

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Parodontologie  
Kommissarische Leiter:  
Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen  
Priv.-Doz. Dr. med. dent. Benjamin Ehmke

**Untersuchungen zur genotypischen Variabilität von *Eikenella corrodens*  
mittels ERIC2-PCR und Sequenzierung der 16S rDNA**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Swaneburg, Ruth Maria  
geb. Kaiser  
aus Coesfeld

2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen

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

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.07

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Parodontologie

Kommissarische Leiter:

Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen und Priv.-Doz. Dr. med. dent. Benjamin Ehmke

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Helge Karch

Zusammenfassung

Untersuchungen zur genotypischen Variabilität von *Eikenella corrodens*  
mittels ERIC2-PCR und Sequenzierung der 16S rDNA

Swaneburg, Ruth

*Eikenella corrodens* gilt als typischer Besiedler der Mundhöhle und des Respirationstraktes und wird als Pathogen unter anderem mit der Parodontitis assoziiert. Da es phänotypisch und genetisch eine hohe Heterogenität aufweist, wird die Zuordnung verschiedener Klone zu verschiedenen Krankheitsentitäten diskutiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit zwei Verfahren („ERIC2-PCR“ und „Sequenzierung des 16S rRNA-Gens“) die genotypische Variabilität von *E. corrodens* darzustellen und die daraus resultierende Möglichkeit zur Subtypisierung auch im Hinblick auf die Herkunft der Isolate zu überprüfen.

An 69 klinischen Isolaten wurde zum einen die ERIC2-PCR in Verbindung mit der Kapillarelektrophorese unter Einsatz eines internen Größen-Standards als Referenz durchgeführt. Die Gegenüberstellung der erzielten Fragmentgrößen und –anzahl der einzelnen Isolate führte zu einer Bildung von 14 Hauptgruppen, welche untereinander keine Gemeinsamkeiten mehr aufweisen. Zum anderen wurden die selben Isolate nach der Sequenzierung ihres 16S rRNA-Gens hinsichtlich Variabilitäten in der Nukleotidabfolge untersucht, wodurch acht Cluster gebildet werden konnten, welche sich wiederum aus Untergruppen zusammensetzen. Alle Cluster sind auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen. Sowohl bei der ERIC2-PCR als auch bei der Sequenzierung lässt sich ein Einfluss der Herkunft der Isolate auf Gruppen- oder Clusterbildung kaum erkennen.

Die Ergebnisse bestätigen die bekannte große Heterogenität der Spezies *E. corrodens*. Für die Subtypisierung sind die untersuchten Verfahren jedoch unzureichend. Die ERIC2-PCR ist durch die große Anzahl der entstehenden Gruppen, welche zudem der Spezies nicht mehr eindeutig zugeordnet werden können, als nicht praktikabel anzusehen. Die Sequenzierung erlaubt zwar eine Zuordnung zur Hauptspezies, die prozentuale Heterogenität erscheint jedoch für eine daraus hervorgehende eindeutige Subtypisierung als zu gering. Eine genaue Zuordnung bestimmter Klone zu einzelnen Krankheitsbildern ist ebenfalls mit beiden Verfahren nicht durchführbar.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.07

Meinem Vater

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 <i>Eikenella corrodens</i>	1
1.1.1 Morphologie	1
1.1.2 Stoffwechsel	2
1.1.3 Wachstumseigenschaften	3
1.1.4 Reaktionen auf antimikrobielle Therapie	3
1.1.5 In vivo Habitate und pathogene Bedeutung	4
1.1.6 Nachweisverfahren	5
1.1.7 Verwandtschaften	5
1.1.8 Genetische und phänotypische Heterogenität	7
1.2 <i>Eikenella corrodens</i> und Parodontitis	9
1.3 Bisherige Subdifferenzierungsversuche	12
1.4 Anwendung des ERIC2-Primers und der Sequenzierung	14
1.4.1 ERIC-PCR	14
1.4.2 Sequenzierung	15
1.5 Ziel dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Klinische Isolate	17
2.2 Kultivierung von <i>Eikenella corrodens</i>	20
2.3 Isolierung der DNA	21
2.4 Nachweis von <i>Eikenella corrodens</i>	22
2.5 Polymerasekettenreaktion mit dem Primer ERIC2	23
2.6 Auftrennung der PCR-Produkte	24
2.6.1 Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese	24
2.6.2 Darstellung der PCR-Produkte durch die Kapillarelektrophorese	24
2.7 Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen der einzelnen Isolate anhand der erhaltenen DNA-Segmente	24

	Seite
2.8 Sequenzierung des 16S rRNA-Gens	25
3. Ergebnisse	28
3.1 Ermittlung einzelner Parameter auf das Ergebnis der ERIC-PCR	28
3.2 Elektrophorese der ERIC2-PCR-Produkte	30
3.2.1 Auftrennung im Agarosegel	30
3.2.2 Darstellung der genauen Größe der DNA-Fragmente und Entwicklung eines daraus resultierenden Stammbaumes	31
3.3 Ergebnisse der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens aller Isolate	39
3.4. Gegenüberstellung der Ergebnisse der ERIC2-PCR und der Sequenzierung	45
4. Diskussion	46
5. Zusammenfassung	53
6. Literaturverzeichnis	54
7. Danksagung	67
8. Lebenslauf	68
9. Anhang	I
9.1 Abbildungsverzeichnis	I
9.2 Tabellenverzeichnis	I

## 1. Einleitung

### 1.1 *Eikenella corrodens*

#### 1.1.1 Morphologie

*Eikenella corrodens* (*E. corrodens*) ist ein 0,3-0,4x1,5-4,0µm großes, nicht bewegliches, fakultativ anaerobes, gramnegatives Stäbchen (8, 9, 75, 80). In seiner Morphologie zeigt es Variationen, die mit Hilfe der „Scanning electron microscopy“ (SEM) visualisiert werden können. So wurden mit dieser Methode kleine korrodierende, das heißt sich ins Nährmedium eingrabende, und große, nicht korrodierende Kolonievarianten untersucht. Die großen und leicht gewölbten Kolonien zeigen ebene und glatte Kolonieränder, die Zellen auf der Oberfläche sind regelmäßig angeordnet und weisen am Kolonierand mit den Enden aneinanderliegende Zellreihen auf. Überlagern sich Anteile großer Kolonien, so sind die Zellen innerhalb dieser sich kreuzenden Abschnitte willkürlich oder horizontal zum Medium ausgerichtet (Abb. 1B, S.2). Sie hinterlassen nach der Abnahme vom Medium keinen Abdruck im Agar (8, 18). Bei den kleinen Kolonien hingegen erscheint das Zentrum erhaben und es liegt eine klare Abgrenzung zum umgebenen Saum vor. Im Zentrum der Oberfläche sind die Zellen willkürlich arrangiert, innerhalb kreuzender Abschnitte liegen die Zellen willkürlich oder senkrecht zum Medium (Abb. 1A, S.2). Nach dem Abnehmen hinterlassen sie einen Abdruck im Agar (8, 18, 81).

Beobachtungen der Ränder von korrodierenden Kolonien weisen darauf hin, dass eine Verlagerung der Oberfläche in die Umgebung, genannt „twitching motility“ in den äußeren Bereichen vorkommt und somit eine Rolle in der Kolonisation spielen könnte (81). Amorphes „schleimiges“ Material, welches Gruppen von Zellen überzieht, wurde bei beiden Kolonieformen beobachtet (18).



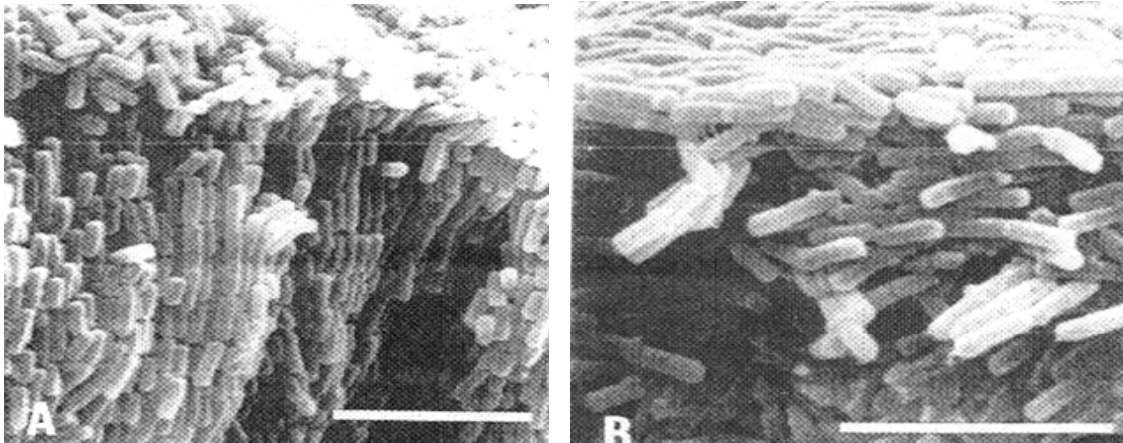


Abb. 1: Anordnung der Zellen in sich kreuzenden Abschnitten der Kolonien. A: kleine Kolonien mit senkrecht angeordneten Zellen. B: große Kolonien mit horizontal angeordneten Zellen. Größe des weißen Balkens entspricht in beiden Bildern 5µm. Quelle: Cobb, C.M., J.T. Helber, R. Hirschberg. 1994. Scanning electron microscopy of *Eikenella corrodens* colony morphology variants. J. Periodontal Res. 29: 410-417.

### 1.1.2 Stoffwechsel

Die Energiegewinnung erfolgt bei *E. corrodens* hauptsächlich durch die oxidative Deaminisierung spezifischer Aminosäuren, insbesondere von Prolin, wobei dieser Prozess an die Reduktion von Nitrat zu Nitrit gekoppelt ist. Somit ist das Wachstum quantitativ abhängig von den Aminosäuren Prolin, Glutamin und Serin (35, 36, 37, 77). Darüber hinaus synthetisiert *E. corrodens* eine Carboxypeptidase für die Metabolisierung von Glutamat, was ebenfalls in Verbindung mit der Nitrat-Reduktion geschieht (36). Ebenso ist die Aspartase-Aktivität mit dem Nitratmetabolismus von *E. corrodens* verbunden. Die Aspartase katalysiert die reversible Deaminisierung von L-Aspartamsäure und bildet so Ammonium und Ammoniak (77). In unterschiedlichen der Bakterienidentifizierung dienenden Nachweisverfahren („bunte Reihe“) zeigt *E. corrodens* als weitere biochemische Merkmale positive Oxidase-, Ornithindecaboxylase- und Lysindecaboxylase-Reaktionen sowie eine negative Katalasereaktion. Kohlenhydrate werden weder enzymatisch noch oxidativ abgebaut, ebenso erfolgt weder ein enzymatischer Abbau von

Tryptophan zu Indol, noch wird Harnstoff durch das Enzym Urease gespalten (8).

### 1.1.3 Wachstumseigenschaften

Bei diesem langsam wachsenden, anspruchsvollen Organismus (75, 80) wird das Wachstum der Kolonien durch Hämine oder durch eine 5-14% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (75, 80) unter Zugabe von Nitrat (35) gefördert. Ein saures Milieu (pH<5,0) wirkt als hemmender Faktor. Wird diesem noch eine niedrige Konzentration an Nitrit hinzugefügt, kommt es durch die Umwandlung von Nitrit zu Stickoxid zum Absterben aller Bakterien (3). Optimale Wachstumsbedingungen findet *E. corrodens* auf einem mit Blut angereichertem Agar (33, 43) in anaerober 5%iger CO<sub>2</sub>- Atmosphäre (8, 33) bei einer Temperatur von 36°C (8, 71).

### 1.1.4 Reaktionen auf antimikrobielle Therapie

Betrachtet man die Reaktion von *E. corrodens* auf Antibiotika, so findet man in der Literatur verschiedene Aussagen. Empfindlich zeigt es sich fast immer auf PenicillinG (8, 46, 80), Ampicillin (2, 8, 46) und Ciprofloxacin (2, 80, 99), aber auch auf Amoxicillin, Cefotaxim, Cefoxitin, Imipenem (2, 80) und Tetracyclin (2, 8). Einheitlich resistent zeigt es sich gegenüber Clindamycin (8, 46, 80, 82, 99). Es wurden jedoch auch Resistenzbildungen gegen Metronidazol, Cephalothin, Cefuroxim (80) und Doxycyclin (26) geschildert.

