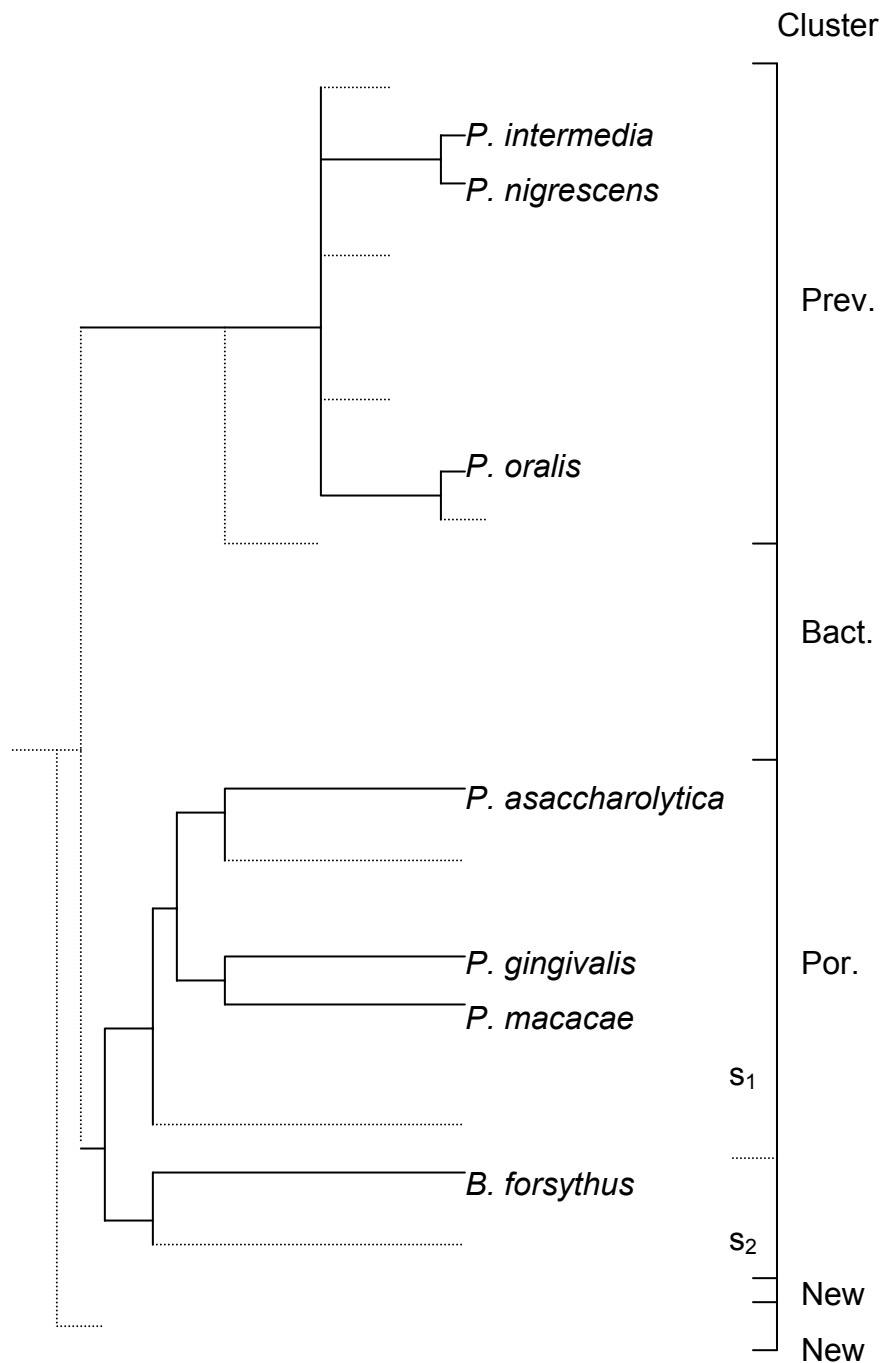


Abb. 3: Ausschnitt eines phylogenetischen Baumes der *Bacteroides*-Subgruppe des *CFB*-Phylums als Resultat einer 16S rRNA-Sequenzierung (im Bereich der gestrichelten Linien modifiziert und gekürzt, da nur in dieser Arbeit verwendete Spezies aufgeführt sind; Paster et al., 1994) (100). (Prev. = *Prevotella*, Bact. = *Bacteroides*, Por. = *Porphyromonas*, s₁ und s₂ = Subgruppen des *Porphyromonas*clusters).

Tabelle Nr. 2: Prozentuale Übereinstimmungen bzw. Unterschiede zwischen den jeweiligen 16S rRNA-Sequenzen (100)

Übereinstimmung[%]	<i>Bma</i>	<i>Pas</i>	<i>Bf</i>	<i>Po</i>	<i>Pn</i>	<i>Pi</i>	<i>Pg</i>
Unterschied[%]							
<i>Porphyromonas</i>	88,3	85,1	87,5	79,6	80,2	80,2	---
<i>gingivalis (Pg)</i>	12,8	16,6	13,6	23,8	23,0	23,0	---
<i>Prevotella</i>	78,2	78,4	81,4	87,0	94,0	---	
<i>intermedia (Pi)</i>	25,8	25,4	21,4	14,3	6,3	---	
<i>Prevotella</i>	78,5	77,5	80,9	87,9	---		
<i>nigrescens (Pn)</i>	25,3	26,7	22,1	13,2	---		
<i>Prevotella oralis (Po)</i>	78,0	77,7	80,9	---			
	26,0	26,4	22,1	---			
<i>Bacteroides</i>	86,6	84,5	---				
<i>forsythus (Bf)</i>	14,7	17,3	---				
<i>Porphyromonas asa-</i>	85,7	---					
<i>ccharolytica (Pas)</i>	17,1	---					
<i>Bacteroides</i>	---						
<i>macacae (Bma)</i>	---						

In jedem der drei Hauptcluster erscheinen die beiden Schlüsselbasensignaturen: ein A:U-Paar an Basenposition 947:1234 und ein G an 1202. Ebenso ein G:C an Position 897:902, ein A:U an 943:1340 und ein C:G an 1089:1096. Eine weitere Kontinuität besteht zwischen dem *Prevotella*- und dem *Porphyromonas*-cluster: ein G an Position 122 (außer bei *P. asaccharolyticus*, dort ein A).

Alle Mitglieder des *Prevotella*-clusters haben dagegen ein G an Position 547 (in den anderen beiden Clustern ist es ein A).

1989 wurde eine Verwandtschaft zwischen *Bacteroides* und *Fusobacterium* beschrieben (142). Im 5S rRNA Dendrogramm bildet demnach *Bacteroides* zusammen mit *Cytophaga* und *Fusobakterium* eine gemeinsame Gruppe,

genau wie in den 16S rRNA Analysen. Jedoch lassen von der 5S rRNA abgeleitete „intrapyläre“ Verwandtschaften vermuten, dass *Bacteroides* spezifisch enger noch mit *Cytophaga* als mit *Fusobakterium* verwandt ist, gleiches ergaben auch die 16S rRNA Analysen. Die phylogenetische Eingruppierung auf Basis von 16S rRNA-Vergleichen von *Fusobacterium nucleatum* zu *Bacteroides spp.* wurde auch als „eng verwandt“ bezeichnet und man verwies auf einige Ähnlichkeiten in der DNA (20). Überdies ist der Frühbesiedler *F. nucleatum* immer zugegen, wenn sich der Spätbesiedler *P. gingivalis* angesiedelt hat (71). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit *F. nucleatum* eingesetzt, um eine falsch positive Detektion von eigentlich gegen *P. gingivalis* gerichteten DNA-Sonden zu überprüfen.

Überdies wurde auf möglicherweise fast vollständige Deckungsgleichheiten bezüglich der 16S rRNA zwischen eng verwandten Bakterien hingewiesen, wie *Bacillus globisporus W25T*, *Bacillus psychrophilus W16AT* und *W5*, bei denen eine 99,5%ige Sequenzidentität vorliegt (45). Mögliche Spezifitätsschwächen der Technik könnten auch darin begründet liegen.

1.4 Fluoreszenz in Situ Hybridisation (FISH)

Um im Rahmen der Parodontitistherapie bei entsprechender Indikation Antibiotika gegen parodontopathogene Bakterien zum Einsatz bringen zu können, ist es von Vorteil herauszufinden welche Bakterien vorliegen, da die Zusammensetzung der Keime von Patient zu Patient variabel ist. Hinzu kommt, dass nach Möglichkeit die physiologische Bakterienflora durch die Antibiotikaapplikation nicht verändert werden soll und eine Resistenzbildung natürlich ebenso unerwünscht ist. Bei der FISH-Technik handelt es sich um eine Methode, die Zusammensetzung der verschiedenen möglichen Bakterien zu analysieren.

Unabhängig voneinander entwickelten 1969 zwei Forscherteams (John et al. und Pardue und Gall) (48, 67, 99) die in situ Hybridisation. Es wurden mittels

mikroautoradiographischer Technik radiomarkierte DNA respektive 28S RNA von *Xenopus*-Eizellen nach Hybridisierung detektiert. Diese Technik ermöglichte es, innerhalb von Zellen Nukleinsäuresequenzen zu prüfen, ohne die Zellmorphologie oder die Zellkompartimente zu verändern. Später wurde diese Technik modifiziert, um zytogenetische Untersuchungen, Untersuchungen zur chromosomalen Evolution oder chromosomale Analysen von Leukämien und Tumoren durchzuführen. In die Mikrobiologie wurde die Technik schließlich 1988 durch Giovannoni et al. (53) eingebracht. Giovannoni nutzte als erster radioaktiv markierte rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden zur mikroskopischen Bakteriendetektion.

In der Zeit von 1984-1989 (Landegent et al., 1984; Pinkel et al., 1986; Pinkel et al., 1988) (74, 102, 103) wurden radioaktive Marker durch nichtisotopische fluoreszierende Marker ersetzt. 1989 nutzte DeLong (36) als erster fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide zum Nachweis einzelner mikrobieller Zellen. Verglichen mit radioaktiv markierten Sonden brauchen fluoreszierende Sonden keine zusätzlichen Detektionsschritte, bieten eine bessere Auflösung und sind sicherer. Hinzu kommt, dass fluoreszierende Sonden mit verschiedenen Farbstoffen für unterschiedliche Emissionen beziehungsweise Wellenlängen ausgestattet werden können, so dass mehrere unterschiedliche Zielsequenzen in einem Hybridisierungsschritt unter Verwendung verschiedener Filter auf einem Objektträger im Mikroskop sichtbar gemacht werden können.

Die FISH-Technik bedient sich dafür der hochspezifischen Bindung von komplementären Nukleinsäuresequenzen und ermöglicht so einen Krankheitserregernachweis. In den letzten Jahren machten die Geschwindigkeit und die Sensitivität der FISH-Technik diese zu einem brauchbaren Instrument, um ökologische, phylogenetische, diagnostische und umweltkundliche mikrobiologische Untersuchungen durchzuführen (3). Mit dem Vorteil der Geschwindigkeit des Nachweises ist ein Zeitaufwand von 3-4 Stunden ab Probenentnahme gemeint. Die Technik ist in vorliegender Arbeit unter Nutzung spezifischer DNA-Sonden gegen bakterielle 16S rRNA gerichtet. Der oben erwähnte Vorteil der relativ hohen Sensitivität ergibt sich aufgrund der riesigen 16S rRNA-Molekülanzahl pro Bakterienzelle (10.000–100.000 in sich schnell

teilenden Zellen). Mittels eines Fluoreszenzmikroskops lassen sich die an die 16S rRNA gebundenen Sonden detektieren.

1.5 FISH in der oralen Medizin

Die Anwendung ausschließlich kultureller Nachweismethoden führte zum quantitativen Unterschätzen der in der Mundhöhle vorkommenden Spezies, über 1500 wurden jedoch so nachgewiesen (101). Mit der FISH-Technik konnten schwer kultivierbare gramnegative Anaerobier wie *T. forsythensis*, *P. gingivalis* oder *P. intermedia* aus subgingivalen Plaqueproben von Parodontitispatienten nachgewiesen werden (50, 51). Ebenso demonstrierte man mit der FISH die hohe Anzahl und die vielfältigen Morphologien an *Spirochaeten* in subgingivalen Plaqueausstrichen (29). Ein Vorteil der Technik ist, dass zugleich auch die Raumverteilung und die Organisation der Bakterien beobachtet werden können (89, 90).

1.6 Fragestellung

1. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob mit der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung unter Verwendung einer bekannten DNA-Sonde die 16S rRNA von 30 *P. gingivalis*-Isolaten sensitiv und spezifisch nachzuweisen ist. Für den Nachweis der Spezifität sollte gegen 10 weitere verwandte/nicht verwandte Spezies getestet werden.
2. Sollte es zu Kreuzreaktionen kommen, würde eine weitere DNA-Sonde hinzugezogen werden.

3. Eine möglicherweise gegebene Eigenfluoreszenz von Spezies könnte zu falsch positiven Ergebnissen führen, so dass die verwendeten Spezies daraufhin untersucht werden müssen.

4. Des Weiteren soll diese molekularbiologische diagnostische Nachweismethode auf parodontologischem Gebiet am Goldstandard der PCR bezüglich Sensitivität, Spezifität und Praktikabilität evaluiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterienisolate

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienisolate sind nebst ihrer Herkunft in Tabelle Nr. 3 aufgeführt. Die 30 *P. gingivalis*-Isolate stammen von verschiedenen Parodontitispatienten und wurden aus subgingivalen Plaqueproben aus der jeweils tiefsten Tasche eines Patienten aus jedem Quadranten für die mikrobiologische Analyse isoliert. Sie wurden bis zu ihrer Anzucht für die Versuche in flüssigem Stickstoff (bei -196°C) gelagert. Es handelt sich um Subkulturen *P. gingivalis*-positiver Patienten. 22 dieser Patienten hatten eine chronische und 8 eine aggressive Form der Parodontitis. Das Geschlechterverhältnis von Frauen zu Männern beträgt 2 : 1 bei einem Patientendurchschnittsalter von 49 Jahren.

Tabelle Nr. 3: Verwendete Bakterienisolate

Spezies	Typstamm	Referenz
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 53977	a)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-----	a) 30 verschiedene Isolate der Stammsammlung
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	ATCC 25260	a)
<i>Porphyromonas macacae</i>	ATCC 33141	a)
<i>Prevotella nigrescens</i>	ATCC 33563	a)
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611	a)
<i>Prevotella oralis</i>	ATCC 33296	a)
<i>Bacteroides forsythus</i> (neu: <i>T. forsythensis</i>)	ATCC 43037	a)

Spezies	Typstamm	Referenz
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Var. Typ DGM anaerob	a)
<i>Eikenella corrodens</i>	Typ BCM 226	a)
<i>Streptococcus anginosus</i>	ATCC 33397	a)

a) Stammsammlung der Poliklinik für Parodontologie der ZMK-Klinik der Westfälischen Wilhelmsuniversität Münster.

2.2 Nährmedien

Zur Kultivierung von *P. gingivalis*, *P. asaccharolytica*, *P. macacae*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *P. oralis*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* und *Strep. anginosus* wurde Anaerobier-Blutagar nach CDC (Centre of Disease Control) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Zusammensetzung	Gramm pro Liter (g/l)
Caseinpepton	15.0
Pepton aus Sojamehl	5.0
Hefeextrakt	5.0
NaCl	5.0
L-Cystein	0.5
Hemin-Stammlsg.	10.0
Agar-Agar	15.0
Vitamin K1-Stammlsg.	1.0

Die Bestandteile wurden auf ein Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt, darin gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 48°C wurden 50,0 ml/l Schafblut hinzugefügt und der Nährboden in Mengen von etwa 20,0 ml in Petrischalen gegossen.

B. forsythus (neu: *T. forsythensis*) wurde auf N-Acetylmuraminsäureagar (CDC-Agar) und *A. actinomycetemcomitans* auf TSBV (Trypticasesoja, Bacticacin, Vancomycin) angezchtet.

2.3 PCR

Die PCR erlaubt die in vitro-Vermehrung eines spezifischen DNA-Abschnittes aus einem Überschuß anderer Nukleinsäuren heraus. Die Spezifität und das hohe erzielbare Vermehrungsverhältnis von bis zu 1:10⁷ machen die PCR zu einer der wichtigsten Techniken der Molekularbiologie. Um aus einer DNA einen definierten Abschnitt zu vermehren, werden zwei Oligonukleotid-Primer zugesetzt, die komplementär zu den flankierenden Bereichen der Ziel-DNA-Sequenz sind, welche tausende Nukleotide lang sein kann. Das erste Oligonukleotid ist komplementär zu einer Sequenz auf DNA-Strang A, das zweite Oligonukleotid hat eine Sequenz, die komplementär zu einem Abschnitt auf dem Gegenstrang B der DNA ist. Im ersten Schritt der Reaktion lagern sich die Primer an die für sie komplementäre Region der DNA an. Sie dienen als Startstücke für eine hitzestabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase, die nun aus zugesetzten Desoxyribonukleosidtriphosphaten die komplementären Einzelstränge synthetisiert. Man erhält ein doppelsträngiges DNA-Molekül, womit eine Verdopplung des Ausgangsmoleküls erfolgt ist. Durch Erhitzen des Reaktionsgemisches wird der gebildete DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge getrennt, an die sich nach Abkühlung auf die Hybridisierungstemperatur nunmehr beide Primer wieder an die für sie komplementären Stellen anlagern. Jeder der Einzelstränge wird von den

Primern ausgehend durch die DNA-Polymerase erneut zu einem doppelsträngigem DNA-Molekül komplettiert. Das in diesem Schritt entstehende Syntheseprodukt hat erstmals die durch die Position der beiden Primer definierte Länge. Durch weiteres Erhitzen mit anschließender Primeranlagerung (Annealing) erhält man einen DNA-Doppelstrang gleicher Länge. Die ständige Wiederholung dieser Prozedur bewirkt eine exponentielle Vermehrung dieses ausgewählten DNA-Stranges. Das Verfahren ist automatisiert und führt theoretisch nach 30 Zyklen zu einer Amplifizierung um den Faktor 10^9 . Wichtig hierfür war die Entdeckung thermostabiler DNA-Polymerasen von Archaeobakterien, die in Regionen mit vulkanischer Aktivität leben, wie die DNA-Polymerase von *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase), deren Reaktionsoptimum zwischen 70-80°C liegt und die über längere Zeit auf 95°C erhitzt werden kann, ohne stark an Aktivität zu verlieren. Eine anschließende Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung der DNA im elektrischen Feld, was dadurch möglich wird, dass die DNA negativ geladen ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA zu Anode ist abhängig von der DNA-Fragmentlänge: je kleiner ein Fragment, desto weiter seine Laufstrecke. Mit Hilfe eines Standards von DNA-Fragmenten bekannter Größe kann die Länge jedes DNA-Fragments unbekannter Größe mittels einer Eichkurve bestimmt werden. Ein Färbepool dient durch Komplexbildung der Sichtbarmachung der gewanderten DNA-Fragmente, denn die DNA-Ethidiumbromid-Komplexe fluoreszieren unter UV-Licht.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels einer PCR, die als Goldstandard angesehen wird, eine Gegenprobe der beim Spezifitätstest falsch positiv getesteten Isolate sowie der *P. gingivalis*-Isolate durchgeführt, um Verunreinigungen und Fehler auszuschließen.

Hierzu wurde die DNA der betreffenden Isolate (*P. intermedia* Typ ATCC 25611, *P. nigrescenz* Typ ATCC 33563, *P. oralis* Typ ATCC 33269 und *P. gingivalis* Typ ATCC 53977) gemäß den Herstellerangaben des Invisorb Spin Blood Mini Kits isoliert und bei -22°C zwischengelagert. Die Ansatzlösung wurde hergestellt und setzt sich wie folgt zusammen:

Zusammensetzung	Mikroliter (μ l)
Isolierte DNA	3,0
10xPCR-Puffer	2,5
Aqua bidest.	18,0
dNTP	0,5
Primer	0,5
Taq-Polymerase	0,2

Die verwendeten Primer sind unter 2.4 aufgeführt. Die Ansätze wurden in 0,2ml Tubes im PCR-Cycler inkubiert. Je nach Primer gestaltet sich die Programmauswahl. Zuerst wurde zum Zwecke der Denaturierung auf 93°C temperiert und 3 Minuten lang gehalten. Der folgende PCR-Zyklus temperierte 30 Sekunden auf 93°C, 30 Sekunde zwecks Annealing bei 55°C (bei den Primern für *P. intermedia*, *P. nigrescenz*, *P. oralis*) respektive 53°C für *P. gingivalis* und letztendlich für die Elongation 1 Minute auf 72°C. Dabei wurden 34 Zyklen durchlaufen und abschließend noch einmal 3 Minuten lang 72°C gehalten.

Für die Gelelektrophorese wurde eine 10xTBE-Stammlösung (108g Tris, 55g Borsäure, 9,3g EDTA zu 1l steriles Aqua dest.) sowie der Gel-Loading-Puffer (25g Sucrose, 1,85g EDTA, 50mg Bromphenolblau zu 50ml sterilem Aqua dest.) angesetzt. Die Gebrauchslösung des 1 kb-DNA-Leiters setzte sich aus 40 μ l Gel-Loading-Puffer und 20 μ l 1 kb-DNA-Leiter (1 μ g/ μ l, Gibco BRL) zu 200 μ l Aqua bidest. zusammen. Bei einem Auftragsvolumen von 10 μ l der Gebrauchslösung ergab dies 1 μ g 1 kb-DNA-Leiter pro Spur.

Das Agarosegel der Gelelektrophorese wurde aus 250ml 1xTBE-Puffer und 4,5g Agarose gegossen. Je 20 μ l des PCR-Produktes wurden mit 3 μ l Gel-Loading-Puffer vermischt und jeweils in die Gelkammern appliziert. Bei 170V Spannung für 70 Minuten wurde die Elektrophorese durchgeführt und schließlich das Gel für 30 Minuten in ein Färbebad (Ethidiumbromidlösung 1 μ g/ml mit 1xTBE-Puffer) gelegt, um die Elektrophorese auf einem Transilluminator UV-Tisch auswerten zu können.

2.4 DNA-Sonden, Primer und Kits

Im Folgenden werden die speziellen verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt:

Tabelle Nr. 4: Verwendete DNA-Sonden

Sonde	Position (bp), 16S rRNA	Sequenz (markiert mit dem Farbstoff Cy3) (148)	Ref.
<i>P. gingivalis specific</i>	1054-1078	5'-GGT TTT CAC CAT CAG TCA TCT ACA-3'	109
<i>P. gingivalis BG32</i>	827-859	5'-GTG GAA GCT TGA CGG TAT ATC GCA AAC TCC TA-3'	51

Die Sonden wurden in DNA-Puffer gelöst (pH=8.0).

Tabelle Nr. 5: Verwendete Primer

Primer	Sequenz (markiert mit dem Farbstoff Cy3) (148)	Position [bp]	Gen	Ref.
<i>P. gingivalis</i>	Coll 1: 5'-ACA ATC CAC GAG ACC ATC-3'	248	prtC	19
	Coll 2: 5'-GAT TCC CTT GCC TAC ATA-3'	255		
	Der Coll 2-Primer wurde im Vergleich zur Ref. abgewandelt. (Dort: 5' TTC AGC CAC CGA GAC G-3'. Dem Referenzprimer fehlen 2 Basen verglichen mit diversen prtC-Sequenzen!)	285 (Coll 2 der Ref.)		
<i>P. nigrescens</i>	Pn-1: 5'-ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG-3'	804	16S rRNA	9
	Pn-2: 5'-CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A-3'			
<i>P. intermedia</i>	Pi-1: 5'-TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG-3'	575	16S rRNA	9
	Pi-2: 5'-TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T-3'			
<i>P. oralis</i>	Po-1: 5'-GTG CTA ATG AAG AGG GGA AG-3'	1452	gyrB	131
	Po-2: 5'-GAG GGA CTT ACG GCT GTA AT-3'			

Kits:

Invisorb® Spin Blood Mini Kit (Invitex, Berlin) für die DNA-Isolierung

CreaFAST® H. pylori Combi Kit (CREATOGEN AG, Augsburg) für die FISH-Technik

2.5 Versuchsablauf

2.5.1 Vorbereitung der Reagenzien

Es werden 4 μ l des lyophilisierten DNA–Sonden–Mixes und 36 μ l des Hybridisierungspuffers in einem sterilen 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) gemischt. Eine feuchte Kammer (Hygrophor) in Form eines verschließbaren Glasgefäßes (zum Beispiel ein Färbekasten nach Hellendahl) wird vorbereitet, in das ein mit 2ml Hybridisierungspuffer getränktes, gefaltetes Papiertuch eingelegt wird.

5ml des Waschpuffers werden mit 45ml sterilem destilliertem Wasser in einem sterilem 50ml Röhrchen (Sarstedt) verdünnt und auf 60°C vorgewärmt.

2.5.2 Vorbereitung der Isolate

Die zu testenden Kulturen werden in 100 μ l PBS aufgenommen und gut gevortext, 10 μ l 37% Formaldehyd-Lösung werden zugegeben, gevortext und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die nachfolgenden Schritte werden auf Eis durchgeführt. Die Reaktionslösung wird im Reaktionsgefäß 10 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 12000rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird nun in 200 μ l PBS resuspendiert und der vorherige Schritt wiederholt.

Das Pellet wird in 100 μ l PBS resuspendiert, es werden 100 μ l Ethanol zugegeben und gevortext. Die Probe kann so bei –20°C mehrere Monate gelagert werden.

Anschließend werden 5–10 μ l der Probe auf einem Objektträger ausgestrichen und an der Luft getrocknet.

Zum Entwässern wird der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe inkubiert: je drei Minuten in 50%, 80% und 96% Ethanol und anschließend an der Luft getrocknet.

2.5.3 Hybridisierung

Je 10µl der hergestellten DNA–Hybridisierungslösung werden direkt auf die getrockneten Proben auf den Objektträgern pipettiert, ein Deckglas wird aufgelegt und die Luftblasen werden entfernt. Der Objektträger wird in die vorbereitete feuchte Kammer gestellt, diese dicht verschlossen und für 90 Minuten bei 50°C inkubiert.

Das Deckglas wird vorsichtig abgenommen und der Objektträger mit 1–2ml auf 60°C vorgewärmten Waschpuffer abgespült. Der Objektträger wird in das Gefäß mit dem restlichen Waschpuffer (60°C) gestellt und 15 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend muss der Objektträger herausgenommen und vorsichtig mit PBS abgespült werden, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen, dann wird der Träger wiederum an der Luft getrocknet.

Das Mounting-gel wird darüber gegeben (AF1), um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern und schließlich ein Deckglas aufgelegt.

Die Auswertung erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop mit Immersionsöl und Standardfiltern für Grün- und Rot–Fluoreszenz (Spektraleigenschaft der Fluoreszenzfarbstoffe: Cy3: Absorption = 552nm, Emission = 570nm; DAPI: Absorption = 358nm, Emission = 461nm) bei 1250facher Vergrößerung. Cy3 ist ein im Vergleich zu anderen fluoreszierenden Farbstoffen besonders hell leuchtendes Molekül (148).

Eine optionale DAPI-Färbung (4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Lösung) zum Zwecke des Nachweises der Bakterien-DNA ist ebenso möglich. Geeignet ist diese Färbung, um das schnelle Durchmustern von Gewebeschnitten zu erleichtern.

Dazu wird die DAPI-stock-solution mit Aqua bidest. 1:1000 verdünnt und die DAPI-Lösung auf das zu färbende Präparat gegeben (ca.15µl/Probe). Der Objektträger wird unter Lichtausschluß für 5 Minuten inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und luftgetrocknet. Abschließend wird das Präparat mit Mounting Medium bedeckt, um ein Ausbleichen des Präparates zu verhindern. Ein Deckglas wird aufgelegt und das Präparat umgehend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (66). Die DAPI-Färbung wurde an *P.*

gingivalis Typ ATCC 53977, *P. gingivalis* Nr.12, *P. oralis* Typ ATCC 33296, *P. intermedia* Typ ATCC 25611 sowie an *P. nigrescenz* Typ ATCC 33563 durchgeführt.