Bei einigen Isolaten konnte eine Beta-Lactamase-Aktivität nachgewiesen werden (2, 53, 97). Diese zeigten sich folglich resistent gegen PenicillinG, Amoxicillin und Ampicillin, reagierten aber empfindlich auf Amoxicillin-Clavulanat, Cephalothin und Cephaloridin (53).

### 1.1.5 In vivo Habitate und pathogene Bedeutung

Das Vorkommen von *E. corrodens* konzentriert sich auf die Mundhöhle sowie den oberen Respirationstrakt (9, 75, 77, 93), man findet diese Spezies jedoch auch im Gastrointestinaltrakt sowie im Urogenitaltrakt (8, 15, 75). *E. corrodens* wird als Pathogen für die Parodontitis angesehen, verursacht jedoch auch extraorale Infektionen (9) wie Abszesse der Bauchhöhle, des Kopfes und des Halses, Bakteriämien, Meningitis, Endokarditis und Osteomyelitis (75, 77, 80). Fälle von Hirn-Abszessen (16, 79), pleuropulmonalen Infektionen (46) und Sinusitiden (25), bei denen *E. corrodens* isoliert werden konnte, wurden beschrieben. Oftmals liegt bei den Patienten mit oben genannten Infektionen eine vorausgehende Allgemeinerkrankung vor. Außerdem spielen für die Invasion von *E. corrodens* zusätzliche prädisponierende Faktoren wie *Streptokokken*infektionen oder polymikrobielle Infektionen eine Rolle (80). Selten wird das Bakterium als einzig auslösender Mikroorganismus einer Infektion gefunden, es konnte jedoch bei einigen Fällen von persistierenden Abszessen und Pneumonien beobachtet werden (8, 93). Besonders bei Infektionen, die aus der Besiedlung von künstlichen, intravaskulär eingebrachten Oberflächen mit *E. corrodens* als alleinigem Erreger hervorgehen, kann sich der Krankheitsverlauf als sehr langwierig gestalten (23). Ein Zusammenhang zwischen der Besiedlung der Mundhöhle mit *E. corrodens* und einer Infektion anderer Körperregionen oder Organe wird diskutiert (6, 27). So wurde zum Beispiel *E. corrodens* in Verbindung mit *Streptococcus intermedius* und *Bacteroides oralis* für die Entstehung einer bakteriellen Endokarditis verantwortlich gemacht, welche nach einer Infektion des Respirationstraktes entstanden war. Bei der Patientin wurden klinisch ein zerstörter Zahn, supragingivaler Zahnstein und eine Gingivitis festgestellt. *E. corrodens* konnte hier aus der Mundhöhle isoliert werden (6). Auch eine Arthritis im Knie, ausgelöst durch eine Mischinfektion mit *E. corrodens* und einer Streptokokkenspezies, verschlimmerte sich nach einer Zahnreinigung ohne Antibiose beträchtlich. Sieben Tage nach dem zahnärztlichen Eingriff kam es vermutlich infolge einer Bakteriämie zu einer massiven fokalen Vermehrung von *E. corrodens* im Punktatmaterial des betroffenen Knies (27).

#### 1.1.6 Nachweisverfahren

Der Nachweis von *E. corrodens* erfolgt routinemäßig durch die Amplifikation des 16S rRNA-Gens mittels der „Polymerase chain reaction“ (PCR) (4, 83). Daneben ist ein Nachweis durch einen fluoreszenzdetektierten Enzymtest unter Verwendung des Enzyms Prolin-7-amino,4-methylcumarin möglich (58). Auch die indirekte Immunfluoreszenz dient als Nachweismethode (91).

#### 1.1.7 Verwandtschaften

Ausgehend von „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology“ ist *E. corrodens* taxonomisch der Sektion 5 zugeordnet, welche sich aus fakultativ anaeroben, gramnegativen Stäbchen zusammensetzt. Weitere Familien dieser Sektion sind die *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae* und *Pasteurellaceae*. So wie *E. corrodens* finden sich Spezies wie *Calymmatobacterium granulomatis* und *Streptobacillus moniliformis* in dieser Sektion, ohne jedoch einer Familie zugeordnet zu sein (49) (Tab. 1, S. 6).

Tabelle 1: Übersicht über die taxonomische Stellung medizinisch wichtiger Bakterien modifiziert nach „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology“ unter besonderer Berücksichtigung der Sektion 5

Sektion	Beschreibung, Familie	Gattung
1	Spirochäten, gramnegative, helikale (spiralig gewundene) Bakterien	
2	Aerobe/mikroaerophile, bewegliche, helikale/vibroide (spiralig/kommaförmig gekrümmte), gramnegative Stäbchen	
4	Aerobe, gramnegative Stäbchen und Kokken	
5	Fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchen	
	<i>Enterobacteriaceae</i>  <i>Vibrionaceae</i> <i>Aeromonadaceae</i> <i>Pasteurellaceae</i> Genera ohne Zuordnung zu einer Familie	z.B. <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enterica</i>  <i>Calymmatobacterium granulomatis</i> <i>Streptobacillus moniliformis</i> <i>Cardiobacterium hominis</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Gardnerella vaginalis</i>
6	Anaerobe, gramnegative, gerade, gekrümmte und helikale (spiralige) Stäbchen	
9	Rickettsien, Bartonellen und Chlamydien	
10	Mykoplasmen	
12	Grampositive Kokken	
13	Sporenbildende, grampositive Stäbchen	
14	Regelmäßig geformte, nichtsporenbildende, grampositive Stäbchen	
15	Unregelmäßig geformte, nichtsporenbildende, grampositive Stäbchen	
16	Mykobakterien (säurefeste Stäbchen)	
17	Nokardiaforme, grampositive Stäbchen	

In einer Studie über die bakterielle Vielfalt in menschlicher subgingivaler Plaque unter Anwendung der Sequenzierung der 16S rDNA wird *E. corrodens* dem Phylum der Proteobakterien zugeordnet (67). In diesem Phylum sind auch einige Enterobakterien enthalten, *E. corrodens* zeigt hier aber eine enge Verwandtschaft mit der Familie *Neisseriaceae*, welche nach oben genannter taxonomischer Einteilung in Sektion 4: aerobe, gramnegative Stäbchen und Kokken zu finden ist.

Ein ebensolches Verwandtschaftsverhältnis zeigt sich in der Untersuchung prävalenter Bakterien mittels partieller Sequenzierung der 16S rRNA bei fortgeschrittenem Noma (Cancrum-oris) (68)

Auch stimmt die Aminosäuresequenz für die Prolin-Aminopeptidase zu 67% mit der von *Neisseria gonorrhoea* überein und hat Ähnlichkeiten mit den gleichen Enzymen der Gattung *Bacillus*, sowie mit *Lactobacillus* und *Treponema denticula*. Die Aspartase zeigt eine 87%ige Homologie zu der von *Neisseria meningitidis* und zu 69% zu der von *Escherichia coli* (77).

Gemeinsamkeiten zwischen *E. corrodens* und anderen gramnegativen Stäbchen zeigen sich zum Beispiel in einem identischen Epitop bei den Lipopolysacchariden (48). Genetische Gemeinsamkeiten zwischen *E. corrodens* und anderen korrrodierenden Bakterien konnten mit Hilfe der DNA-Hybridisierung nicht bestätigt werden (14).

#### 1.1.8 Genetische und phänotypische Heterogenität

*E. corrodens* zeigt sowohl in seinen genetischen als auch in den phänotypischen Merkmalen eine auffällige Heterogenität. Auch bei den antigenen Eigenschaften sind Unterschiede zu verzeichnen. Es sind Variabilitäten in biochemischer und serologischer Reaktivität ebenso wie phänotypische Diversitäten bei der Betrachtung der Kolonienmorphologie (siehe Einleitung, S. 1), der äußeren Membranproteine und der Lipopolysaccharide beschrieben worden (9, 10, 15). 27 Isolate von *E. corrodens* wurden im Hinblick auf das Vorhandensein unterschiedlicher Membranproteine und Lipopolysaccharide mittels der SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat)-Elektrophorese untersucht. Hierbei zeigten Isolate aus oralen Entnahmestellen durchweg verschiedene Elektrophoresemuster, wohingegen fünf von sechs extraoral entnommene Isolate identische Muster aufwiesen. Die Lipopolysaccharide aller *E. corrodens* – Isolate zeigen eine geringe molekulare Masse mit einem Aufkommen an 16 verschiedenen Phänotypen. Eine Korrelation zwischen Phänotyp und klinischer Herkunft war hierbei nicht erkennbar (13).

Ebenso ergab die Untersuchung der Proteinprofile der gesamten Zelle bei neun Isolaten mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese eine hohe Heterogenität mit neun verschiedenen Mustern, unter denen jedoch Gemeinsamkeiten verzeichnet werden konnten (94).

Auch die Spektrophotometrie an Isolaten unterschiedlicher Herkunft ließ erkennen, dass *E. corrodens* über eine hohe Heterogenität verfügt (47).

Im Hinblick auf ihre genomischen Beziehungen zueinander wurden der Typ-Stamm *E. corrodens* von Eiken 1958 (ATCC 23834 (41)) und elf in ihrer Epidemiologie verschiedene klinische Isolate untersucht. Hierzu wurden die DNA-DNA-Hybridisierung, die Bestimmung der molekularen Masse des Genoms, der prozentuale Anteil der einzelnen DNA-Basen und einige phänotypische Charakteristika zur Auswertung herangezogen. Alle Bakterienstämme zeigten eine mindestens 80%-ige Bindung bei der Hybridisierung, die chromosomale DNA zeigte mittelwertig eine Masse von  $1,7 \times 10^9$  Dalton und der gemeinsame Anteil von Guanin und Cytosin machte 55,1% aller Basen aus. Variationen traten zwischen allen zueinander in Beziehung stehenden Stämmen bezüglich der Kolonienmorphologie, der hämolytischen Aktivität auf Schafblutagar, der Reduktion von Nitrat, der Oxidation von Carbohydraten, der Lipase, der Leucin-, Valin- und Cystein-Amino-peptidase sowie der Aktivität der sauren Phosphatase auf (34).

Analysen mit Restriktionsendonukleasen zeigten durch „restriction fragment length polymorphism“ (RFLP), dass Isolate von verschiedenen Individuen üblicherweise eine genetische Heterogenität aufweisen, auch wurden genetische Unterschiede an Isolaten des gleichen Individuums festgestellt wie auch innerhalb eines Isolates (9, 12, 15). So konnten zum Beispiel bei einem an chronischer Parodontitis erkrankten Patienten sechs verschiedene Klone identifiziert werden, zwei davon innerhalb derselben parodontalen Tasche (12). Durch die „Arbitrarily-primed“(AP)-PCR konnte bewiesen werden, dass unterschiedliche Klone von *E. corrodens* im Mund einer einzigen Person vorliegen können. Darüber hinaus wurden in nur einem aus subgingivaler Plaque gewonnenen Isolat mehrere verschiedene Klone festgestellt (9). Die Klonalität von *E. corrodens* innerhalb des gleichen Patienten kann für das

Verständnis der Virulenz dieses Bakteriums von Bedeutung sein: einige Klone könnten nicht, andere hingegen stark virulent sein (9, 15).

Weitere genetische Unterschiede verschiedener *E. corrodens*-Stämme konnten mit dem Nachweisverfahren „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) aufgezeigt werden, wobei die IgG-Antikörper einer Person auf körpereigene *E. corrodens*-Stämme reagierten, nicht aber auf die verwendeten Referenzstämme. Somit lässt eine negative Immunantwort auf einen Referenzstamm nicht darauf schließen, dass keine IgG-Antikörper gegen *E. corrodens* vorhanden sind (10).

Ebenfalls untersucht wurden *E. corrodens* – Isolate gewonnen aus verschiedenen Infektionen hinsichtlich ihrer genetischen Variabilität. Eine AP-PCR mit dem ERIC1-Primer (80), welche bei allen untersuchten Isolaten (außer bei Isolaten vom gleichen Patienten) unterschiedlich ausfiel, führte zu kontroversen Diskussionen, da die Vermutung geäußert wurde, dass verschiedene Klone von *E. corrodens* auch für verschiedene Infektionen verantwortlich seien und diesen zugeordnet werden könnten (80).