Eine zusätzliche Färbung zur DNA-Sondenmarkierung am gleichen Präparat (DAPI-Färbung) ermöglicht den direkten mikroskopischen Vergleich zwischen der angefärbten DNA des Präparates mittels eines DAPI-Filters (Dualbandfilter) und der markierten 16S rRNA mittels eines Standardfilters für Cy3. Hierdurch ist zu eruieren, ob das jeweilige Präparat sich unter dem DAPI-Filter als auch unter dem Standardfilter deckungsgleich detektieren lässt (33).

Des Weiteren wurden alle in Tabelle Nr.2 genannten Isolate auf Objektträgern an der Luft getrocknet und auf Eigenfluoreszenz hin unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Mittels PCR-Nachweis wurde außerdem ein Nachweis von *P. intermedia* Typ ATCC 25611, *P. nigrescenz* Typ ATCC 33563, *P. oralis* Typ ATCC 33269, *P. gingivalis* Typ ATCC 53977 und den 30 *P. gingivalis*-Isolaten vorgenommen, womit kontrolliert wurde, dass es sich tatsächlich um die betreffenden Bakterien handelte.

2.6 Geräte und Chemikalien

Schüttler	Vortex Mixer Neolab® 7-2020, Heidelberg
Auftaucherät	Bioblock Scientific®, Illkirch, France
Brutschrank	Heraeus VT 5042 EK/N2®, Hanau
Kühlzentrifuge	Heraeus Biofuge stratos®, Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Wasserbad	GFL® 1083, Burgwedel
Fluoreszenzmikroskop mit Aufsetzkamera	Fluoreszenz-Auflichtkondensor III RS MC63 für Mikroskope und Stereomikroskop DRC, Zeiss, Oberkochen
Tischinkubator	Julabo GmbH MWB, Seelbach
Tischzentrifuge	Heraeus Sepatech Biofuge 13, Hanau
Thermocycler	Mastercycler gradiert, Eppendorf, Hamburg
Agarosegelelektrophorese-Einheit	Bio-Rad SUB-CELL®GT Bio-Rad Power Pac 300, München
Transilluminator UV-Tisch	Bachofer, Reutlingen

Chemikalien:

BET 42a: 5'-GCCTTCCCCTTCGTTT-3' , lyophilisiert
 AF1 Mounting Medium, CITIFLUOR, London, UK
 DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindol), Sigma, Deisenhofen
 Filme: 1. Kodak Elite CHROME 400
 2. FUJIFILM FUJICHROME Provia 400F bei 800 ASA
 PCR-Puffer, 30pmol/μl, MWG, Ebersberg
 Taq-Polymerase, 5U/μl, Eppendorf, Hamburg

dNTP, 10mM/Nukleotid, Invitek, Berlin

Tris, Borsäure, EDTA, Sucrose, Bromphenolblau: Sigma,
Deisenhofen

Seakem LE Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf

DNA-Puffer:

1mM EDTA pH 8.0

0,01M Tris/HCl pH 8.0

Autoklavierung

Hybridisationspuffer:

0,9M NaCl

0,2M Tris/HCl pH 8.0

0,01% SDS (Sodium dodecyl sulfate)

30% Formamid

Autoklavierung

Waschpuffer

(10fach konz.):

5M NaCl

0,5M EDTA

1M Tris/HCl

20% SDS

Autoklavierung

TBE-Laufpuffer

(10fach konz.):

108,0g Tris

55,0g Borsäure

9,3g EDTA

ad 1000ml Aqua dest.

Autoklavierung

Als Gebrauchslösung wird TBE 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

PCR-Puffer: 10fach konz. Taq Buffer mit 15mM Mg²⁺
(Eppendorf, Hamburg)

Agarosegel: SeaKem® LE agarose (Biozym, Hessisch
Oldendorf)

Färbebad: 1,0µg/ml EtBr in Aqua dest.
davon 50 Mikroliter auf 500ml Aqua dest.

3. Ergebnisse

3.1 Positivprobe mit *Porphyromonas gingivalis*-Isolaten

Um nachzuweisen, dass mit den zusammengestellten Kit-Komponenten grundsätzlich die Detektion von *P. gingivalis*-Kulturen möglich ist, wurde versucht, dreißig *P. gingivalis*-Isolate der Stammsammlung sowie zusätzlich *P. gingivalis* Typ ATCC 53977 zu detektieren. Dieses gelang zum einen mit der DNA-Sonde „*Porphyromonas gingivalis specific*“ als auch mit der zweiten Sonde „*Porphyromonas gingivalis BG32*“ ausnahmslos (s. Tabelle Nr. 6). Beide Sonden waren mit dem Farbstoff Cy3 etikettiert. Dieses Ergebnis ergibt für beide Sonden eine Sensitivität von 100%. Wie aus Tabelle Nr. 7 hervorgeht, wurde gegen zehn verwandte respektive nicht verwandte Spezies getestet, dabei waren bei beiden Sonden jeweils zwei falsch positiv getestete Proben dabei, woraus eine Spezifität von jeweils 80% resultiert (s. Tabelle Nr. 8).

Tabelle Nr. 6: Ergebnisse der Detektion von *P. gingivalis*-Isolaten anhand von zwei unterschiedlichen DNA-Sonden

	DNA-Sonde „ <i>P. gingivalis specific</i> “	DNA-Sonde „ <i>P. gingivalis BG32</i> “
<i>P. gingivalis</i>-Isolat		
<i>Porphyromonas gingivalis</i> Typ ATCC 53977	positiv	positiv
<i>Porphyromonas gingivalis</i> Isolate Nr. 1-30	positiv	positiv

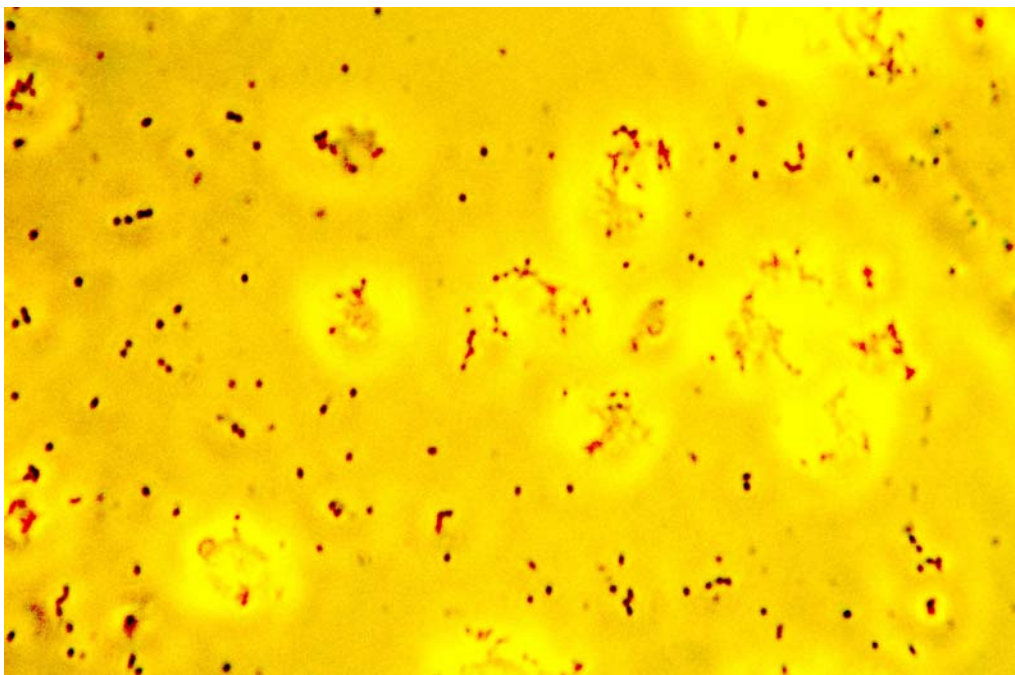


Abb. 4: *P. gingivalis*-Isolat Nr.1 (Phasenkontrast, 1250-fach)

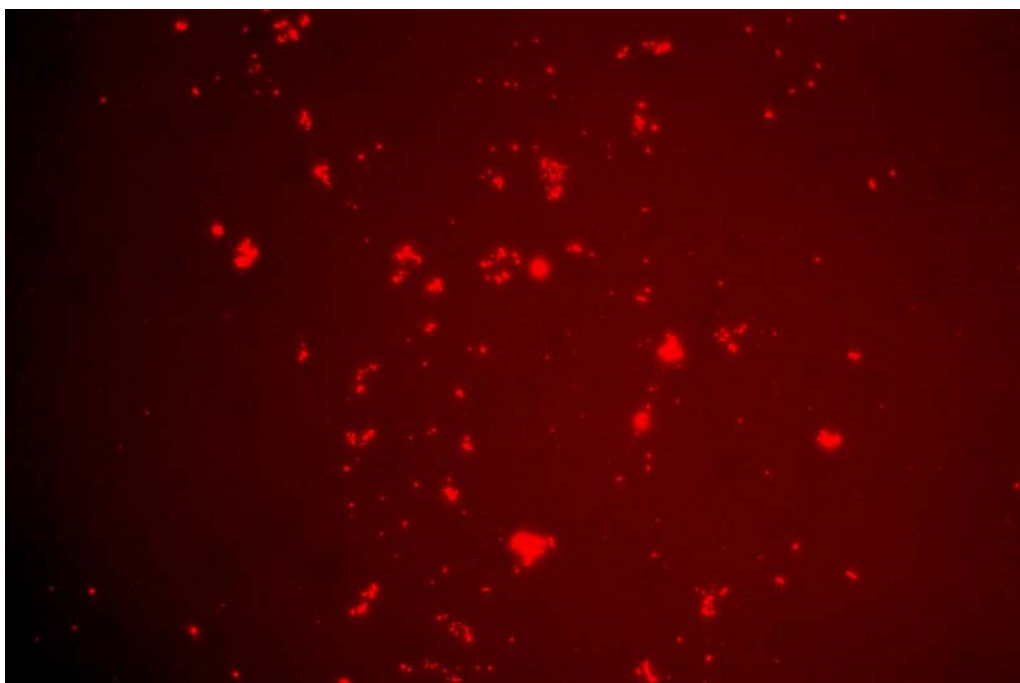


Abb. 5: *P. gingivalis*-Isolat Nr.12 detektiert mit der DNA-Sonde Bg 32 (etikettiert mit Cy3, 1250-fach)

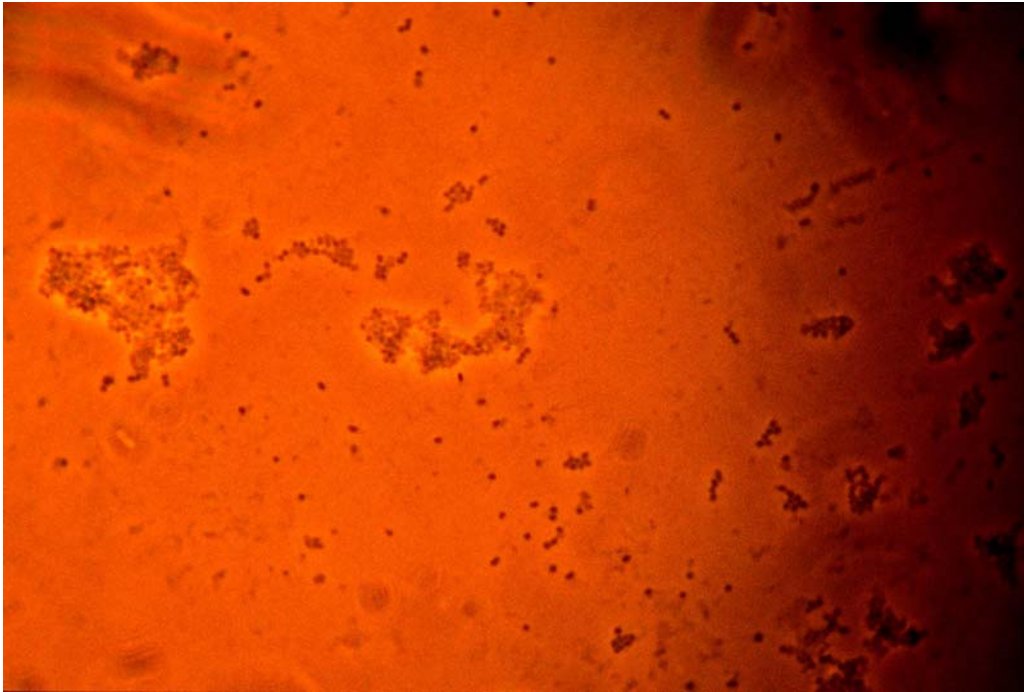


Abb. 6: *P. gingivalis*-Isolat Nr.6 (Phasenkontrast, 1250-fach)

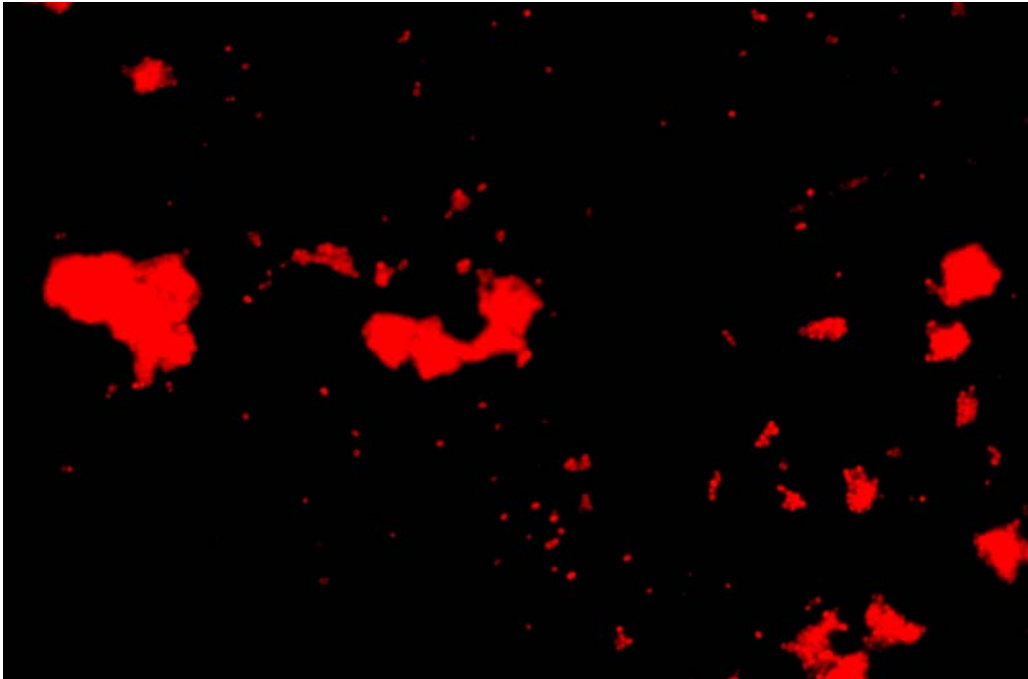


Abb. 7: *P. gingivalis*-Isolat Nr.6 detektiert mit der DNA-Sonde Bg 32 (etikettiert mit Cy3, 1250-fach). Zu beachten ist die Deckungsgleichheit im Vergleich zu Abb. 3, die lichtmikroskopisch visuell zu 100% gegeben war.

3.2 Nachweis der Spezifität der verwendeten DNA-Sonden anhand von Negativproben

Wie aus der folgenden Tabelle Nr. 7 hervorgeht, konnte bei den verwendeten beiden DNA-Sonden mittels des Einsatzes von weiteren Bakterienisolaten nachgewiesen werden, dass beide Sonden nicht rein spezifisch für *P. gingivalis* sind:

Tabelle Nr. 7: Ergebnisse der Spezifitätsnachweise der untersuchten DNA-Sonden

	DNA-Sonde „ <i>P. gingivalis specific</i> “	DNA-Sonde „ <i>P. gingivalis BG32</i> “
Verwandte Spezies der gleichen Gattung		
<i>Porphyromonas</i>		
<i>asaccharolytica</i> Typ ATCC 25260	negativ	negativ
<i>Porphyromonas macacae</i> Typ ATCC 33141		
Verwandte Spezies einer anderen Gattung		
<i>Tannerella forsythensis</i> Typ ATCC 43037 (<i>Bacteroides forsythus</i>)		
<i>Fusobacterium</i> <i>nucleatum</i> var. Typ DGM <i>anaerob</i>	negativ	negativ

	DNA-Sonde „ <i>P. gingivalis specific</i> “	DNA-Sonde „ <i>P. gingivalis BG32</i> “
Verwandte Spezies einer anderen Gattung		
<i>Prevotella nigrescens</i> Typ ATCC 33563	negativ	positiv
<i>Prevotella intermedia</i> Typ ATCC 25611	positiv	negativ
<i>Prevotella oralis</i> Typ ATCC 33269	positiv	positiv
Nicht verwandte Spezies		
<i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i> Typ ATCC 33384	negativ	negativ
<i>Eikenella corrodens</i> Typ BCM 226	negativ	negativ
<i>Streptococcus anginosus</i> Typ ATCC 33397	negativ	negativ

Die in Tabelle Nr. 8 gezeigte Vierfeldertafel der Sensitivität und Spezifität steht in ihren Werten gemeinsam für beide getesteten DNA-Sonden:

Tabelle Nr. 8: Sensitivität und Spezifität

Detektion von <i>P. gingivalis</i> mittels FISH	Detektion mittels PCR (Goldstandard)		Gesamt
	<i>P. gingivalis</i> -positiv	<i>P. gingivalis</i> -negativ	
Positiv	31 (Wahr positiv) a	2 (Falsch positiv) b	33 (a+b)
Negativ	0 (Falsch negativ) c	8 (Wahr negativ) d	8 (c+d)
Gesamt	31	10	N=41

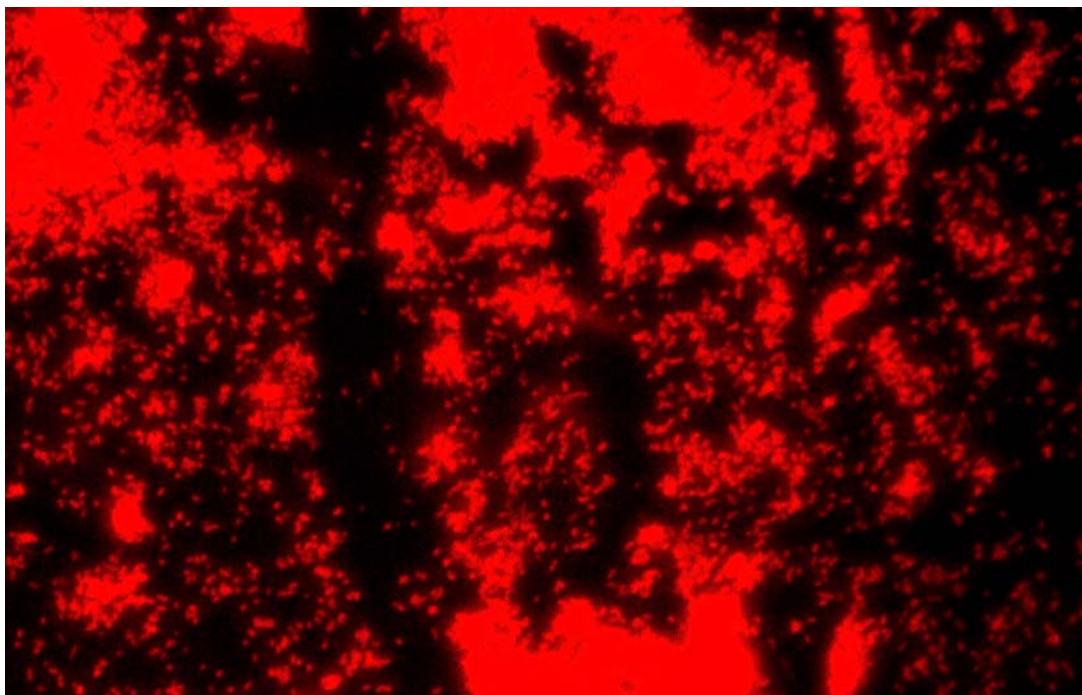


Abb. 8: *P. oralis*-Isolat Typ ATCC 33296 detektiert mit der DNA-Sonde „Porphyromonas gingivalis specific“ (etikettiert mit Cy3, 1250-fach)

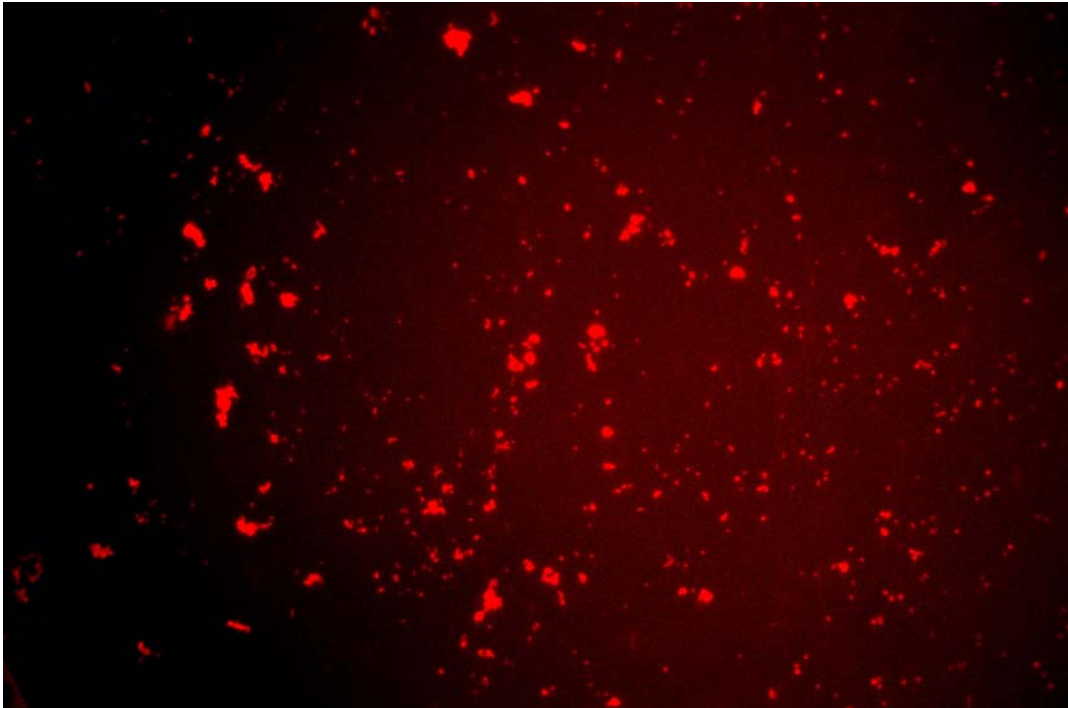


Abb. 9: *P. nigrescens*-Isolat Typ ATCC 33563 detektiert mit der DNA-Sonde Bg 32 (etikettiert mit Cy3, 1250-fach)

3.3 Untersuchung auf Eigenfluoreszenz

Alle verwendeten Isolate wurden auf Eigenfluoreszenz hin überprüft und die Ergebnisse in Tabelle Nr. 9 aufgeführt. Schwach positive Eigenfluoreszenz meint ein sichtbares, aber deutlich schwächeres Leuchten verglichen mit der FISH-Technik.

Tabelle Nr. 9: Untersuchung der verwendeten Isolate auf Eigenfluoreszenz

	Eigenfluoreszenz
Getestete Bakterienisolate	
<i>30 Porphyromonas gingivalis</i> -Isolate der Stammsammlung	negativ (-)
<i>Porphyromonas gingivalis</i> Typ ATCC 53977	negativ (-)
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> Typ ATCC 25260	schwach positiv (+)
<i>Porphyromonas macacae</i> Typ ATCC 33141	negativ (-)
<i>Tannerella forsythensis</i> Typ ATCC 43037 (<i>Bacteroides forsythus</i>)	negativ (-)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> var. Typ DGM anaerob	schwach positiv (+)
<i>Prevotella nigrescens</i> Typ ATCC 33563	schwach positiv (+)
<i>Prevotella intermedia</i> Typ ATCC 25611	schwach positiv (+)
<i>Prevotella oralis</i> Typ ATCC 33269	schwach positiv (+)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> Typ ATCC 33384	negativ (-)
<i>Eikenella corrodens</i> Typ BCM 226	negativ (-)
<i>Streptococcus anginosus</i> Typ ATCC 33397	negativ (-)

(++) = stark positiv, d.h. die Leuchtintensität der Eigenfluoreszenz entspricht der von den DNA-Sonden

(+) = schwach positiv, d.h. die Leuchtintensität der Eigenfluoreszenz ist sehr deutlich schwächer als die der DNA-Sonden

(-) = negativ, d.h. Eigenfluoreszenz ist visuell nicht erkennbar

3.4 Optionale DAPI-Färbung

Diese zusätzliche Färbung neben der DNA-Sondenetikettierung am gleichen Präparat ermöglicht den direkten mikroskopischen Vergleich zwischen der angefärbten DNA des Präparates unter zur Hilfenahme eines DAPI-Filters (Dualbandfilter) und der etikettierten 16S rRNA mittels eines Standardfilters für Cy3. Dieser direkte Vergleich zeigt auf, ob alle vorhandenen Zielbakterien auch tatsächlich von der DNA-Sonde markiert wurden. Visuell zu erkennen war, dass das jeweilige Präparat sich unter dem DAPI-Filter als auch unter dem Standardfilter als deckungsgleich detektiert erwies, was in Tabelle Nr.10 aufgeführt ist :

Tabelle Nr. 10: Ergebnisse des Vergleiches zwischen einer DAPI-Färbung und der DNA-Sondenmarkierung

Deckungsgleichheit zwischen DAPI- und DNA-Sondenetikettierung	
Verglichene Bakterienisolate	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> Typ ATCC 53977	positiv
<i>Porphyromonas gingivalis</i> -Isolat Nr.12	positiv
<i>Prevotella oralis</i> Typ ATCC 33269	positiv
<i>Prevotella nigrescenz</i> Typ ATCC 33563	positiv
<i>Prevotella intermedia</i> Typ ATCC 25611	positiv