## 1.2 *Eikenella corrodens* und Parodontitis

Parodontitis wird durch spezifische parodontopathogene Bakterien verursacht, die indirekt durch die provozierten Immunreaktionen als auch direkt destruktiv auf das bindegewebige Attachment und den angrenzenden Alveolarknochen wirken (73, 95, 98). Für die Diagnose Parodontitis sind Untersuchungen zur Identifizierung der wichtigsten parodontopathogenen Keime wie *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythensis*, *E. corrodens* und *T. denticula* (20, 38, 73, 86) notwendig, welche nicht nur die Identifizierung dieser Bakterien, sondern auch die Einschätzung der Krankheitsaktivität und die Überwachung der Effektivität der Parodontitistherapie erlauben (65). Pathogene sind zwar erforderlich, reichen jedoch alleine nicht aus, um eine Parodontitis



stattfinden zu lassen. Die lokalen Umweltbedingungen in der parodontalen Tasche sind bei der Regulation der Expression von Virulenzfaktoren durch pathogene Spezies von Bedeutung. So ist es Voraussetzung, dass es sich um einen virulenten Typus handelt, welcher chromosomale und extrachromosomale genetische Faktoren besitzt, um die Erkrankung zu initiieren. Auch sollte der Wirt für dieses Pathogen anfällig sein und eine ausreichende Anzahl des Pathogens muss vorliegen, um eine individuelle Schwelle für den Wirt zu übersteigen. Eine weitere Bedingung ist, dass andere Bakterienpezies den Vorgang begünstigen oder ihn zumindest nicht hemmen. Außerdem ist die Lokalisation des Pathogens am entsprechenden Ort von Bedeutung und die lokalen Umweltbedingungen sollten der Expression von speziesvirulenten Eigenschaften zuträglich sein (85). Das pathogene Potential von spezifischen Bakterien variiert zwischen Erkrankten und parodontal Gesunden und kann durch Abwehrmechanismen wie der Immunantwort des Wirtes kontrolliert werden (65). Auch Katecholamine haben in vitro Auswirkungen auf das Wachstum parodontopathogener Bakterien. So hat zum Beispiel Noradrenalin einen positiven Effekt auf das Wachstum von *E. corrodens* von +143,3%. Inhibitorische Effekte durch Noradrenalin wurden bei den Bakterien *P. gingivalis* und *T. forsythensis* beobachtet (73).

Die Bedeutung von *E. corrodens* für entzündliche Parodontalerkrankungen wird deutlich durch die Betrachtung der Prävalenz dieses Bakteriums in der subgingivalen Plaque in Verbindung mit dem Alter und der vorliegenden Parodontalerkrankung (nach alter Klassifikation) (91). Untersuchungen zeigten, dass bei 70% der Gesunden und bei 100% der Erkrankten *E. corrodens* isoliert werden konnte, wobei die hauptökologische Nische die subgingivale Plaque, bei den Erkrankten auch vermehrt die Schleimhäute (Wange, Zunge, Tonsille) zu sein scheint (11, 15). *E. corrodens* macht quantitativ insgesamt 1-2% der dortigen Bakterien aus (11). Schon seit einiger Zeit ist bekannt, dass Bakterien der subgingivalen Plaque sich in Komplexen zusammenfinden. Es wurden fünf Komplexe festgestellt, wobei *E. corrodens* im vierten (grünen) Komplex mit *Capnocytophaga*-Spezies, *Campylobacter concisus* und *A. actinomycetemcomitans* Serotyp a vergesellschaftet ist (86).

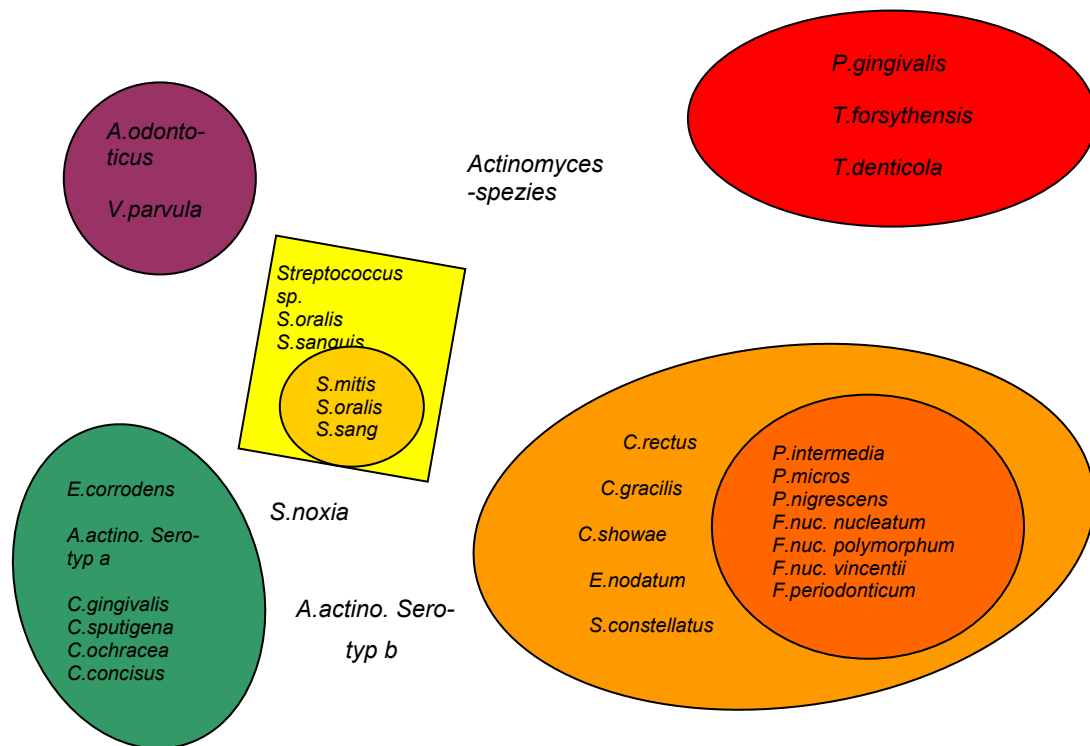


Abb. 2: „Subgingivale mikrobiologische Komplexe“ frei nach Socransky et al. (1998) (86)

Die Prävalenz von *E. corrodens* verringert sich bei gesunden Patienten mit zunehmendem Alter, verändert sich jedoch nicht bei Parodontitis-Patienten. Das höchste Aufkommen dieses Bakteriums findet man bei der „juvenilen Parodontitis“ mit 2,3+/-1,5% der Gesamtmenge aller Bakterien, es folgt die „post-juvenile“ mit 1,7+/-2,1%, die „präpubertale“ mit 1,4+/-1,1%, die „progressive“ mit 0,8+/-0,7% und die „adulte Parodontitis“ mit 0,7+/-0,6% und schließlich mit dem geringsten Anteil die Gesunden mit 0,3+/-0,3% (91). Die Gruppe der < 20-Jährigen Patienten mit Parodontitis zeigt mit 2,2+/-1,6% die größte Prävalenz von *E. corrodens*, was vermuten lässt, dass dieses Bakterium eine wichtige Rolle beim Vorkommen und der Progression der Parodontitis bei jungen Patienten spielt (24, 91, 92).

Von Bedeutung für die Ätiologie entzündlicher parodontologischer Erkrankungen kann eventuell die in *E. corrodens* enthaltene Lysin-Decarboxylase sein, welche eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von

Zellen bei Säugetieren besitzt (55). Auch der Nitratmetabolismus der Spezies spielt möglicherweise eine Rolle für die Pathogenese der Parodontitis. Durch die Metabolisierung von Prolin, welches in Kollagen, in Regionen von Immunglobulinen und in bestimmten Ergänzungsproteinen des oralen Milieus reichlich enthalten ist, resultiert eine ausgeprägte Nitratsynthese. Die Aktivität der Aminopeptidase für Prolin kann somit für das Überleben der Zelle entscheidend sein, bedingt durch ihre Rolle in der Energieproduktion, der Modifikation der lokalen Umgebung und dem Schutz gegen die Abwehrmechanismen des Wirts (77).

### 1.3 Bisherige Subdifferenzierungsversuche

Auch wenn in einigen früheren Studien durch die Anwendung konventioneller Phänotypisierungs- und DNA-Hybridisierungs-Verfahren als Ergebnisse die Aussage erzielt wurde, dass *E. corrodens* eine homogene Spezies darstelle (19, 34), gingen jedoch einige Forscher im Hinblick auf die Nitratreduktion, der Aminopeptidase- und Lipaseproduktion sowie der Koloniemorphologie von einer phänotypischen Heterogenität aus (13). Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Isolate im Profil ihrer äußeren Membranproteine, den Mustern der Lipopolysaccharide (13) und der Serologie (10) differieren. Schon in früheren Jahren wurden in dem Bestreben, Subdifferenzierungsmethoden für *E. corrodens* zu etablieren, verschiedene klassische Verfahren der epidemiologischen Typisierung angewandt. Hierzu gehören die Sero- und Biotypisierung. 1974 konnten aufgrund von unterschiedlichen Oberflächenantigenen ein serologisches Typisierungsschema etabliert werden. *E. corrodens* kann hiermit in sechs Serovare unterteilt werden. Der Wert der Serotypisierung ist allerdings eingeschränkt, da ungefähr 20% der Stämme eine Spontanagglutination zeigen und zudem nach Subkultivierung ein Wechsel des Serovars beobachtet wurde (76). Wie bei anderen häufigen Bewohnern der Mundhöhle ist auch der Vergleich von Antibioogrammen verschiedener *E.*

*corrodens*-Isolate nur von geringerer Aussagekraft, da die Resistenzmuster von Stämmen dieser Spezies im wesentlichen identisch sind (32). Weitere Typisierungsverfahren für *E. corrodens* konnten durch den Einsatz der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen und Lipopolysacchariden der äußeren Membran etabliert werden (94). Beim Vergleich der Elektrophorese-Muster zeigten Stämme, die nicht aus der gleichen Infektionsquelle stammten, eine erhebliche Variabilität im Protein- und Lipopolysaccharid-Profil (13, 48, 59, 69, 94).

Die genetische Heterogenität von menschlichen *E. corrodens*-Isolaten konnte durch die Anwendung der DNA-Hybridisierung (14), von Analysen mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen (12), von Makrorestriktions-enzymanalyse genomischer DNA durch die Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (89) und mit der „random primed“ PCR (9, 80) in jüngerer Zeit deutlich gemacht werden. Eine eindeutige und reproduzierbare Methode zur Subtypisierung von *E. corrodens* steht jedoch bisher noch aus.

## 1.4 Anwendung des ERIC2-Primers und der Sequenzierung

### 1.4.1 ERIC-PCR

Die ERIC- („Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus“) Sequenz ist eine generationsübergreifende konstante Sequenz, welche in den intergenetischen Regionen der Chromosomen von *Enterobakterien*, *Neisserien* und anderen Bakterien vorkommt (21, 42, 45, 78, 100). Die einzelnen Einheiten weisen eine Länge von 124-127 Nukleotiden auf und liegen auf einem Chromosom in variabler Häufigkeit vor (42, 78, 100). ERIC-Sequenzen sind in ihrer Nukleotid-Sequenz in hohem Maße identisch, jedoch ist die Lokalisation innerhalb des Chromosoms in verschiedenen Spezies variabel (42). Als weiteres Beispiel der repetitiven Sequenzen sei hier die REP- („Repetitive extragenic palindromic“) Sequenz genannt, von der 500-1000 Kopien auf den Chromosomen von Bakterien vorkommen können (78). Die Verteilung und evolutionäre Beständigkeit der ERIC- und REP-Sequenzen wurden mit zu den Sequenzen passenden und aus Eubakterien gewonnenen Oligonukleotiden mittels der PCR und der „Slot blot hybridization“ getestet (100). Beide Oligonukleotide produzieren in der Elektrophorese klar differenzierbare Banden und sorgen somit für eindeutige DNA-Fingerabdrücke bei verschiedenen eubakteriellen Spezies und Stämmen. Bevorzugt hybridisieren die REP- und ERIC-Oligonukleotide mit der DNA von gram-negativen Enterobakterien und verwandten Spezies (100). Bei der ERIC-PCR werden die Distanzen zwischen den einzelnen ERIC-Sequenzen aufgedeckt, die spezifisch für die Bakterienspezies oder einen einzelnen Stamm sein können (100). Hierfür werden spezifische Primer verwendet, welche auf das Zentrum der ERIC-Sequenz abgestimmt sind (74, 100). Weitere Untersuchungen mit den ERIC-Primern zeigten, dass jeder Stamm ein spezifisches Muster aufweisen kann und diese Muster durchaus mit zuvor aufgestellten Stammbäumen vergleichbar sind (21). Diese Methode zeichnet sich des Weiteren durch die Fähigkeit aus, sowohl Homologien als auch Differenzen zwischen einzelnen Isolaten darzustellen (17). Die ERIC-PCR eignet sich also zur Identifikation und Klassifikation von Bakterien, wenngleich auch bei einigen Bakterien, wie zum

Beispiel *Pseudomonaden*, die Vielfältigkeit der entstehenden Muster eine Unterteilung in Stämme unmöglich macht (21). Eine Typisierung beziehungsweise Subspezifizierung durch die ERIC-PCR wurde bisher bei *Acinetobacter baumannii* (17), *Enterobacter aerogenes* (22), *E. coli* (30, 44), *Pseudomonas aeruginosa* (72), *Rhizobium-meliloti*-Stämmen (21), *Salmonellen* (74) wie *Salmonella enterica* (45, 52) und *Salmonella enteritidis* (56), *Staphylococcus aureus* (50), *Stemphylium solani* (62), *Xylella fastidios* (61) und *Yersinia ruckeri* (57) erfolgreich durchgeführt.