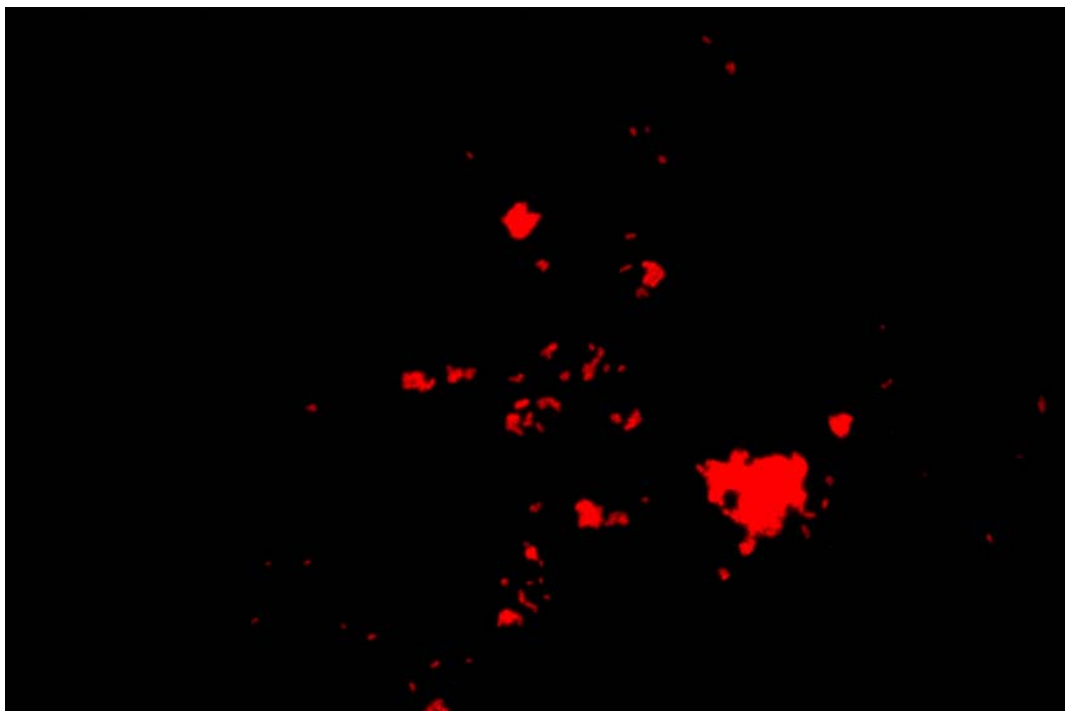
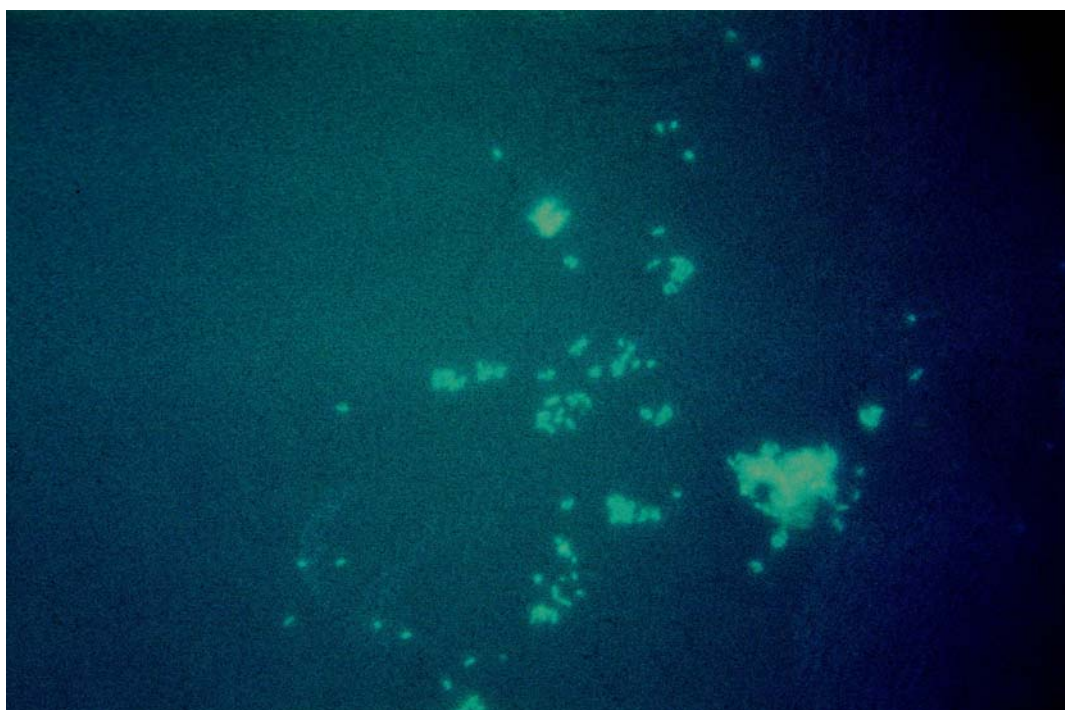


Abb. 10: *P. nigrescens*-Isolat Typ ATCC 33563 detektiert mit der DNA-Sonde Bg 32 (etikettiert mit Cy3, 1250-fach)



Vorherige Abb. 11: Gleiches Präparat (*P. nigrescens*-Isolat Typ ATCC 33563) wie Abb. 10, detektiert mit der DNA-Sonde Bg 32 (etikettiert mit Cy3) nach zusätzlicher DAPI-Färbung unter einem DAPI-Filter (1250-fach)

3.5 PCR-Nachweis verwandter Spezies einer anderen Gattung

Explizit wurden die verwandten Spezies einer anderen Gattung zusätzlich zur mikroskopischen Kontrolle nochmals anhand einer PCR überprüft, da sie bei den Spezifitätstests der DNA-Sonden positiv getestet wurden. Sie sind in Tabelle Nr. 11 nebst den verwendeten *P. gingivalis*-Isolaten aufgeführt:

Tabelle Nr. 11: PCR-Nachweis verwandter Spezies einer anderen Gattung

	PCR-Nachweis
Isolate	
<i>Prevotella intermedia</i> Typ ATCC 25611	positiv
<i>Prevotella nigrescenz</i> Typ ATCC 33563	positiv
<i>Prevotella oralis</i> Typ ATCC 33269	positiv
<i>Porphyromonas gingivalis</i> Typ ATCC 53977	positiv
Dreißig <i>Porphyromonas gingivalis</i> - Isolate	positiv

4. Diskussion

Damit im Rahmen der Parodontitistherapie bei entsprechender Indikation Antibiotika gegen parodontopathogene Bakterien zum Einsatz gebracht werden können, möchte man herausfinden, mit welchen Spezies die Parodontien befallen sind, da die Zusammensetzung der Keime zwischen den Patienten sehr variabel sein kann. Bei der FISH-Technik handelt es sich prinzipiell um eine Methode, welche die Zusammensetzung von verschiedenen möglichen Bakterien analysiert. Mit dem Ziel *P. gingivalis* nachzuweisen, wurde diese Technik mittels zweier Cy-3-markierter Oligonukleotidsonden hinsichtlich ihrer Praktikabilität, Sensitivität und Spezifität überprüft und mit der PCR als Goldstandard verglichen. Bei beiden Sonden ergab sich eine Sensitivität von 100% bei einer Spezifität von lediglich 80%, einhergehend mit einer relativ einfachen Handhabung der Testdurchführung.

Alternativ zur FISH-Technik sind zwar auch mit der PCR oder mit Sequenzierungsmethoden die sensitive Detektion als auch die exakte Identifizierung von Bakterien möglich, jedoch bieten solche Methoden keine Informationen über die Morphologie, die Anzahl, die Raumverteilung oder die zelluläre Umwelt der Organismen (91). Auch mikroskopische Analysen, die mit Anfärbungen wie die Gram- oder die Ziehl-Nielsenfärbung arbeiten, sind sehr brauchbare Techniken. Sie sind schnell, kostengünstig und kombinieren direktes Visualisieren und grobe Charakterisierung der Bakterien unter Verwendung von strukturellen Informationen der Zellwand, jedoch ist eine verlässliche Identifikation nicht möglich. Auch die Anwendung von der Immunofluoreszenztechnik mittels speziesspezifischen Antikörpern ist mit Problemen behaftet, wie beispielsweise das unspezifische Binden oder dem Umstand, dass die Größe der Antikörper den Zugang zum Zielantigen in Geweben oder Biofilmen begrenzt. Ein weiteres Problem bei letztgenannter Technik sind Kreuzreaktivitäten bei der Untersuchung mikrobieller Komplexe. Darüber hinaus ist diese Methode nicht vollständig kulturunabhängig.

Im Gegensatz dazu kombiniert die FISH-Technik die Präzision der molekularen Genetik mit der visuellen Information der Mikroskopie, sie gestattet die

Identifizierung und Visualisierung individueller Bakterien innerhalb ihres natürlichen Habitats oder erkrankten Gewebes. Zusätzliche Informationen über die Stoffwechselaktivität respektive den funktionellen Status, die Genexpression oder die Antigenexpression sind weitere Vorteile.

Nachteile entstehen andererseits durch die sich auch in der vorliegenden Arbeit bestätigende Möglichkeit von falsch positiven Ergebnissen. Ein weiteres Hauptproblem liegt in der Autofluoreszenz von Mikroorganismen. Dies wurde zum Beispiel von *Candida albicans* (91) oder von Spezies des Genus *Pseudomonas* (49) berichtet. Autofluoreszenz in einer Probe kann aber zum anderen auch aus der Umwelt eines betreffenden Mikroorganismus heraus entstehen, wobei dieses zum Beispiel das Trinkwasser sein kann oder es kann auch die Autofluoreszenz aus Biopsiegeweben entstammen, welche Elastin, Kollagen oder Blutzellen wie eosinophile Granulozyten und Erythrozyten enthalten (141, 88). Letzteres kann gerade bei der Verwendung von subgingivalen Plaqueproben zu Fehlern führen. Prinzipiell soll jedoch hier, wie zumindest aus immunologischen und zytologischen Untersuchungen hervorgeht, die Möglichkeit bestehen, die Autofluoreszenz erfolgreich mittels digitalem bildgebendem Verfahren Pixel für Pixel zu subtrahieren (132, 141). Weiterhin sind Schmalbandfiltersets und Signalverstärkersysteme empfohlen worden. Andere Zusätze, welche die Spezifität der Sonden erhöhen oder die Fixierung verbessern sollen, haben erheblichen Einfluss auf die Signalintensität (55, 112). Dieses ließ sich durch die Verwendung der Universalsonde BET42a (Beta-Subklasse der Proteobakterien) in der vorliegenden Arbeit bestätigen, denn sie führte zum einen zu keinerlei Vorteil, zum anderen führte jede weitere Erhöhung der zugegebenen BET42a-Menge zu einem Abfall der Signalintensität. Auch ist bei *C. albicans* beobachtet worden, dass es zu stärkeren Schwankungen der Autofluoreszenz innerhalb ein und derselben Art kommen kann (55), weshalb die Interpretationen von Autofluoreszenzsignalen mit Vorsicht zu betrachten sind. Nichtsdestotrotz soll die spezifische Detektion von *C. albicans* auch in schwierigem Milieu möglich sein (75, 76). Es ist jedoch bei Proben mit unbekanntem Bakterienkonglomeraten möglich, dass man bevor

die FISH-Technik angewandt werden soll mit den zu untersuchenden Proben einen Autofluoreszenztest macht.

Überdies kann es bei der FISH-Technik nicht ausgeschlossen werden, dass es zu Bindungen mit genomisch unbekanntem Mikroorganismen kommt, vor allem wenn komplex gemischte Bakterienpopulationen analysiert werden. Alternativ spricht auch nichts dagegen, sicherheitshalber immer gleichzeitig zwei an verschiedenen Stellen der anvisierten 16S rRNA bindende DNA-Sonden zu verwenden (92). Wobei sich diese Methode jedoch wiederum durch das bestehende begrenzte Angebot an spezifischen Zielsequenzen selbst limitiert.

Berücksichtigung finden sollte auch die Möglichkeit, falsch negative Ergebnisse zu erhalten. Möglich ist zum einen eine geringe Signalintensität, wenn die Sonde nur ungenügend in die Bakterienzelle penetriert. Dieses steht vor allem in Abhängigkeit zu der Struktur der Zellwand. Hier allerdings stellen zumindest die gramnegativen Bakterien aufgrund ihrer dünneren Mureinschicht gewöhnlich kein Problem für DNA-Sonden dar, wobei trotz allem anzunehmen ist, dass je kürzer die Sonde ist, desto besser diese auch die Zellwand penetrieren sollte (91).

Eine andere Problematik könnte entstehen, wenn es im Bereich der Zielsequenz zu Schleifen oder Haarnadelformationen oder zu rRNA-Protein-Interaktionen kommt, das heißt, die dreidimensionale rRNA-Struktur eine an sich mögliche Hybridisierung behindert.

Eine weitere Ursache für eine abgeschwächte Anfärbbarkeit könnte sich in einem reduzierten rRNA-Gehalt begründen. Der rRNA-Gehalt variiert nicht nur zwischen den verschiedenen Spezies, sondern auch zwischen den Bakterien der gleichen Art, denn dieser spiegelt den metabolischen Status, welcher wiederum mit der Wachstumsrate korreliert, wieder (4, 36, 146, 104). Demzufolge kann die Signalintensität um so geringer ausfallen, je niedriger die metabolische Aktivität der Zelle ist. Je langsamer eine Spezies wächst, um so eher ist auf einen intensiv leuchtenden Marker wie Cy3 zurückzugreifen (4).

Des Weiteren muss das Problem des Fadings beachtet werden, worunter das Phänomen zu verstehen ist, dass je länger Fluorochrome unter Excitation gehalten werden, diese umso stärker einer Destruktion unterliegen. Darum ist

es empfehlenswert, Schmalbandfiltersets, photostabilere Cyaninmarker und ein Antifading-Mountingmedium zu verwenden.

Auch ist zu beachten, dass es infolge mangelnder Spezifität der Sonde zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Schon 1986 wurde die geringe Spezifität von einzelnen *Bacteroides*-DNA-Sonden beschrieben (72). Für *B. fragilis* verwendete man acht Sonden, welche alle als spezifisch bezeichnet wurden. Eine Sonde für *B. eggerthii* kreuzreagierte jedoch mit allen anderen verwendeten *B. fragilis*-Isolaten. Eine Weitere für *B. ovatus* kreuzreagierte nicht nur mit allen verwendeten *Bacteroides sp.*-Isolaten, darunter auch *B. oralis* Typ ATCC 33269, sondern obendrein auch noch mit *F. nucleatum* Typ ATCC 25586 und *F. necrophorum*.

Ab 1987 wurde mit „Ganz-Genom-DNA-Sonden“ gearbeitet (128). Diese Sonden haben ein Detektionslimit von 10^3 Bakterien. Es wurden hierbei nur sehr niedrige Niveaus an Kreuzreaktivität zwischen der *B. intermedius*-Sonde und repräsentativen schwarzpigmentierten *Bacteroides*keimen beobachtet, wobei dieses niedrige Niveau nicht mit der akkuraten Identifizierung von *B. intermedius* interferierte. Ganz-Genom-DNA-Sonden sollen sich für die Identifikation von *B. intermedius* und *B. gingivalis* in Plaqueproben von Patienten als nützlich erweisen. Diese Sonden haben sich jedoch im Gegensatz zur Meinung dieser Arbeitsgruppe nicht behaupten können.