#### 1.4.2 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung wird die Basenfolge eines bestimmten DNA-Abschnittes mittels der Didesoxymethode nach Sanger bestimmt (64). Als Nachweisverfahren dient die Kapillarelektrophorese (64, 84). Hier findet der „310 Genetic Analyzer“ Anwendung, der durch eine ABI-Prism<sup>TM</sup>-Vielfarbfluoreszenzmarkierung und eine Kapillarelektrophorese mit einem Trennmedium (Genscan<sup>TM</sup>-Polymer) automatisch Größe, Sequenz und Menge der Nukleinsäure bestimmt (64). Die Auftrennung der Reaktionsprodukte nach ihrer Größe ergibt somit eine „Signalleiter“, aus der man die ursprüngliche Nukleotidsequenz direkt ablesen kann (51, 84).

Für die Klassifikation von Bakterien wird insbesondere die Sequenz der 16S rRNA und der 23S rRNA verwendet (66, 54, 39), da diese Gene in eher geringem Maße evolutionären Veränderungen unterworfen sein sollen (66). Erfolgreich konnte mit diesem Verfahren bereits zum Beispiel die phylogenetische Struktur der Subgruppe *Bacteroides* des *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides*-Stammes dargestellt werden, welche durch die Sequenzierung der 16S rRNA in die drei Hauptgruppen *Prevotella*, *Bacteroides* und *Porphyromonas* eingeteilt werden konnte. Die ermittelten Daten stimmten mit früheren Klassifikationen der *Bacteroides*gruppe überein (66).

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen bei 69 Isolaten der Spezies *E. corrodens* die ERIC2-PCR und die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens durchgeführt werden. Die Ergebnisse beider Untersuchungsverfahren sollen zunächst getrennt voneinander hinsichtlich der Fragmentgröße- und Anzahl bzw. der Nukleotidabfolge verglichen werden. Ziel hierbei ist es, Aussagen zum Ausmaß der genotypischen Variabilität zu erzielen, darüber hinaus ist im Idealfall bei beiden Verfahren eine Zusammenfassung einzelner Isolate zu Untergruppen und so die Erstellung eines Stammbaumes möglich.

Die bei beiden Techniken entstandenen Untergruppen bzw. Cluster werden dann wiederum einander gegenübergestellt und auf Übereinstimmungen untersucht.

Des Weiteren soll die Praktikabilität der Verfahren für Verwandtschaftsanalysen von *E. corrodens* – Isolaten beurteilt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Klinische Isolate

Die insgesamt 69 verwendeten Isolate der Spezies *E. corrodens* stammen von 52 unterschiedlichen Patienten, welche an intraoralen Infektionen wie Parodontitis, Tonsillitis oder an extraoralen Infektionen wie Sinusitis, Lungenabszess, Sepsis oder Osteomyelitis erkrankt waren. Die Isolate stammen aus Proben, welche den entsprechenden Infektionsherden entnommen wurden, die genaue Herkunft jedes einzelnen Isolates ist in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt. Des Weiteren sind die Isolate in ihrer Wachstumsform zu unterscheiden. Der Wachstumstyp (korrodierend = k. und nicht korrodierend = n.k.) geht ebenfalls aus den genannten Tabellen hervor. Bis zu Ihrer Untersuchung wurden alle Proben in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Tabelle 2: Verwendete Isolate aus der Sammlung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (k. = korrodierend, n.k. = nicht korrodierend)

lfd. Nr.	Isolat	Herkunft	Wachstum
245	Ec 40	Blutkultur	k.
248	Ec 30	Blutkultur	k.
234	Ec 12	Osteomyelitis	k.
233	Ec 13	Lungenabszess	k.
265	Ec 47	Lungenabszess	k.
228	Ec 11	Sinus maxillaris	k.
225	Ec 2	Tonsillen	k.
226	Ec 18	Tonsillen	k.
227	Ec 5	Tonsillen	k.
229	Ec 24	Tonsillen	k.
230	Ec 22	Tonsillen	k.
231	Ec 4	Tonsillen	k.
232	Ec 16	Tonsillen	k.



lfd. Nr.	Isolat	Herkunft	Wachstum
235	Ec 23	Tonsillen	k.
237	Ec 37	Tonsillen	k.
238	Ec 38	Tonsillen	k.
239	Ec 32	Tonsillen	k.
240	Ec 36	Tonsillen	k.
241	Ec 31	Tonsillen	k.
242	Ec 41c	Tonsillen	k.
243	Ec 35	Tonsillen	k.
244	Ec 27	Tonsillen	k.
246	Ec 29	Tonsillen	k.
249	Ec 16 k.	Tonsillen	k.
250	Ec 16 n.k.	Tonsillen	n.k.
251	Ec 18 n.k.	Tonsillen	n.k.
252	Ec 18 k.	Tonsillen	k.
264	Ec 28	Tonsillen	k.
266	Ec 52	Tonsillen	k.
236	Ec 10	subgingivale Plaque	k.
254	FR 010-16-3	subgingivale Plaque	k.
255	FR 010-46-14	subgingivale Plaque	k.
256	FR 011-13-11	subgingivale Plaque	k.
257	FR 023-22-7	subgingivale Plaque	k.
258	FR 023-16-3	subgingivale Plaque	k.
259	FR 025-16-3	subgingivale Plaque	k.
260	FR 028-46-3b	subgingivale Plaque	k.
261	FR 028-46-300	subgingivale Plaque	k.
262	FR 030-16-3	subgingivale Plaque	k.
263	Ec 506	subgingivale Plaque	k.
267	02291/1a	subgingivale Plaque	k.
268	02291/2	subgingivale Plaque	k.
269	0058-96	subgingivale Plaque	k.
270	00222/96	subgingivale Plaque	k.

Tabelle 3: Verwendete Isolate aus der Sammlung der Abteilung für Parodontologie der ZMK-Klinik der Universität Münster (k. = korrodierend, n.k. = nicht korrodierend)

lfd. Nr.	Isolat	Herkunft	Wachstum
1	Ec 1a	subgingivale Plaque	k.
2	Ec 1b	subgingivale Plaque	k.
3	Ec 1c	subgingivale Plaque	k.
4	Ec 2a	subgingivale Plaque	k.
5	Ec 2b	subgingivale Plaque	n.k.
6	Ec 2c	subgingivale Plaque	k.
7	Ec 2d	subgingivale Plaque	k.
9	Ec 3a	subgingivale Plaque	k.
10	Ec 3b	subgingivale Plaque	k.
11	Ec 3c	subgingivale Plaque	k.
12	Ec 4a	subgingivale Plaque	k.
13	Ec 5a	subgingivale Plaque	n.k.
14	Ec 5b	subgingivale Plaque	n.k.
15	Ec 6a	subgingivale Plaque	n.k.
16	Ec 7a	subgingivale Plaque	k.
17	Ec 8a	subgingivale Plaque	k.
19	Ec 9a	subgingivale Plaque	k.
20	Ec 10a	subgingivale Plaque	n.k.
21	Ec 10b	subgingivale Plaque	n.k.
22	Ec 11a	subgingivale Plaque	n.k.
23	Ec 12a	subgingivale Plaque	k.
24	Ec 12b	subgingivale Plaque	k.
25	Ec 13a	subgingivale Plaque	n.k.
26	Ec 14a	subgingivale Plaque	n.k.
30	Ec 15a	subgingivale Plaque	n.k.

Als Referenzprobe für alle PCR's wurde der Typstamm Ec-BCMG-232 verwendet. Bei der Sequenzierung diente die Sequenz mit der Accession Nr. AF320620 (31) mit 1476 bp als Referenz.

## 2.2 Kultivierung von *Eikenella corrodens*

Zur Gewinnung von Kulturen wurden Nähragarplatten in Form eines Drei-Ösen-Ausstriches mit den einzelnen Isolaten beimpft. Hierzu wurde CDC-Blut-Agar verwendet, welcher sich wie folgt zusammensetzt:

Caseinpepton	15,0 g
Pepton aus Sojamehl	5,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
L – Cystein	0,5 g
Agar-Agar	16,0 g
Hemin – Stammlösung	10,0 ml
Vit. K1 Stammlösung	1,0 ml
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml

Die Bestandteile wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 48°C wurde 50ml Schafblut hinzugefügt und der Nährboden in Mengen von ca. 20ml in Petrischalen gegossen.

Die beimpften Nährböden wurden zur Anzucht der Kulturen unter anaeroben Bedingungen mit der Zugabe eines Päckchens Anaerokult®A (Merck) und eines Anaerotest (Merck) für sieben Tage im Brutschrank bei 37°C (Heraeus VT 5042 EK/N2®, Hanau) gelagert.

Es erfolgte daraufhin bei allen Kulturen mittels Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) die Überprüfung auf das tatsächliche Vorliegen der Spezies *E. corrodens* sowie auf die Reinheit der Kultur. Konnte beides bestätigt werden, wurde die gesamte Kultur mit Hilfe eines Watteträgers vom Nährboden abgenommen und in 400µl bidestilliertem und sterilem Wasser ausgewaschen, so dass aus dieser Suspension die DNA-Isolierung erfolgen konnte.