Eine weitere Arbeitsgruppe schilderte 1990 bei einzelnen Sonden Kreuzreaktivitäten (87). Die sechs gegen *B. gingivalis* getesteten Sonden ergaben eine Sensitivität von 100%, jedoch zwei der Sonden waren nicht zu 100% spezifisch. Die Sonde „Bg6“ hybridisierte mit *B. asaccharolyticus* und die Sonde „Bg7“ mit *B. endodontalis*, *B. bivius* und *B. disiens*. Das ergab eine Spezifität von 85% für „Bg7“ und von 93% für „Bg6“. Die anderen vier getesteten Sonden waren zu 100% spezifisch. Hier wurde jedoch ausschließlich gegen *Bacteroides* der damaligen Taxonomie getestet, wobei sich die hohen Spezifitätswerte im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit daraus ergeben, dass bei der oben genannte Arbeitsgruppe 1990 rein quantitativ gegen eine größere Anzahl *Bacteroides*isolate getestet wurde, was bei wenigen falsch positiven

Fällen und vielen wahr positiven Fällen zu einer prozentualen Verbesserung der Spezifität führte.

2002 versuchte ein Forscherteam mit 16S rRNA-Sonden *P. intermedia* und *P. nigrescens*, *Prevotella pallens* und *Prevotella denticola* spezifisch nachzuweisen. Die meisten Sonden waren zu 100% spezifisch. Eine jedoch, gegen *P. intermedia* gerichtet, kreuzreagierte mit *P. pallens* (54).

Eine weitere Arbeitsgruppe arbeitete 1990 mit insgesamt acht weiteren Sonden (Bg-1 bis Bg-8) für *P. gingivalis*. Sie kam wiederum zu dem Ergebnis, dass diese spezifisch seien (38). Hieraus folgernd liegt die Hauptursache für die verschieden erfolgreichen Ergebnisse der vorgenannten Arbeitsgruppen anscheinend in erster Linie an den unterschiedliche Zielsequenzen der ausgewählten Sonden. Dieses zum Anlass nehmend sei an dieser Stelle betont, dass das Ergebnis der hier in vorliegender Arbeit verwendeten zwei Sonden natürlich nicht repräsentativ für alle weiteren *P. gingivalis*-DNA-Sonden genommen werden kann.

2003 wurde die FISH-Technik in Bezug auf Sensitivität und Spezifität für subgingivale Plaquebakterien mit dem kulturellem Nachweis verglichen, da ein großes Interesse an der Entwicklung einer schnelleren und kostengünstigeren Methode zur Identifizierung von bakteriellen Plaquepathogenen entstand. Diesen Ergebnissen zufolge sei tatsächlich die DNA-Sondentechnologie verglichen mit kulturellen Methoden eine schnellere und kosteneffektivere Methode (139).

Verglichen mit der Kulturmethode als Goldstandard ergibt sich für die in vorher erwähnten Untersuchung verwendete Sonde für die *P. gingivalis*-Detektion eine Sensitivität und Spezifität (in %) von $52,2 \pm 8,75$ und $74,7 \pm 5,9$. Die Menge an Probenentnahmestellen mit nachgewiesenen Parodontalpathogenen ist etwas höher als bei der Kulturmethode (36,8% zu 30,8%). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die DNA-Sondentechnik vitale als auch avitale spezifische Bakterien nachweist, während die klassische Kulturmethode nur vitale Mikroorganismen nachweisen kann. Des Weiteren können Kulturmethode die tatsächlichen Zellzahlpopulationen nicht akkurat reflektieren, da viele der Bakterien aufgrund ihrer anspruchsvollen Wachstumscharakteristika und der

ungünstigen Umweltbedingungen in vitro nicht überleben. Eine mögliche Erklärung für die niedrige Sensitivität könnte sein, dass *P. gingivalis* an den entsprechenden Probenentnahmestellen nicht die Nachweisschwelle von 10^5 Bakterienzellen erreicht hat, während die Bakterienzahl wiederum für die Kulturmethode ausgereicht hat. Das Detektionslimit lag bei der Sonde bei 5×10^5 Bakterien, relativ hoch verglichen mit den Literaturangaben für die Kulturnachweisschwelle von 10^3 Bakterien (139). Wenn ein Test extrem sensitiv ist, kann es zu positiven Resultaten an klinisch gesunden Stellen kommen. Die PCR zum Beispiel ist in der Lage, in einer Probe nur ein bis zwei Bakterien nachzuweisen, aber eine Assoziation mancher Mikroorganismen mit Parodontitis ist erst ab einer bestimmten Quantität zu erwarten (139). Diese Schwellen seien wiederum nicht genau bekannt (139). Ebenso wird dort berichtet, dass die Zellzahlen unbehandelter parodontaler Taschen (Sondertiefen > 6mm) bei $3,7 \times 10^6$ respektive bei $7,3 \times 10^6$ (139) für *P. gingivalis* liegen. Demzufolge scheint für *P. gingivalis* die Kultivierung die sensitivere Methode zu sein (139).

1996 kam ein weiteres Team ebenfalls zu einem negativen Ergebnis. Eine höhere Detektionshäufigkeit für *P. gingivalis* und eine Niedrigere für *P. intermedia* wurde auf Seiten der Sondentechnik gegenüber konventioneller Kultivierung festgestellt. Jedoch wurden 40% der *P. gingivalis*-Typstämme überhaupt nicht detektiert. Folglich ist der Wert der DNA-Sonden-Methode zwecks Nachweis von Parodontalpathogenen fraglich (144).

Ein Ergebnis einer anderen Gruppe von 1992 wird kontrovers diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass für *P. gingivalis* DNA-Sonden und immunologische Methoden (immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay) dem kulturellen Nachweis signifikant überlegen sind ($P < 0,05$) beziehungsweise der mikroskopischen Detektion vergleichbar sind (77). DNA-Sonden als Goldstandard verglichen mit dem kulturellem Nachweis ergaben eine Sensitivität von 47,0% bei einer Spezifität von 74,3%. Gegenüber der Kultur als Goldstandard ergaben DNA-Sonden jedoch eine Sensitivität von 89,7% bei einer Spezifität von 22,8% (77). Bemerkenswert ist auch, dass bei der verwandten Spezies *B. forsythus* (*T. forsythensis*) eine Vergleichsstudie zu

maximalen Sensitivitäts- und Spezifitätsergebnissen kommt. Verglichen mit der Kultivierungsmethode konnten mit DNA-Sonden für *B. forsythus* 100%ige Spezifitäts- und Sensitivitätsergebnisse erzielt werden (87).

Auch sind Vorteile ökonomischer Art zu berücksichtigen. Eine Untersuchung ergab eine 100%ige Sensitivität für die DNA-Sonden im Rahmen des Tuberkulosescreenings. Verglichen mit der konventionellen Kulturmethode konnte die durchschnittliche Zeit bis zur korrekten Diagnose um 84% reduziert werden. Ebenso verringerten sich bei diesem Vergleich die Kosten um 18% (65). Der Zeitvorteil wird sich auch bei der Parodontitisdiagnostik in dieser Größenordnung bewegen, doch ob man bei dieser Erkrankungsgruppe um jeden Tag früheren Therapiebeginn feilschen muss, sei hier offen gelassen.

Vergleicht man einmal die FISH-Technik mit der PCR, so ist zu konstatieren, dass es sich bei einer real-time quantitativen PCR um eine sehr sensitive und zuverlässige Methode zur Quantifizierung von *P. gingivalis* handelt. Hinzu kommt, dass sie die Bestimmung der gesamten Bakterienzahl in einer komplexen Probe ermöglicht, so dass der Anteil an *P. gingivalis* prozentual festgestellt werden kann (79).

Verschiedene Teams konnten keinerlei Schwächen bezüglich der Spezifität bei der PCR finden (9, 137, 138, 40). Es wurden keine Kreuzreaktivitäten bei 16S rRNA-basierender PCR-Detektion gefunden (9). Gemessen an der PCR als Goldstandard konnten die in vorliegender Arbeit verwendeten Sonden diesem Anspruch nicht gerecht werden, da mit 80% eine deutlich geringere Spezifität erreicht wurde. Vergleicht man jedoch die Sensitivität beider Methoden miteinander, stehen 72,8% (9) bei der PCR gegen 100% bei der FISH-Technik. Eine 100%ige Sensitivität bei reduzierter Spezifität würde im falsch positivem Fall schlimmstenfalls zu einer Übertherapie eines nicht an dem gesuchten Keim Erkrankten führen. Eine Übertherapie ist, zumindest bei dem Erkrankungsbild der Parodontitis, sicherlich in den meisten Fällen einer Untertherapie durch Nichterkennen des Zielkeims vorzuziehen. Die Gefahr der Unterdiagnostizierung ist bei der PCR, bedingt durch die schwächere Sensitivität, folglich größer als bei der FISH-Technik.

Die Praktikabilität ist bei der FISH-Technik einfacher, schneller und weniger materialintensiv als bei der PCR, vorausgesetzt, es handelt sich nur um kleine Mengen von zu untersuchenden Proben. Bei größeren Probenmengen schmilzt der Zeitvorteil bedingt durch die visuelle mikroskopische Auswertung, verglichen mit der gelelektrophoretischen Auswertung bei der PCR, zusehends.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die FISH-Technik zumindest bei kleinem Probenaufkommen aufgrund ihrer hohen Sensitivität durchaus als Alternative zur etablierten PCR darstellt. Eine solche Aussage steht und fällt sicherlich mit der Auswahl der Sonde respektive der Zielsequenz und muss für jede neue Sonde neu untersucht werden. Die aufgetretenen Schwächen bezüglich der Spezifität lassen sich wahrscheinlich durch eine andere Sondenauswahl umgehen oder sind zumindest bei der Antibiotikaauswahl von geringer Relevanz. Eine weitere Bedingung ist, dass es für alle therapierelevanten parodontopathogenen Bakterien auch geeignete Sonden respektive Untersuchungen zu diesen gibt, was zur Zeit noch aussteht.

5. Zusammenfassung

Von den über 500 subgingival nachgewiesenen Mikroorganismen stehen nur wenige eng mit der Parodontitis in Verbindung. Zu diesen wird *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) gezählt. In der Therapie ist für die Auswahl eines adjuvanten Antibiotikums die Detektion dieser Spezies von besonderer Bedeutung. Die bisher in der Routinediagnostik zum Einsatz kommenden molekularbiologischen Verfahren sind zeitaufwendig und gestatten keine Quantifizierung. Diese Probleme können mit der Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH-Technik) bei hoher Sensitivität und Spezifität umgangen werden. Hierbei werden mit einem fluoreszierendem Farbstoff markierte DNA-Sonden benutzt, um an spezifische komplementäre Sequenzen der 16S rRNA zu binden um anschließend mittels eines Fluoreszenzmikroskops qualitativ und quantitativ analysiert zu werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der spezifische Nachweis von *P. g.* mit Hilfe dieser Technik möglich sei. Hierzu wurden bereits beschriebene *P. g.*-spezifische Sonden gegen 40 Bakterienisolate getestet. Bei den beiden Sonden handelte es sich um „*P. g. specific*“: GGTTTTCCACCATCAGTCATCTACA und um „*P. g. BG32*“: GTGGAAGCTTGACGGTATATCGCAAACCTCCTA. Die Sonde „*P. g. specific*“ kreuzreagierte mit *Prevotella intermedia* Typ ATCC 25611 und *Prevotella oralis* Typ ATCC 33269, die Sonde „*P. g. BG32*“ kreuzreagierte ihrerseits mit *Prevotella nigrescens* Typ ATCC 33563 und ebenso mit *P. oralis* Typ ATCC 33269. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass beide Sonden eine Sensitivität von 100% bei einer Spezifität beider Sonden von 80% aufweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die FISH-Technik im Vergleich zur PCR eine vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von *P. g.* aufweist. Die untersuchten Sonden erscheinen aber aufgrund der Kreuzreaktionen mit einigen *Prevotellaspezies* als für die Routinediagnostik nicht geeignet.

6. Literaturverzeichnis

1. Albandar, J.M., L.J. Brown, H. Loe. 1997. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J. Periodontol.* 68: 973-981.
2. Albandar, J.M., A. Kingman. 1999. Gingival Recession, Gingival Bleeding, and Dental Calculus in Adults 30 Years of Age and Older in the United States, 1988-1994. *J. Periodontol.* 70: 30-43.
3. Amann, R.I., L. Krumholz, D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
4. Amann, R.I., W. Ludwig, K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
5. Amano, A., S. Shizukuishi, H. Tamagawa, K. Iwakura, S. Tsunasawa, A. Tsunemitsu. 1990. Characterization of Superoxide Dismutases Purified from Either Anaerobically Maintained or Aerated *Bacteroides gingivalis*. *J. Bacteriol.* 172: 1457-1463.
6. Amano, A., T. Ishimoto, H. Tamagawa, S. Shizukuishi. 1992. Role of Superoxide Dismutase in Resistance of *Porphyromonas gingivalis* to Killing by Polymorphonuclear Leukocytes. *Infect. Immun.* 60: 712-714.
7. Amano, A., M. Kuboniwa, I. Nakagawa, S. Akiyama, I. Morisaki, S. Hamada. 2000. Prevalence of Specific Genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and Periodontal Health Status. *J. Dent. Res.* 79: 1664-1668.

8. Armitage, G.C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.* 4: 1-6.
9. Ashimoto, A., C. Chen, I. Bakker, J. Slots. 1996. Polymerase chain reaction of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* 11: 266-273.
10. Baehni, P., C.C. Tsai, W.P. McArthur, B.F. Hammond, N.S. Taichman. 1979. Interaction of Inflammatory Cells and Oral Microorganisms. VIII. Detection of Leukotoxic activity of a Plaque-Derived Gram-Negative Microorganism. *Infect. Immunol.* 24: 233-243.
11. Baker, P.J., M. Dixon, R.T. Evans, D.C. Roopenian. 2000. Heterogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains in the induction of alveolar bone loss in mice. *Oral Microbiol. Immunol.* 15: 27-32.
12. Barua, P.K., D.W. Dyer, M.E. Neiders. 1990. Effect of iron limitation on *Bacteroides gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 5: 263-268.
13. Beck, J.D., G.G. Koch, R.G. Rozier, G.E. Tudor. 1990. Prevalence and Risk Indicators for Periodontal Attachment Loss in a Population of Older Community-Dwelling Blacks and Whites. *J. Periodontol.* 61: 521-528.
14. Beck, J.D., G.G. Koch, J.J. Zambon, R.J. Genco, G.E. Tudor. 1992. Evaluation of Oral Bacteria as Risk Indicators for Periodontitis in Older Adults. *J. Periodontol.* 63: 93-99.
15. Beck, J.D., L. Cusmano, W. Grenn-Helms, G.G. Koch, S. Offenbacher. 1997. A 5-year study of attachment loss in community-dwelling older adults: incidence density. *J. Periodontol. Res.* 32: 506-515.

16. Bedi, G.S., T. Williams. 1994. Purification and Characterization of a Collagen-degrading Protease from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biological Chemistry. 269: 599-606.
17. Beikler, T., U. Peters, S. Prajaneh, K. Prior, B. Ehmke, T.F. Flemmig. 2003. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Caucasians. Eur. J. Oral Sci. 111: 390-394.
18. Berglundh, T., L. Krok, B. Liljenberg, E. Westfelt, G. Serino, J. Lindhe. 1998. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. J. Clin. Periodontol. 25: 354-362.
19. Bodinka, A., H. Schmidt, B. Henkel, T.F. Flemmig, B. Klaiber, H. Karch. 1994. Polymerase chain reaction for the identification of *Porphyromonas gingivalis* collagenase genes. Oral Microbiol. Immunol. 9: 161-165.
20. Bolstad, A.I., H.B. Jensen, V. Bakken. 1996. Taxonomy, Biology, and Periodontal Aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clin. Microbiol. Rev. 9: 55-71.
21. Bragd, L., G. Dahlén, M. Wikström, J. Slots. 1987. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. J. Clin. Periodontol. 14: 95-99.
22. Bramanti, T.E., S.C. Holt. 1990. Iron-regulated Outer Membrane Proteins in the Periodontopathic Bacterium, *Bacteroides gingivalis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 166: 1146-1154.

23. Brown, V.I., E.J.L. Lowbury. 1965. Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Pathol. 18: 752-756.
24. Brown, L.J., R.C. Oliver, H. Loe. 1990. Evaluating periodontal status of US employed adults. J. Am. Dent. Assoc. 121: 226-232.
25. Brown, L.J., J.M. Albandar, J.A. Brunelle, H. Loe. 1996. Early-Onset Periodontitis: Progression of Attachment Loss During 6 Years. J. Periodontol. 67: 968-975.
26. Burkhardt, F. 1992. Mikrobiologische Diagnostik. In: Burkhardt, F. (Hrsg). Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1. Aufl., S. 200-201.
27. Ceri, H., M.E. Olson, C. Stremick, R.R. Read, D. Morck, A. Buret. 1999. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. J. Clin. Microbiol. 37: 1771-1776.
28. Chaves, E.S., M.K. Jeffcoat, C.C. Ryerson, B. Snyder. 2000. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. J Clin Periodontol 27: 897-903.
29. Choi, B.K., B.J. Paster, F.E. Dewhirst, U.B. Göbel. 1994. Diversity of Cultivable and Uncultivable Oral *Spirochetes* from a Patient with Severe Destructive Periodontitis. Infect. Immun. 62: 1889-1895.
30. Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.E. Korber, H.M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49: 711.

31. Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D. deBeer, D.E. Caldwell, D.E. Korber, G. James. 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176: 2137.
32. Costerton, J.W., P.S. Stewart, E.P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284: 1318.
33. Creatogen AG. 2001. Gebrauchsanweisung creaFast® Helicobacter pylori Combi Kit.
34. Darveau, R.P., C.M. Belton, R.A. Reife, R.J. Lamont. 1998. Local Chemokine Paralysis, a Novel Pathogenic Mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity.* 66: 1660-1665.
35. Deinzer, R. 2004. Stress und Parodontitis: Neue Erkenntnisse zu einer alten Vermutung. *IDZ-Information* 2/2004.
36. DeLong, E.F., G.S. Wickham, N.R. Pace. 1989. Phylogenetic Stains: Ribosomal RNA-Based Probes for the Identification of Single Cells. *Science.* 243: 1360-1363.
37. Deshpande, R.G., M.B. Khan. 1999. Purification and characterization of hemolysin from *Porphyromonas gingivalis* A7436. *FEMS Microbiol. Lett.* 176: 387-394.
38. Dix, K., S.M. Watanabe, S. McArdle, D.J. Lee, C. Randolph, B. Moncla, D.E. Schwartz. 1990. Species-Specific Oligodeoxynucleotide Probes for the Identification of Periodontal Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 28: 319-323.
39. Donlan, R.M., J.W. Costerton. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.

40. Doung-udomdacha, S., A. Rawlinson, C.W.I. Douglas. 2000. A novel closed-tube quantitative-PCR method for enumerating *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodont. Res. 35: 247-258.
41. Dzink, J.L., R.J. Gibbons, W.C. 3rd Childs, S.S. Socransky. 1989. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells. Oral Microbiol. Immunol. 4(1): 1-5.
42. Flemmig, T.F. 1999. Periodontitis. Ann. Periodontol. 4: 32-38.
43. Fletcher, J., S. Nair, S. Poole, B. Henderson, M. Wilson. 1998. Cytokine Degradation by Biofilms of *Porphyromonas gingivalis*. Current Microbiology. 36: 216-219.
44. Folwaczny, M., R. Hickel. 2003. Biofilm - Problem oder Perspektive? Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift. 58: 648-666.
45. Fox, G.E., J.D. Wisotzkey, P.Jr. Jurtshuk. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 166-170.
46. Frias, J., E. Olle, M. Alsina. 2001. Periodontal Pathogens Produce Quorum Sensing Signal Molecules. Infect. Immun. 69: 3431-3434.
47. Fuqua, C., E.P. Greenberg. 1998. Cell-to cell communication in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: They may be talking, but who's listening? Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 6571-6572.
48. Gall, J.G., M.L. Pardue. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Sci. USA. 378-383.

49. Genco, R.J., A.W. Ho, S.G. Grossi, R.G. Dunford, L.A. Tedesco. 1999. Relationship of Stress, Distress and Inadequate Coping Behaviors to Periodontal Disease. *J. Periodontol.* 70: 711-723.
50. Gersdorf, H., A. Meissner, K. Pelz, G. Krekeler, U.B. Göbel. 1993. Identification of *Bacteroides forsythus* in Subgingival Plaque from Patients with Advanced Periodontitis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 941-946.
51. Gersdorf, H., K. Pelz and U.B. Göbel. 1993. Fluorescence in situ hybridization for direct visualization of Gram-negative anaerobes in subgingival plaque samples. *FEMS Immun. Med. Microbio.* 6: 109-114.
52. Gibbons, R.J. 1989. Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Diseases. *J. Dent. Res.* 68: 750-760.
53. Giovannoni, S.J., E.F. DeLong, G.J. Olsen, N.R. Pace. 1988. Phylogenetic Group-Specific Oligodeoxynucleotide Probes for Identification of Single Microbial Cells. *J. Bacteriology.* 170: 720-726.
54. Gmür, R., T. Thurnheer. 2002. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. *Microbiology.* 148: 1379-1387.
55. Graf, B., U.B. Göbel, T. Adam. 1998. Qualitative and quantitative studies of autofluorescence in fungi. *Mycoses.* 41: 39-46.
56. Grenier, D., D. Mayrand. 1987. Selected characteristics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* 25: 738-740.

57. Griffen, A.L., S.R. Lyons, M.R. Becker, M.L. Moeschberger, E.J. Leys. 1999. *Porphyromonas gingivalis* Strain Variability and Periodontitis. J. Clin. Microbiol. 37: 4028-4033.
58. Grossi, S.G., J.J. Zambon, A.W. Ho, G. Koch, R.G. Dunford, E.E. Machtei, O.M. Norderyd, R.J. Genco. 1994. Assessment of Risk for Periodontal Disease. I. Risk Indicators for Attachment Loss. J. Periodontol. 65: 260-267.
59. Grossi, S.G., R.J. Genco, E.E. Machtei, A.W. Ho, G. Koch, R. Dunford, J.J. Zambon, E. Hausmann. 1995. Assessment of Risk for Periodontal Disease. II. Risk Indicators for Alveolar Bone Loss. J. Periodontol. 66: 23-29.
60. Haffajee, A.D., J.L. Dzink, S.S. Socransky. 1988. Effect of modified Widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. J. Clin. Periodontol. 15: 255-262.
61. Haffajee, A.D., S.S. Socransky, J.M. Goodson. 1992. Subgingival temperature (I). Relation to baseline clinical parameters. J. Clin. Periodontol. 19: 401-408.
62. Haffajee, A.D., S.S. Socransky. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000. 5: 78-111.
63. Haffajee, A.D., M.A. Cugini, A. Tanner, R.P. Pollack, C. Smith, R.L.Jr. Kent, S.S. Socransky. 1998. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. J. Clin. Periodontol. 25: 346-353.
64. Hall-Stoodley, L., P. Stoodley. 2002. Development regulation of microbial biofilms. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 228.

65. Heymann, S.J., T.F. Brewer, M. Ettling. 1997. Effectiveness and cost of rapid and conventional laboratory methods for *Mycobacterium Tuberculosis* screening. Public health reports. 112: 513-523.
66. Holz, H.M. Was man von der Fluoreszenz-Mikroskopie wissen sollte. Carl Zeiss.
67. John, H.A., M.L. Birnstiel, K.W. Jones. 1969. RNA-DNA Hybrids at the Cytological Level. Nature. 223: 582-587.
68. Kinniment, S.L., J.W. Wimpenny. 1992. Measurements of the distribution of adenylate concentrations and adenylate energy charge across *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1629.
69. Kolenbrander, P.E., J. London. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacteria adherence. J. Bacteriol. 175: 3247-3252.
70. Kolenbrander, P.E. 2000. Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems. Annu. Rev. Microbiol. 54: 413-437.
71. Kolenbrander, P.E., R.N. Andersen, D.S. Blehert, P.G. Egland, J.S. Foster, R.J. Palmer Jr. 2002. Communication among Oral Bacteria. Microbiol Molecul Biology Reviews. 66: 486-505.
72. Kuritza, A.P., C.E. Getty, P. Shaughnessy, R. Hesse, A.A. Salyers. 1986. DNA Probes for Identification of Clinically Important *Bacteroides* Species. J. Clin. Microbiol. 23: 343-349.
73. Lamont, R.J., H.F. Jenkinson. 1998. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1244-1263.

74. Landegent, J.E., N. Jansen in de Wal, R.A. Baan, J.H. Hoeijmakers, M. van der Ploeg. 1984. 2-Acetylaminofluorene-modified Probes for the Indirect Hybridocytochemical Detection of Specific Nucleic Acid Sequences. *Exp. Cell. Res.* 153: 61-72.
75. Lischewski, A., R.I. Amann, D. Harmsen, H. Merkert, J. Hacker, J. Morschhauser. 1996. Specific detection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by fluorescent in situ hybridization with an 18S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Microbiology.* 142: 2731-2740.
76. Lischewski, A., M. Kretschmar, H. Hof, R. Amann, J. Hacker, J. Morschhäuser. 1997. Detection and Identification of *Candida* Species in Experimentally Infected Tissue and Human Blood by rRNA-Specific Fluorescent In Situ Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2943-2948.
77. Loesche, W.J., D.E. Lopatin, J. Stoll, N. van Poperin, P.P. Hujoel. 1992. Comparison of Various Detection Methods for Periodontopathic Bacteria: Can Culture Be the Primary Reference Standard? *J. Clin. Microbiol.* 30: 418-426.
78. Lopez, N.J. 2000. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in Progressive Adult Periodontitis. *J. Periodontol.* 71: 948-954.
79. Lyons, S.R., A.L. Griffen, E.J. Leys. 2000. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2362-2365.
80. Machtei, E.E., M.I. Cho, R. Dunford, J. Norderyd, J.J. Zambon, R.J. Genco. 1994. Clinical, microbiological, and histological factors which

influence the success of regenerative periodontal therapy. J. Periodontol. 65: 154-161.

81. Madianos, P.N., P.N. Papapanou, J. Sandros. 1997. *Porphyromonas gingivalis* Infection of Oral Epithelium Inhibits Neutrophil Transepithelial Migration. Infection And Immunity. 65: 3983-3990.
82. Marsh, P.D., A.S. McKee, A.S. McDermid, A.B. Dowsett. 1989. Ultrastructure and enzyme activities of a virulent and an avirulent variant of *Bacteroides gingivalis* W50. FEMS Microbiol. Lett. 50: 181-185.
83. Marsh, P., M.V. Martin. 2003. Orale Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 1. Aufl. S.33,49.
84. McKee, A.S., A.S. McDermid, A. Baskerville, A.B. Dowsett, D.C. Ellwood, P.D. Marsh. 1986. Effect of Hemin on the Physiology and Virulence of *Bacteroides gingivalis* W50. Infect. Immun. 52: 349-355.
85. Micheelis, W., E. Reich. 1999. Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III). Auszug der IDZ (S.21-31).
86. Mombelli, A., B. Schmid, A. Rutar, N.P. Lang. 2000. Persistence Patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* After Mechanical Therapy of Periodontal Disease. J. Periodontol. 71: 14-21.
87. Moncla, B.J., P. Braham, K. Dix, S. Watanabe, D. Schwarz. 1990. Use of Synthetic Oligonucleotide DNA Probes for the Identification of *Bacteroides gingivalis*. J. Clin. Microbiol. 28: 324-327.
88. Monici, M., R. Pratesi, P.A. Bernabei, R. Caporale, P.R. Ferrini, A.C. Croce, P.A. Balzarini, G. Bottiroli. 1995. Natural fluorescence of white

- blood cells: spectroscopic and imaging study. J. Photochem. Photobiol. B. 30: 29-37.
89. Moter, A., C. Hoenig, B.K. Choi, B. Riep, U.B. Göbel. 1998. Molecular Epidemiology of Oral Treponemes Associated with Periodontal Disease. J. Clin. Microbiol. 36: 1399-1403.
90. Moter, A., G. Leist, R. Rudolph, K. Schrank, B.K. Choi, M. Wagner, U.B. Göbel. 1998. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. Microbiol. 144: 2459-2467.
91. Moter, A., U.B. Göbel. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J. Microbiol. Methods. 41: 85-112.
92. Neef, A., A. Zaglauer, H. Meier, R. Amann, H. Lemmer, K.-H. Schleifer. 1996. Population Analysis in a Denitrifying Sand Filter: Conventional and In Situ Identification of *Paracoccus spp.* In Methanol-Fed Biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4329-4339.
93. Neiders, M.E., P.B. Chen, H. Suido, H.S. Reynolds, J.J. Zambon, M. Shlossman, R.J. Genco. 1989. Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodontol. Res. 24: 192-198.
94. Njoroge, T., R.J. Genco, H.T. Sojar, N. Hamada, C.A. Genco. 1997. A Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* Invasion of Oral Epithelial Cells. Infect. Immun. 65: 1980-1984.
95. Nowzari, H., J. Slots. 1994. Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. J. Clin. Periodontol. 21: 203-210.