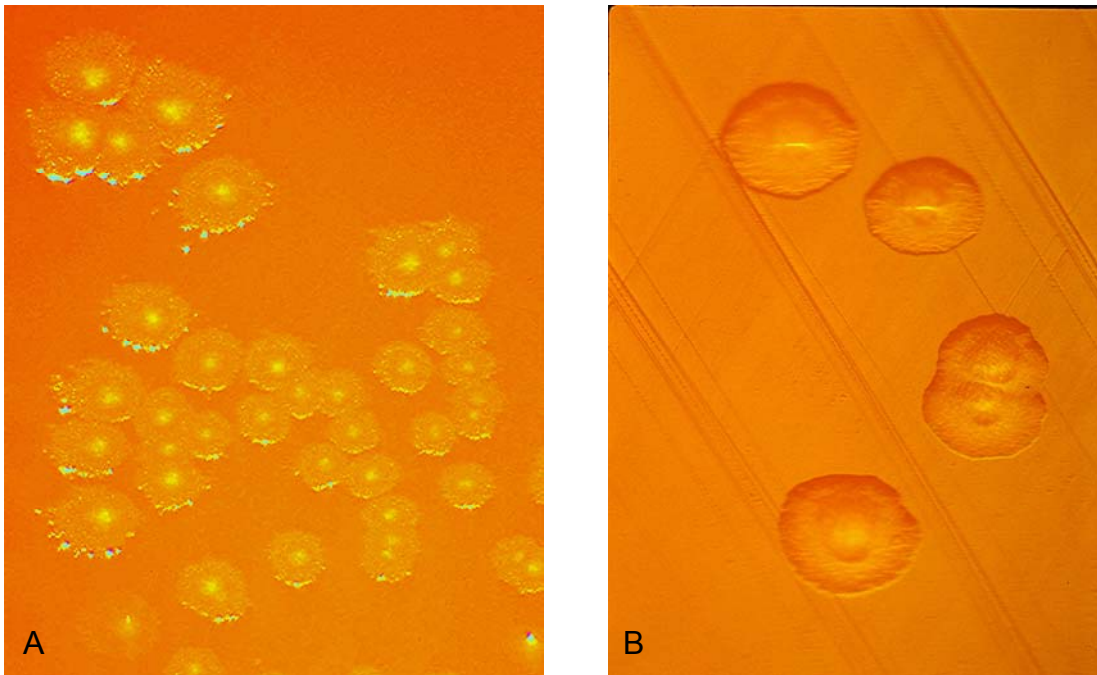


Abb. 3: Bilder einer Kultur von *E. corrodens*  
A: 12fache Vergrößerung, B: 23fache Vergrößerung

### 2.3 Isolierung der DNA

Bei allen Isolatn wurde die DNA-Isolierung mit Hilfe des:

Invisorb®Spin Blood Mini Kits, Invitex, Berlin

gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Hierbei wurde die Bakteriensuspension auf ein Filtersystem gegeben und zentrifugiert, wobei die DNA im Filter gebunden wurde. Mit verschiedenen Puffern wurden mögliche andere im Filter verbliebene Rückstände ausgewaschen. Nach erfolgter Reinigung wurde die gebundene DNA mit einer speziellen Pufferlösung aus dem Filtersystem gelöst. Die so isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 2.4 Nachweis von *Eikenella corrodens*

Die DNA der Isolate wurde zunächst durch eine PCR auf das Vorliegen von *E. corrodens* überprüft. Für diesen Nachweis wurde ein 688-bp großes Segment aus dem 16S rRNA-Gen amplifiziert, da dieses Gen bei bisher allen getesteten Isolaten vorlag (4). Dies geschah unter Verwendung der Primer:

Ec-1: 5`-CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA G-3`

Ec-2: 5`-CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C-3` (Ashimoto1996)

Durchführung: Ein PCR-Ansatz mit dem Gesamtvolumen von 25µl enthielt 3µl der isolierten DNA, 2µl PCR-Puffer (10xTaq Puffer mit 15mM Mg<sup>2+</sup>) (Eppendorf, Hamburg), 100µM Desoxynucleosid-triphosphate (dNTP's) (Invitek, Berlin), jeweils 0,375pM der Primer Ec-1 und Ec-2 (MWG, Ebersberg) und 1U Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg) aufgefüllt auf das Gesamtvolumen mit sterilem bidestilliertem Wasser.

Die „Polymerase chain reaction“ (PCR) wurde im Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt:

Denaturierung		94°C	3min	
Zyklus	D	95°C	30s	
	A	60°C	60s	
	E	72°C	2min	35 Zyklen
Elongation		72°C	4,5min	

Als Positivprobe wurde die DNA des Typstammes Ec-BCMG-232, als Negativprobe steriles Wasser verwendet.

Ein Agarosegel (1,8%) (SeaKem®LE agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) mit 1xTBE-Puffer) wurde mit 18µl von jedem PCR-Produkt, jeweils vermischt mit 3,5µl Gel-Loading-Puffer (Sigma, Deisenhofen), sowie einer 1Kb-DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) als Marker beladen und die PCR-Produkte

elektrophoretisch aufgetrennt (150V, 90min) (Agarosegelelektrophorese-Einheit, Bio-Rad SUB-CELL®GT, München). Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (1µg/ml) eingefärbt, so dass die Banden unter UV-Licht visualisiert werden konnten (Transilluminator UV-Tisch, Typ BIL200M, Bachofer, Reutlingen).

## 2.5 Polymerasekettenreaktion mit dem Primer ERIC2

Bei allen Isolaten wurde nun eine PCR mit dem 6-FAM-markierten Primer ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') (100, 101) durchgeführt. Um die optimalen Bedingungen für den verwendeten Primer festzulegen, wurden die einzelnen PCR-Parameter wie Annealing-Temperatur und Stoffkonzentrationen von MgCl<sub>2</sub>, Primer und dNTP's im PCR-Ansatz variiert (siehe S. 28-30). Der endgültige PCR-Ansatz mit dem Gesamtvolumen von 50µl setzte sich daraufhin wie folgt zusammen:

3µl DNA, 5µl PCR Puffer (10 x NH<sub>4</sub> PCR Puffer, Invitek), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2pM Primer, 200µM dNTP's und 2U Taq-Polymerase wurden mit sterilem H<sub>2</sub>O auf das Gesamtvolumen aufgefüllt.

Die PCR wurde im Thermocycler (Mastercycler gradient) unter Verwendung des folgenden Programmes durchgeführt:

<u>Denaturierung</u>		94°C	3min	
Zyklus	D	95°C	30s	
	A	50°C	60s	
	E	72°C	2min	<u>35 Zyklen</u>
Elongation		72°C	4,5min	

## 2.6 Auftrennung der PCR-Produkte

### 2.6.1 Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Jeweils 25µl der PCR-Produkte einiger Isolate wurden mit 4µl Gel-Loading-Puffer vermischt und in die Kammern eines 1,8%igen Agarosegels geladen, als Marker diente die 1Kb-DNA-Leiter. Bei 150V wurden die Produkte über 150min elektrophoretisch aufgetrennt und die entstandenen Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### 2.6.2 Darstellung der PCR-Produkte durch die Kapillarelektrophorese

Um eine genaue Angabe der Größe der durch die PCR entstandenen DNA-Fragmente zu erhalten, wurden die PCR-Produkte aller Isolate im Sequenzierer (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer) aufgetrennt. Als Probenansatz wurde hierfür jeweils 1µl PCR-Produkt mit 1µl internem Größen-Standard GS 2500 Rox (Applied Biosystems) gemischt und in 15µl Formamid suspendiert. Jede Probe wurde daraufhin für 5min bei 95°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die aufgetauten Proben wurden im ABI 310 mit dem Gel POP4 geladen, als Laufparameter wurden Filter Set A, eine Kapillarlänge von 40cm und eine Laufzeit von 45min eingestellt.

Die Ergebnisse wurden mit der Software GENESCAN 2.1 (Applied Biosystems) analysiert und so die einzelnen Fragmente im Vergleich zum verwendeten Standard in ihrer genauen bp (Basenpaar)-Größe berechnet.

## 2.7 Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen der einzelnen Isolate anhand der erhaltenen DNA-Fragmente

Durch die Kapillarelektrophorese erfolgte eine präzise Angabe der genauen Größen einzelner Fragmente sowie der Anzahl der Fragmente innerhalb eines PCR-Produkt-Gemisches. Somit konnten aus den Parametern Fragmentgröße

und Fragmentanzahl verwandtschaftliche Beziehungen der einzelnen Isolate errechnet werden. Folgende Vorgehensweise wurde hierbei angewandt:

Alle Isolate wurden zunächst hinsichtlich gleicher Fragmentgrößen untersucht. Stimmt eine oder mehrere Größen einzelner Fragmente in zwei oder mehr Isolaten überein, wurde die Fragmentanzahl der Isolate hinzugezogen. Das Isolat, welches die meisten Fragmente aufwies, wurde gleich 100% gesetzt und anhand der übereinstimmenden Fragmentanzahl mit anderen Isolaten der prozentuale Verwandtschaftsgrad errechnet. Verwandte Isolate wurden nach dem ersten Berechnungsvorgang zu einem „fiktiven Isolat“ zusammengefasst und konnten somit aufs neue mit den verbleibenden Isolaten verglichen werden, woraus sich wiederum ein Stammbaum ableiten ließ.

Berücksichtigt werden musste die Möglichkeit, dass zum Beispiel ein Isolat A Fragmente gleicher Größe wie Isolat B sowie andere Fragmente gleicher Größe wie Isolat C aufweisen könnte. Die Isolate B und C würden dagegen keine Übereinstimmungen aufweisen. Sollte dieses Problem auftreten, würden die Isolate mit der höchsten übereinstimmenden Fragmentanzahl als am nächsten verwandt bezeichnet werden.

Um zu überprüfen, ob die aus subgingivaler Plaque stammenden Isolate für sich betrachtet andere oder eventuell deutlichere Homologien zeigten, als im Verbund mit allen anderen Isolaten, wurde für diese nochmals ein gesonderter Stammbaum errechnet.

## 2.8 Sequenzierung des 16S rRNA-Gens

Zur direkten Sequenzierung wurde mit der isolierten DNA aller Proben zunächst eine PCR mit den Primern Ec-IgF (5'-ACA TGC AAG TCG AAC GGC AG-3') und Ec-IgR (5'-ACA TCT CAC GAC ACG AGC TG-3') durchgeführt. Ein PCR-Ansatz mit dem Gesamtvolumen von 50µl enthielt 100ng DNA, 5µl PCR-Puffer (10 x Taq Buffer mit 15mM Mg<sup>2+</sup>), 0,75pM eines jeden Primers, 200µM dNTP's,



1,5mM MgCl<sub>2</sub> und 2,0U Taq-Polymerase. Das verwendete Cyclor-Programm lautet:

<u>Denaturierung</u>		94°C	3min	
Zyklus	D	93°C	30s	
	A	55°C	30s	
	E	72°C	45s	30 Zyklen
<u>Elongation</u>		72°C	4,5min	

Mit Hilfe der Exonuklease I und „Shrimp Alkaline Phosphatase“ wurden die entstandenen PCR-Produkte gereinigt und daraufhin sofort mit Hilfe des Sequenzierungs-Kits ABI BigDye Terminator v3.0 cycle (Applied Biosystems) in einem Gesamtvolumen von 20µl direkt sequenziert. Die hierzu verwendeten Primer sind jeweils 0,5pM von Ec1 (5'-CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA G-3') oder Ec-2 (5'-CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C-3'). Nach der Sequenzierung wurde das Produkt zur Reinigung mit Ethanol gefällt. Der 20µl-Ansatz wurde mit 14,5µl sterilem Wasser, 3µl 3M Natriumacetat und 62,5µl 100%igem Ethanol vermischt und bei Raumtemperatur 15min inkubiert. Nach dem Zentrifugieren bei 13000rpm für 20min wurde der Überstand entfernt, die Probe mit 250µl 70%igem Ethanol gewaschen und abermals bei 13000rpm für 5min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde wieder entfernt und das verbliebene Pellet zunächst luftgetrocknet. Im trockenen Zustand wurde es dann in 20µl Formamid gelöst und in den ABI 310 geladen. Die Sequenzen wurden mit Pop6, einer 60cm langen Kapillare und einer Laufzeit von 120min elektrophoretisch aufgetrennt.

Die vom Sequenzierer erstellten Sequenzen wurden mit dem Programm „Chromas“ editiert. Daraufhin erfolgte ein Vergleich der sequenzierten Produkte untereinander sowie mit der Literatursequenz AF320620 (31) des 16S rRNA-Gens über das Programm „NCBI, Blast“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), so dass Variationen in der Nukleotidabfolge des Gens sichtbar werden konnten. Der zum Vergleich herangezogene Ausschnitt reicht von der Position 64bp bis

zur Position 1428bp der rRNA. Als weiterer Literaturwert wurde die Sequenz AY 286546 (40) zum Vergleich genutzt.

Die ermittelten Sequenzen wurden über das Programm „ClustalW“ (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) geordnet, ebenso konnte hiermit ein Stammbaum errechnet werden. Das verwendete Programm arbeitet nach der hierarchischen Methode als heuristischer Algorithmus für multiples Sequenzalignment. Hierbei werden zunächst paarweise die DNA-Sequenzen mit der geringsten genetischen Distanz ausgewählt und zu einem Ast eines zunächst „sternförmigen Baumes“ vereinigt. Die genetischen Distanzen der Sequenzen werden nun wieder neu berechnet und die nächstverwandten zu einem Ast mit zwei Taxa zusammengefügt. Dies erfolgt solange, bis alle Taxa in den Baum eingefügt wurden und die Sternstruktur des Baumes völlig aufgelöst wurde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ermittlung einzelner Parameter für die ERIC-PCR

Um optimale Bedingungen für den verwendeten Primer zu schaffen, wurden PCR-Parameter wie die Annealing-Temperatur sowie die Stoffkonzentrationen von  $MgCl_2$ , Primer und dNTP's im PCR-Ansatz variiert. Zur Festlegung der effektivsten Annealing-Temperatur wurde eine Gradienten-PCR mit folgendem Ansatz durchgeführt: 100ng DNA, 5 $\mu$ l PCR Puffer (10 x  $NH_4$  PCR Puffer), 2,5mM  $MgCl_2$ , 1,2pM Primer, 200 $\mu$ M dNTP's und 2U Taq-Polymerase aufgefüllt mit sterilem  $H_2O$  auf ein Gesamtvolumen von 50 $\mu$ l. Der Thermocycler wurde für zwölf Proben des selben Isolates mit einem Gradient von 53°C über 5°C programmiert, so dass jede Probe bei einer anderen Annealing-Temperatur (beginnend bei 48,0°C und endend bei 58,4°C) über 35 Zyklen amplifiziert wurde. In einem 2%igem Agarosegel wurden die PCR-Produkte bei 150V über 100min aufgetrennt und die entstandenen Banden mittels UV-Licht visualisiert. Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt.

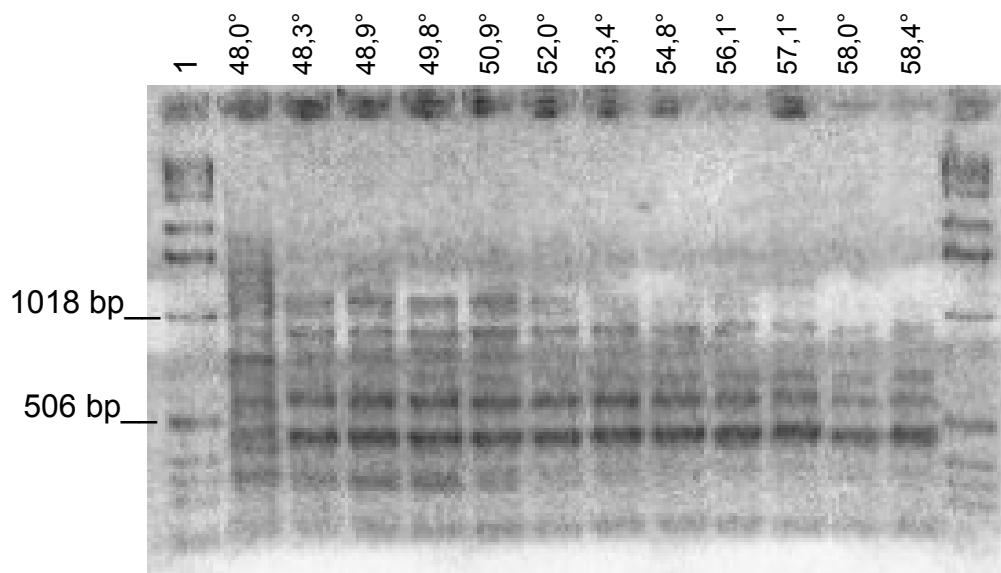


Abb. 4: Gradienten PCR mit dem Primer ERIC2 zur Optimierung der Annealing-Temperatur; Spur 1 zeigt die Kb-Leiter, die weiteren Spuren sind mit der jeweiligen Annealing-Temperatur in [°C] gekennzeichnet

Bei den Temperaturen 48,9°C, 49,8°C und 50,9°C war die Darstellung der entstandenen Fragmente am intensivsten, so dass für die folgenden Versuche eine Annealing-Temperatur von 50°C festgelegt wurde.

Folgend wurden die Konzentrationen von MgCl<sub>2</sub>, Primer und dNTP's variiert, um eine Optimierung des PCR-Ansatzes zu erzielen. Von den Isolaten 1-3 wurde jeweils ein PCR-Ansatz mit einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von (a) 3mM und (b) 4mM versehen. Außerdem wurde die Amplifizierung des Isolates 4 mit einer Primerkonzentration von 4a: 0,6pM, 4b: 1,2pM und 4c: 2,4 pM durchgeführt. Ebenso wurde die Konzentration der dNTP's bei dem Isolat 4 mit 4d: 100µM, 4e: 200µM und 4f: 400µM variiert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 2%igem Agarosegel bei 150V über 120min. Das Ergebnis ist in Abb. 5 dargestellt.

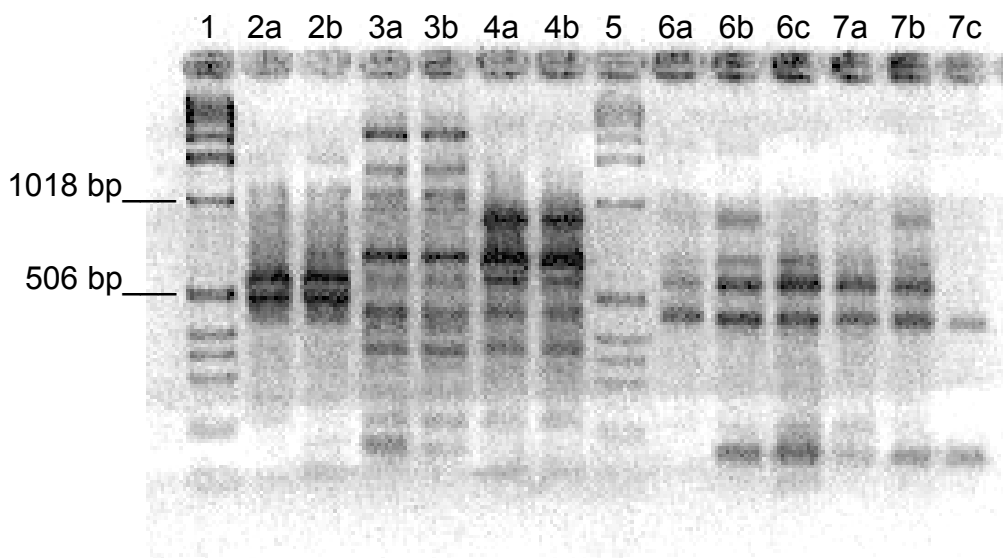


Abb. 5: PCR zur Ermittlung optimaler chemischer PCR-Parameter; die Spuren 1 und 5 zeigen jeweils die Kb-Leiter, bei den Spuren 2-4 wurde jeweils eine MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von a: 3mM und b: 4mM verwendet, die Spuren 6 zeigen variable Primerkonzentrationen von a: 0,6pM, b: 1,2pM und c: 2,4pM, die Spuren 7 wiederum variieren in der Konzentration der dNTP's wie folgt: a: 100µM, b: 200µM, c: 400µM

Zwischen den MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen von 3mM bzw. 4mM ist kein wesentlicher Unterschied sichtbar, jedoch ist bei beiden Konzentrationen die Intensität bzw.

die Menge der einzelnen PCR-Produkte größer als bei einer  $MgCl_2$ -Konzentration von 2,5mM, welche bei den restlichen Versuchsansätzen verwendet wurde. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche die  $MgCl_2$ -Konzentration auf 3mM festgelegt.

Die Konzentration des Primers mit 1,2pM und die Konzentration der dNTP's mit 200µM führten zu den deutlichsten Darstellungen. Beide Reagenzien wurden deshalb in den zuletzt genannten Konzentrationen für die weiteren PCR-Ansätze verwendet.

### 3.2 Elektrophorese der ERIC2-PCR-Produkte

Zum Vergleich wurden einige PCR-Produkte sowohl im Agarosegel als auch mit der Kapillarelektrophorese im ABI 310 aufgetrennt. In Abbildung 6 (S. 31) sind Beispiele der im Agarosegel aufgetrennten Banden zu betrachten. Des Weiteren werden in Tabelle 4 (S. 34-36) die genauen Basenpaargrößen der DNA-Fragmente jedes einzelnen Isolates, die nach der Kapillarelektrophorese durch die Software „GENESCAN 2.1“ ermittelt werden konnten, tabellarisch dargestellt.

#### 3.2.1 Auftrennung im Agarosegel

Anhand der Darstellung der aufgetrennten PCR-Produkte mittels der Agarosegelelektrophorese (Abb. 6, S. 31) werden sowohl Differenzen als auch Homologien zwischen den einzelnen Isolaten erkennbar. Diese ergeben sich jeweils aus der Anzahl der DNA-Fragmente und deren Fragmentgrößen. So stellen sich zum Beispiel bei den Isolaten 1, 2 und 3 drei exakt identische Banden dar, eine ebensolche Bandenübereinstimmung findet sich bei den Isolaten 9, 10 und 11. Die Isolate 4, 5 und 6 zeigen zwei übereinstimmende Fragmentgrößen, 4 und 6 sind sogar in ihren PCR-Produkten gänzlich identisch, wohingegen das Isolat 5 weitere Fragmente aufweist.

Die Ergebnisse der PCR wurden aus diesem Grund in Verbindung mit der Herkunft der Isolate betrachtet. Die Isolate 1, 2 und 3 sowie 4, 5 und 6 und ebenso 9, 10 und 11 stammen jeweils vom selben Parodontitis-Patienten, wurden jedoch aus Plaqueproben von jeweils drei verschiedenen Stellen isoliert.

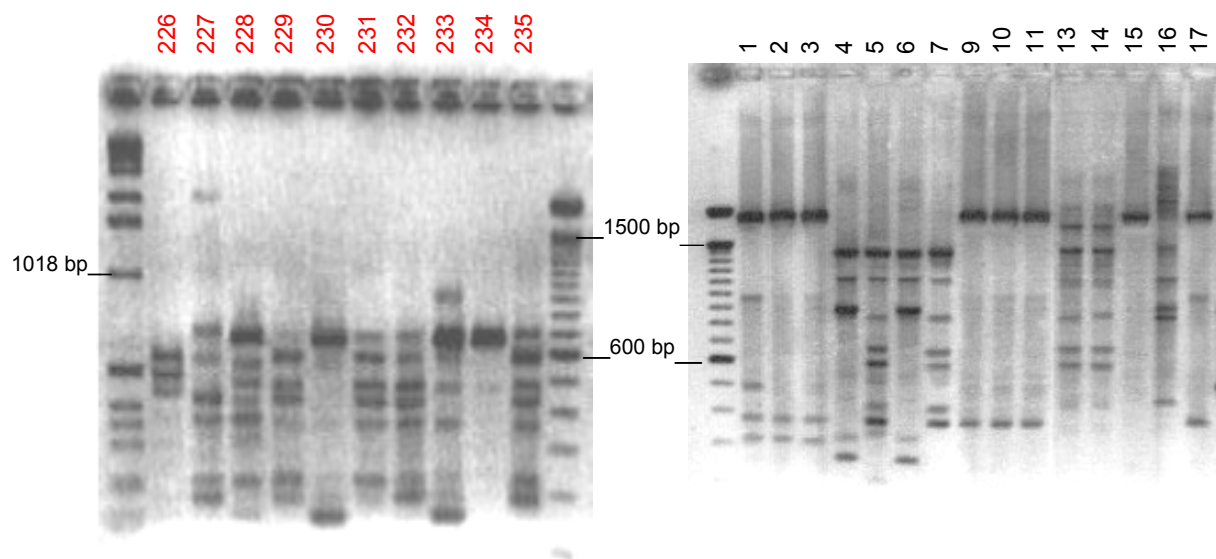


Abb. 6: Darstellung der PCR-Produkte aus der ERIC2-PCR durch die Gelelektrophorese; die nicht nummerierten Spuren zeigen jeweils Kb-Leitern, die anderen Spuren sind mit den Nummern der verwendeten Isolate gekennzeichnet  
 Rot: Isolate extraoraler Herkunft      Schwarz: Isolate aus subgingivaler Plaque

### 3.2.2 Darstellung der genauen Größe der DNA-Fragmente und Entwicklung eines daraus resultierenden Stammbaumes

Die mit Hilfe des ABI 310 erzielte genaue Aufschlüsselung der PCR-Produkte mit Angaben der Basenpaaranzahl eines jeden Fragmentes ergibt ein ähnliches Bild wie jenes, welches durch die Agarosegelelektrophorese gewonnen wurde. Einige Isolate zeigen wieder teilweise oder vollständige Übereinstimmungen der

Fragmentgrößen und der Fragmentanzahl, andere unterscheiden sich wiederum gravierend in diesen Parametern (siehe Tabelle 4, S. 34-36).