96. O'Brien-Simpson, N.M., P.D. Veith, S.G. Dashper, E.C. Reynolds. 2004. Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontology* 2000. 35: 101-134.
97. Okamoto, H., T. Yoneyama, J. Lindhe, A. Haffajee, S. Socransky. 1988. Methods of evaluating periodontal disease data in epidemiological research. *J. Clin. Periodontol.* 15: 430-439.
98. Olsen, I., H.N. Shah, S.E. Gharbia. 1999. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol.* 2000. 20: 14-52.
99. Pardue, M.L., J.C. Gall. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Sci. USA* 64:64, 600-604.
100. Paster, B.J., F.E. Dewhirst, I. Olsen, G.F. Fraser. 1994. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas spp.* And Related Bacteria. *J. Bacteriol.* Feb.: 725-732.
101. Paster, B.J., S.K. Boches, J.L. Galvin, R.E. Ericson, C.N. Lau, V.A. Levanos, A. Sahasrabudhe, F.E. Dewhirst. 2001. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. *J. Bacteriol.* 183: 3770-3783.
102. Pinkel, D., J. Landegent, C. Collins, J. Fuscoe, R. Segraves, J. Lucas, J. Gray. 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 9138-9142.
103. Pinkel, D., T. Straume, J.W. Gray. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2934-2938.

104. Poulsen, L.K., G. Ballard, D.A. Stahl. 1993. Use of rRNA Fluorescence In Situ Hybridization for Measuring the Activity of Single Cells in Young and Established Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1354-1360.
105. Reich, E., K.A. Hiller. 1993. Reasons for tooth extraction in the western states of Germany. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 21: 379-383.
106. Reinhardt, R.A., J.B. Payne, C.A. Maze, K.D. Patil, S.J. Gallagher, J.S. Mattson. 1999. Influence of Estrogen and Osteopenia/Osteoporosis on Clinical Periodontitis in Postmenopausal Woman. *J. Periodontol.* 70: 823-828.
107. Ronderos, M., D.R. Jacobs, J.H. Himes, B.L. Pihlstrom. 2000. Associations of periodontal disease with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy: cross-sectional evaluation of US adults from NHANES III. *J. Clin. Periodontol.* 27: 778-786.
108. Rosan, B., R.J. Lamont. 2000. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2: 1599.
109. Rudney, J. D., R. Chen, G. J. Sedgewick. 2001. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in Buccal Epithelial Cells Collected from Human Subjects. *Infection And Immunity.* 69: 2700-2707.
110. Sandros, J., C. Karlsson, D.F. Lappin, P.N. Madianos, D.F. Kinane, P.N. Papapanou. 2000. Cytokine Responses of Oral Epithelial Cells to *Porphyromonas gingivalis* Infection. *J. Dent. Res.* 79: 1808-1814.

111. Sauer, K., A.K. Camper, G.D. Ehrlich, J.W. Costerton, D.G. Davies. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. J. Bacteriol. 184: 1140-1154.
112. Schönhuber, W., B. Zarda, S. Eix, R. Rippka, M. Herdmann, W. Ludwig, R. Amann. 1999. In Situ Identification of *Cyanobacteria* with Horseradish Peroxidase-Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1259-1267.
113. Seymour, G. F., J. J. Taylor. 2004. Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal disease. Periodontology 2000. 35: 9-13.
114. Shah, H.N., S.E. Gharbia. 1992. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 542-546.
115. Shiloah, J., M.R. Patters, J.W.3rd Dean, P. Bland, G. Toledo. 1998. The Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in Humans 1 Year After 4 Randomized Treatment Modalities. J. Periodontol. 69: 1364-1372.
116. Slots, J. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. Periodontology 2000. 20: 7-13.
117. Slots, J., M. Ting. 1999a. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontology 2000. 20: 82-121.
118. Socransky, S.S., W.J. Loesche, C. Hubersak, J.B. MacDonald. 1964. Dependency of *Treponema microdentium* on other oral organisms for

isobutyrate, polyamines, and a controlled oxidation-reduction potential. J. Bacteriol. 88: 200-209.

119. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, J.M. Goodson, J. Lindhe. 1984. New concepts of destructive periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 11: 21-32.
120. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, J.L. Dzink. 1988. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. J. Clin. Periodontol. 15: 440-444.
121. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, C. Smith, S. Dibart. 1991. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. J. Clin. Periodontol. 18: 766-775.
122. Socransky, S.S., A.D. Haffajee. 1992. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. J. Periodontol. 63: 322-331.
123. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, M.A. Cugini, C. Smith, R.L.Jr. Kent. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. J. Clin. Periodontol. 25: 134-144.
124. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, L.A. Ximenez-Fyvie, M. Feres, D. Mager. 1999. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. Periodontology 2000. 20: 341-362.
125. Sternberg, C., B.B. Christensen, T. Johansen, A. Toftgaard-Nielsen, J.B. Andersen, M. Givskov, S. Molin. 1999. Distribution of Bacterial Growth Activity in Flow-Chamber Biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4108-4117.

126. Stewart, P.S., J.W. Costerton. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 358: 135.
127. Stoodley, P., Z. Lewandowski, J.D. Boyle, H.M. Lappin-Scott. 1998. Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnol. Bioeng.* 57: 536.
128. Strzempko, M.N., S.L. Simon, C.K. French, J.A. Lippke, F.F. Raia, E.D. Savitt, K.K. Vaccaro. 1987. A Cross-Reactivity Study of Whole Genomic DNA Probes for *Haemophilus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides intermedius*, and *Bacteroides gingivalis*. *J. Dent. Res.* 66: 1543-1546.
129. Sundqvist, G., D. Figdor, L. Hanstrom, S. Sorlin, G. Sandstrom. 1991. Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scand. J. Dent. Res.* 99: 117-129.
130. Sutherland, I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147: 3-9.
131. Suzuki, M., T. Takadera, S. Harayama, S. Yamamoto. 2000. Diversity of marine *Cytophaga*-like bacteria: Phylogenetic analysis using *gyrB* sequences and their carotenoids profiles. Unpublished. Tokyo Research Laboratories; Asahi machi 3-6-6, Machida, Tokyo 194-8533, Japan.
132. Szöllösi, J., S.J. Lockett, M. Balazs, F.M. Waldman. 1995. Autofluorescence correction for fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*. 20: 356-361.
133. Takamatsu, N., K. Yano, M. Umeda, I. Ishikawa. 1999. Effect of Initial Periodontal Therapy on the Frequency of Detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol.* 70: 574-580.

134. Teng, Y.A. 2003. The Role of Acquired Immunity And Periodontal Disease Progression. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14: 237-252.
135. Tezal, M., J. Wactawski-Wende, S.G. Grossi, A.W. Ho, R. Dunford, R.J. Genco. 2000. The Relationship Between Bone Mineral Density and Periodontitis in Postmenopausal Women. *J. Periodontol.* 71: 1492-1498.
136. Tolker-Nielsen, T., U.C. Brinch, P.C. Ragas, J.B. Andersen, C.S. Jacobsen, S. Molin. 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J. Bacteriol.* 182: 6482.
137. Tran, S.D., J.D. Rudney. 1996. Multiplex PCR Using Conserved and Species-Specific 16S rRNA Gene Primers for Simultaneous Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2674-2678.
138. Tran, S.D., J.D. Rudney. 1999. Improved Multiplex PCR Using Conserved and Species-Specific 16S rRNA Gene Primers for Simultaneous Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3504-3508.
139. Tsai, C.Y., L.F. Wolff, G. Germaine, J. Hodges. 2003. A rapid DNA probe test compared to culture methods for identification of subgingival plaque bacteria. *J. Clin. Periodont.* 30: 57-62.
140. Van Dyke, T.E., C.N. Serhan. 2003. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. *J. Dent. Res.* 82: 82-90.

141. Van De Lest, C.H., E.M. Versteeg, J.H. Veerkamp, T.H. Van Kuppevelt. 1995. Elimination of Autofluorescence in Immunofluorescence Microscopy with Digital Image Processing. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 727-730.
142. Van den Eynde, H., R. De Baere, H.N. Shah, S.E. Garbia, G.E. Fox, J. Michalik, Y. Van de Peer, R. De Wachter. 1989. 5S ribosomal ribonucleic acid sequences in *Bacteroides* and *Fusobacterium*: evolutionary relationships within these genera and among eubacteria in general. *Int. J. Bacteriol.* 39: 78-84.
143. Van Steenberg, T.J.M., F.G. Delemarre, F. Namavar, J. De Graaf. 1987. Differences in virulence within the species *Bacteroides gingivalis*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 53: 233-244.
144. Van Steenberg, T.J.M., M.F. Timmerman, F.H. Mikx, G. Quincey, G.A. van der Weijden, U. van der Velden, J. de Graaff. 1996. Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. *J. Clin. Periodontol.* 23: 955-959.
145. Van Winkelhoff, A.J., U. van der Velden, J. de Graaff. 1988. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J. Clin. Periodontol.* 15: 116-122.
146. Wallner, G., R. Amann, W. Beisker. 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry.* 14: 136-143.
147. Weinberg, A., C.M. Belton, Y. Park, R.J. Lamont. 1997. Role of Fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* Invasion of Gingival Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 65: 313-316.

148. Wessendorf, M.W., T.C. Brelje. 1992. Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red, and cyanine 3.18. *Histochemistry*. 98: 81-85.
149. Winkel, E.G., A.J. van Winkelhoff, U. van der Velden. 1998. Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *J. Clin. Periodontol.* 25: 857-864.
150. Whittaker, C.J., C.M. Klier, P.E. Kolenbrander. 1996. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 513-552.
151. Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
152. Ximénez-Fyvie, L.A., A.D. Haffajee, S.S. Socransky. 2000. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 27: 648-657.
153. Xu, K.D., G.A. McFeters, P.S. Stewart. 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*. 146: 547.
154. Xu, K.D., G.A. McFeters, P.S. Stewart, F. Xia, C.T. Huang. 1998. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4035.

7. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei den Herren Universitätsprofessoren Dr. med. dent. Thomas F. Flemmig und Dr. rer. nat. Helge Karch für die Überlassung des Themas und die Unterstützung durch die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und der finanziellen Mittel.

Ebenso ein großes und herzliches Danke an Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Beikler für sein strapazierfähiges Nervenkostüm und seiner, zumindest für einen Betreuer einer Promotionsarbeit, wahrlich einmaligen Fähigkeit, fast immer Zeit für die Belange eines Doktoranten zu finden.

Nicht zu vergessen die Weltklassedamenmannschaft der Mikrobiologischen Abteilung der Klinik und Poliklinik für Parodontologie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Merci beaucoup, denn ohne Eure Unterstützung wäre es spannend geworden.

8. Lebenslauf

14.06.1971	geboren in Münster, Geburtsname Patzer, als Sohn von Josef Patzer und Brigitte Patzer
1977 – 1979	Besuch der Annette-von-Droste-Hülshoff-Grundschule in Münster
1979 - 1981	Besuch der Thomas-Morus-Grundschule in Münster
1981 - 1987	Besuch der Friedensschule (Gesamtschule) in Münster mit Erlangung der Fachoberschulreife
08/1987 - 01/1991	Ausbildung zum Zahntechniker in dem Dentallabor Ullrich Mischnat in Münster
02/1991 - 07/1994	Tätigkeit als Zahntechniker im Dentallabor Mischnat, Münster, mit folgend aufgeführter Unterbrechung durch Beschäftigung als Zeitsoldat:
01/1993 - 06/1994	Zeitsoldat im Sanitätsdienst einer Zahnarztgruppe der Bundeswehr
08/1994 - 06/1997	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am Overberg-Kolleg in Münster, Bischöfliches Institut zur Erlangung der Hochschulreife
10/1997	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
03/1999	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
03/2000	Zahnärztliche Vorprüfung
02 - 07/2003	Zahnärztliche Prüfung
28.07.2003	Approbation als Zahnarzt

seit dem 01.08.2003 Tätigkeit als Ausbildungsassistent bei Dr. Kai Worch
M.S. (USA), Fachzahnarzt für Parodontologie in
Garbsen

15.05.2005 Eheschließung mit Ruth Maria Kaiser

Garbsen, den 20.08.2005

Uwe Swaneburg

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Seite 7
Abbildung 2	Seite 14
Abbildung 3	Seite 16
Abbildung 4	Seite 36
Abbildung 5	Seite 36
Abbildung 6	Seite 37
Abbildung 7	Seite 38
Abbildung 8	Seite 41
Abbildung 9	Seite 42
Abbildung 10	Seite 46
Abbildung 11	Seite 46

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Seite 3
Tabelle 2	Seite 17
Tabelle 3	Seite 22
Tabelle 4	Seite 27
Tabelle 5	Seite 28
Tabelle 6	Seite 35
Tabelle 7	Seite 39
Tabelle 8	Seite 41
Tabelle 9	Seite 43
Tabelle 10	Seite 45
Tabelle 11	Seite 47