Vergleicht man diese genauen Angaben mit dem visuellen Eindruck der unter Punkt 3.2.1 (S. 30) aufgeführten Darstellung im Agarosegel, so wird deutlich, dass bei der Kapillarelektrophorese im ABI 310 sehr kleine Abweichungen bei der Größe einzelner Fragmente registriert werden können.

Durch die Auswertung der in Tabelle 4 (S. 34-36) dargestellten Fragmentgrößen der einzelnen Isolate ergibt sich eine große Anzahl differierender Isolate. Dies wird bei der Betrachtung des errechneten Stammbaumes in Abbildung 7 (S. 37) ersichtlich. Nur bei sieben Isolaten konnte eine 100%ige Homologie zu anderen Isolaten ermittelt werden, ansonsten bewegt sich der prozentuale Anteil übereinstimmender Fragmentgrößen hauptsächlich im Bereich zwischen 40-60%.

Die 69 Isolate wurden bei den Berechnungen in 14 Gruppen zusammengefasst. Hierbei fällt auf, dass nicht einmal eine in allen Isolaten vorkommende Fragmentgröße erkannt wurde, woraus ein Zugehörigkeit der 14 Gruppen und somit aller Isolate zur Spezies *E. corrodens* auszumachen wäre. Statt dessen weist keine Gruppe mehr eine Übereinstimmung mit einer anderen auf.

Auch bei diesem Verfahren sollte die Zusammensetzung der Gruppen im Hinblick auf die Herkunft der Isolate betrachtet werden. Einige Isolate, welche vom gleichen Parodontitis-Patienten stammen, weisen auch hier wieder eine 100%ige Homologie auf, wie es bei den Isolaten [9, 10, 11], [1, 2] sowie [13, 14] zu sehen ist. Auffallend hierbei ist, das Isolat 3, welches Agarosegel 100%ige Homologie zu den Isolaten 1 und 2 zeigte, nur noch eine 87%ige Ähnlichkeit zu den anderen beiden aufweist. Des Weiteren finden sich Isolate des selben Patienten in gänzlich verschiedenen Gruppen wieder, wie dies zum Beispiel bei den Isolaten 4, 5, 6, 7 gegeben ist. Hier weisen die Isolate [4 und 6] sowie [5 und 7] eine jeweils ca. 80%ige Übereinstimmung auf und werden dann mit Isolaten anderer Patienten in zwei verschiedenen Gruppen zusammengefasst. Andere Isolate gleicher subgingivaler Herkunft wiederum zeigen nur eine niedrige prozentuale Homologie, werden aber derselben Gruppe zugeordnet (zum Beispiel Isolate 20 und 21). Auch ist es möglich, dass ein Isolat zu einem

anderen Isolat fremder Herkunft größere Ähnlichkeit aufweist, als zu einem Isolat des gleichen parodontalen Wirtes (Isolat 23, 24, 26).

Um die Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate, welche aus Plaqueproben gewonnen wurden, gesondert zu betrachten, wurde dezidiert für diese Isolate ein zweiter Stammbaum errechnet (Abb. 8, S. 38). Damit auch in der Tabelle 4 (S. 34) eine bessere Übersicht gewährleistet ist, wurden die Isolate aus Plaqueproben schwarz gedruckt, im Gegensatz zu den rot gedruckten extraoralen Isolaten. Aus der Berechnung des zweiten Stammbaumes reduzieren sich die gebildeten Hauptgruppen auf sieben, jedoch lässt sich auch hier keine einheitliche Zuordnung zur Hauptspezies erkennen. Die prozentuale Homologie der Isolate untereinander liegt hier hauptsächlich zwischen 30-60%, ein eindeutiger Unterschied zur Berechnung des ersten Stammbaumes wurde jedoch nicht erzielt.







Probennr.	230	231	232	235	237	238	239	240	241	242	243	244	246	249	250	251	252	264	266
Basenpaare																			
55																			
60																			
65																			
70																			
75																			
80																			
85																			
90																			
100																			
105																			
110																			
115																			
120																			
125																			
130																			
135																			
140																			
150																			
155																			
160																			
180																			
190																			
200																			
210																			
215																			
220																			
230																			
235																			
240																			
295																			
335																			
350																			
360																			
385																			
405																			
410																			
415																			
425																			
430																			
435																			
460																			
500																			
525																			
535																			
545																			
550																			
555																			
560																			
580																			
595																			
600																			
610																			
625																			
790																			
805																			
840																			
850																			
870																			
890																			
895																			
960																			
1030																			
1050																			
1075																			
1080																			
1165																			
1310																			
1340																			
1405																			
1610																			
1615																			
1625																			
1650																			
1710																			
1860																			
1900																			
1955																			

Abb. 7: Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen aller Isolate nach der ERIC2-PCR  
 (Schwarz: Isolate aus subgingivaler Plaque, Rot: Isolate extraoraler Herkunft,  
 A-N: 14 Hauptgruppen, Maßstab: prozentuale Übereinstimmung der Fragmente)

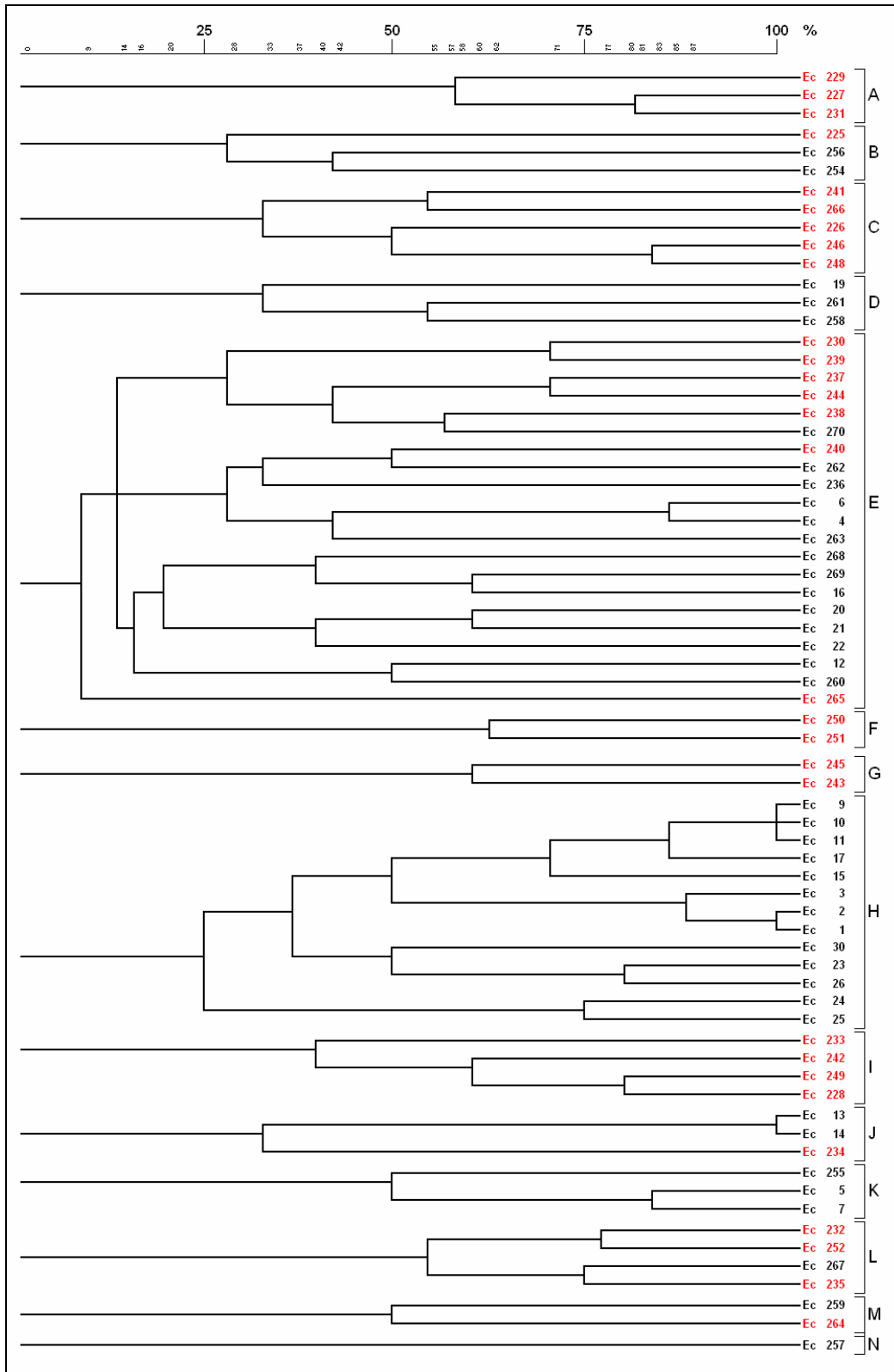
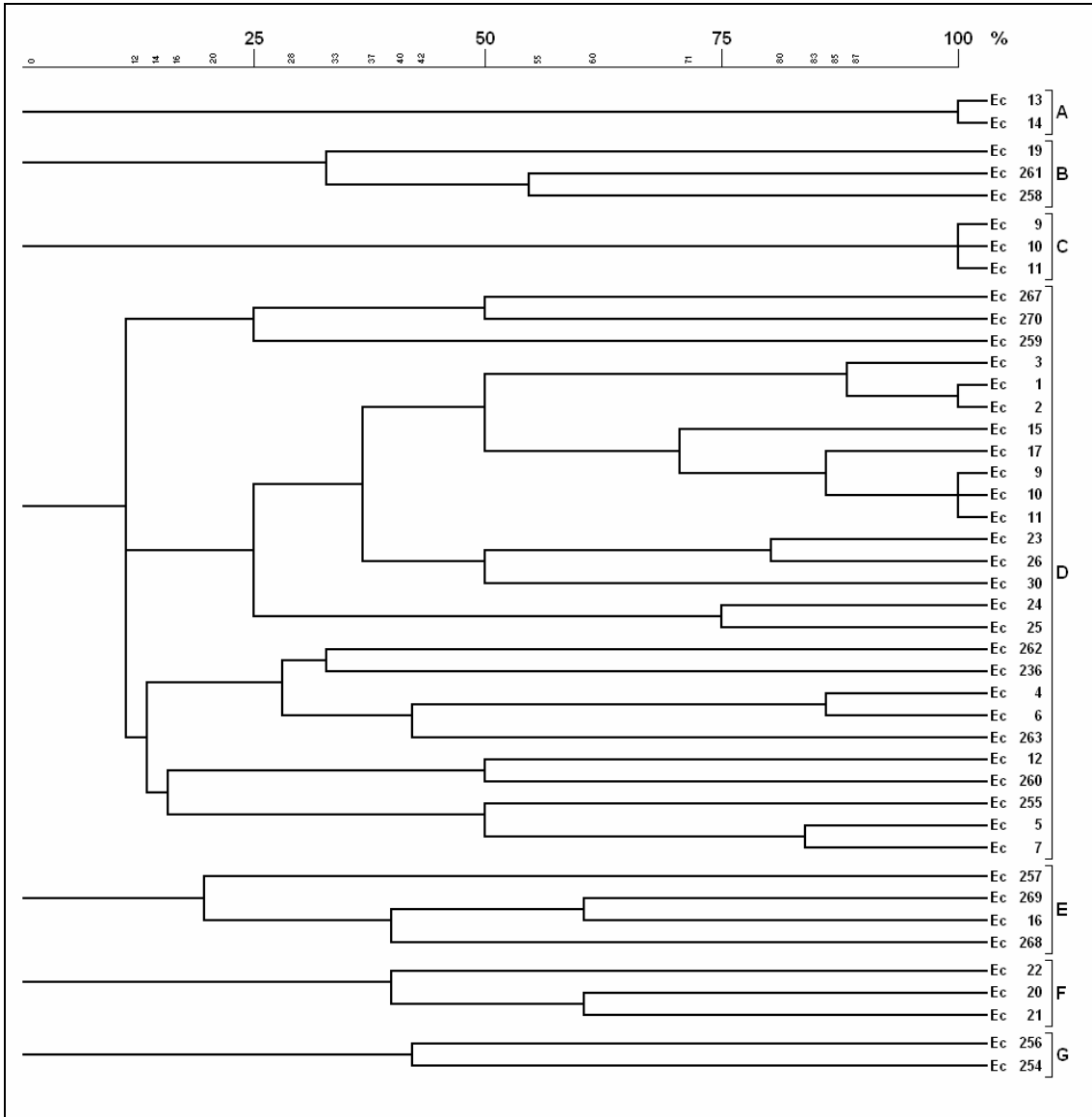


Abb. 8: Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen der aus subgingivaler Plaque stammenden Isolate nach der ERIC2-PCR  
 (A-G: 7 Hauptgruppen, Maßstab: prozentuale Übereinstimmung der Fragmente)



### 3.3 Ergebnisse der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens aller Isolate

Die Ergebnisse der Sequenzierung werden in Tabelle 5 (S. 41-43) aufgelistet und der daraus entwickelte Stammbaum in Abbildung 9 (S. 44) dargestellt.

Aus Tabelle 5 wird ersichtlich, an welcher Position des 16S rRNA-Gens eines Isolates ein zur Referenzsequenz AF320620 (31) differierendes Nukleotid vorliegt und um welches es sich handelt. Zum weiteren Vergleich wurde die Sequenz AY286546 (40) herangezogen, welche zur Sequenz AF320620 deutliche Sequenzvariationen aufweist, die auch im Vergleich der Sequenzen aller Isolate mit der Sequenz AF320620 zu erkennen sind.

Des Weiteren geht aus Tabelle 5 hervor, dass die Sequenzen aller Isolate in acht Hauptgruppen zusammengefasst werden können, in welchen jeweils eine Hauptsequenz erkennbar ist. Innerhalb der jeweiligen Hauptgruppen bilden sich wiederum Untergruppen, welche sich aus der vollständigen Homologie ihrer Sequenzen ergeben. Diese Sequenzen weichen durch eine geringe Anzahl an Einzelmutationen in der Basenabfolge von der Hauptsequenz ab. Die Zusammenfassung der Isolate in Untergruppen ist in Tabelle 5 nicht gekennzeichnet, wird aber aus der Gruppierung im Stammbaum (Abb. 9) ersichtlich. Auch die Sequenz AY286546 kann mit 16 Isolate in einer Hauptgruppe zusammengefasst werden und zeigt zu sieben Isolate eine vollständige Homologie.

Dreizehn Isolate bilden eigene Untergruppen, da sie keine vollständige Homologie zu anderen Isolate aufweisen. Hierzu zählt ebenfalls die Sequenz AF320620, die zudem eine isolierte Hauptgruppe bildet.

Stark variabel ist auch die Anzahl der Isolate innerhalb einer Untergruppe. So enthalten einige nur ein Isolat, andere lediglich zwei in ihren Sequenzen homologe Isolate und wieder andere bis zu 15 identische Isolate.

Im Vergleich mit der Sequenz AF320620 zeigen die Isolate weiterhin eine unterschiedliche Anzahl von Mutationen. So liegt bei den Isolate 20 und 21 an 25 Stellen der Sequenz ein Basenaustausch vor, wohingegen das Isolat 225 nur zwei solcher Mutationen aufweist. Auch kommt es vor, dass Mutationen sich nicht nur auf eine Base begrenzen, sondern auf einer längeren Strecke der

Sequenz erfolgt sind. So wurden bei einigen Isolaten der Gruppe A Mutationen über eine Sequenzlänge von 5 Nukleotiden festgestellt.

Auf der Gesamtsequenzlänge von 1364 Basenpaaren weisen jedoch alle Isolate über weite Strecken identische Basenpaarabfolgen auf. Aus diesem Grund liegt die prozentuale Variabilität der Gruppen zur Referenzsequenz unter 2%, was aus dem Maßstab des dargestellten Stammbaumes (Abb. 9, S. 44) ersichtlich wird. Auch kann hierdurch eine eindeutige Zuordnung zur Spezies *E. corrodens* erfolgen. Des Weiteren wird es mit dieser Methode ermöglicht, Cluster zu bilden. So können 26 Untergruppen in acht Hauptcluster (A-H) zusammengefasst werden.

Auch bei diesem Verfahren ist eine Betrachtung der Ergebnisse hinsichtlich der Herkunft der Isolate erforderlich. So ist es hier ebenfalls auffällig, dass Isolate gleicher Herkunft nicht zwingend Bestandteil der gleichen Unter- oder Hauptgruppe sind. Dies ist nur bei den aus Plaqueproben gewonnenen Isolaten [1, 2, 3], [9, 10, 11] und [20, 21] gegeben. Die ebenfalls aus subgingivaler Plaque stammenden Isolate 4, 5, 6, 7 werden drei verschiedenen Gruppen zugeordnet, von denen sich lediglich zwei im selben Cluster befinden. Es fällt jedoch auf, dass sich die Cluster B und D nur aus subgingival gewonnenen Isolaten zusammensetzen, sie stehen jedoch wiederum nicht in näherer Beziehung zueinander.





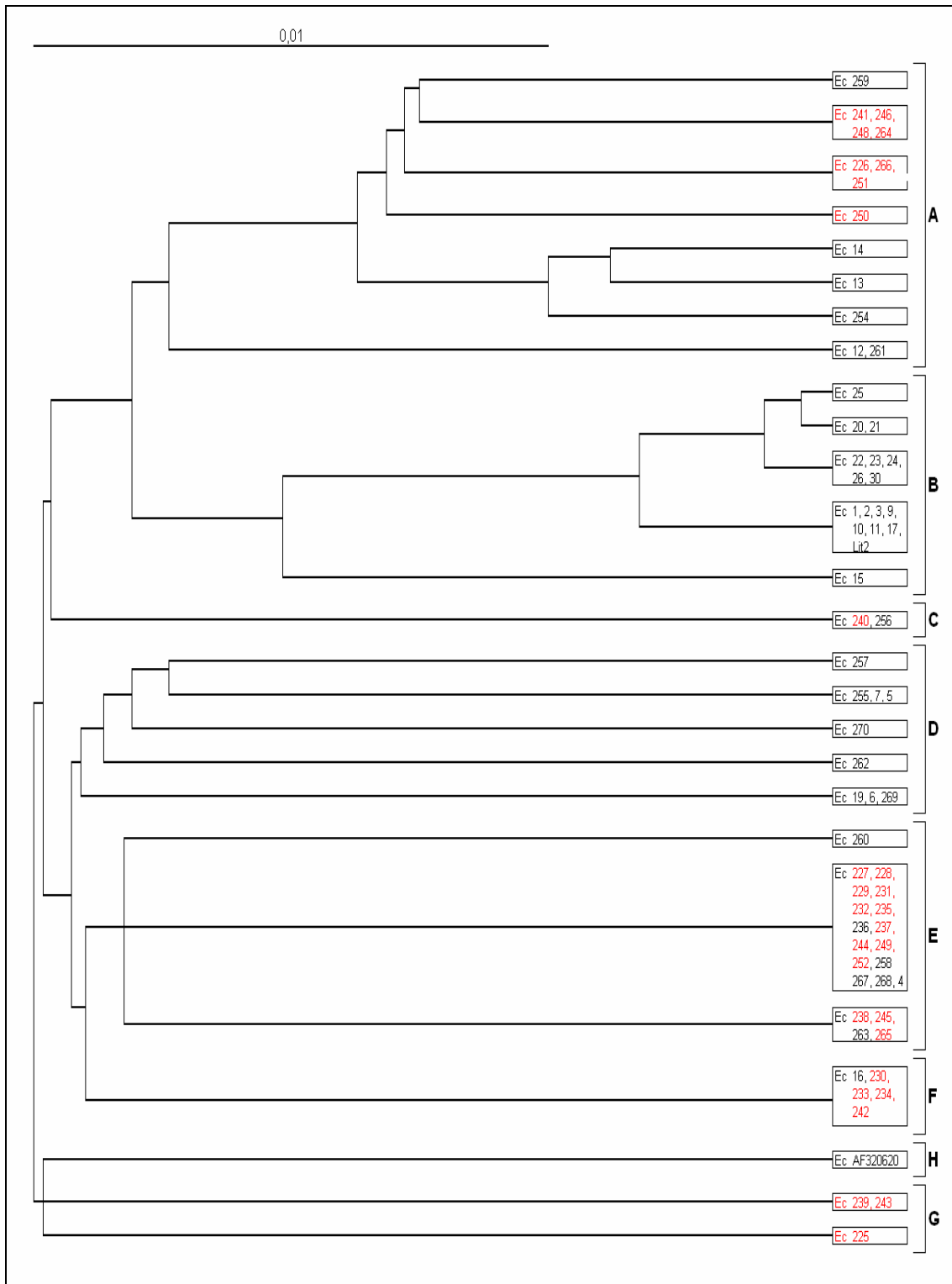


AF 320620		F		H		G				
Pos.	Start	16	230	233	234	242	239	243	225	Pos.
64	91	21	11	8	8	7	6	7	8	Start
T										64
T										91
A							G			104
A										158
A										159
C										189
N							G	G	G	383
A		G	G	G	G	G	G	G	G	414
A										425
G		G	G	G	G	G	G	G	G	427
A										428
A										429
C										433
T										443
T										444
T										460
C										556
T										562
C										584
T										590
A										617
A										619
G										628
A										643
A										716
C										718
C										808
A										809
T										812
T										817
G										818
C										960
C										976
C										977
T										978
T										979
C		C	C	C	C	C				980
C										981
C										987
G										988
G										989
A										990
A										991
G										992
G										993
G										1006
A										1107
G										1232
T										1241
A										1425
C										1428
		1436	1436	1445	1444	1444	1443	1444	1437	

Schwarz: Isolate aus subgingivaler Plaque, Rot: Isolate extraoraler Herkunft

- 1. Zeile: Bezeichnung der Cluster mit den Buchstaben A – G
- 2. Zeile: Bezeichnung der Sequenz mit der jeweiligen Nummer des Isolates bzw. der Accession-Nr.
- 3. Zeile: Position des Beginns der Sequenzierung beim jeweiligen Isolat
- Pos.: Position der jeweiligen Base in der Gesamtsequenz
- del.: deletion
- N: die Base konnte nicht bestimmt werden
- A, C, G, T: Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin

Abb. 9: Darstellung der Ergebnisse der 16S rRNA-Sequenzierung in Form eines Stammbaums. Zu beachten ist der Maßstab, nach dem die prozentuale Variabilität unter 2% liegt! (rote Nr.: extraoral gewonnene Isolate, schwarze Nr.: Isolate aus subgingivaler Plaque, A-H: acht Hauptcluster)



### 3.4 Gegenüberstellung der Ergebnisse der ERIC2-PCR und der Sequenzierung

Beim Vergleich der in der vorliegenden Arbeit angewandten Verfahren sind Übereinstimmungen der Ergebnisse kaum erkennbar. Nach den Ergebnissen der Sequenzierung konnten alle Isolate einer Genospezies zugeordnet werden, wohingegen die Ergebnisse der ERIC2-PCR keine eindeutige Zuordnung zu einer Hauptspezies zuließen. Die Zusammenstellung der Gruppen aus den Isolaten differiert weitestgehend. Lediglich zwei Gemeinsamkeiten lassen sich beim Abgleich der Gruppen- bzw. Clusterbildung im Hinblick auf die Herkunft der Isolate erkennen. So finden sich die Isolate des „Parodontitis-Clusters“ B der Sequenzierung (bis auf die Isolate 20, 21, 22) in der „Parodontitis-Gruppe“ H der ERIC-PCR wieder (Abb.9, S. 44 u. Abb.7, S. 37). Auch die in einer Gruppe des Clusters D der Sequenzierung zusammengefassten Isolate 255, 7 und 5 werden durch die PCR zur Hauptgruppe K vergesellschaftet. Hierbei korreliert allerdings die 100% Übereinstimmung bei der Sequenzierung nicht mit dem 50%igen Verwandtschaftsgrad bei der PCR. Jedoch sind auch hier alle drei Isolate subgingivalen Ursprungs.

Ein gravierender Unterschied zwischen PCR und Sequenzierung ist weiterhin der prozentuale Verwandtschaftsgrad. Weisen bei der Sequenzierung alle Isolate eine über 98%ige Ähnlichkeit auf, so schwankt der Verwandtschaftsgrad bei der PCR zwischen 9 und 100%.

#### 4. Diskussion

*E. corrodens* gilt als natürlicher Besiedler der menschlichen Mundhöhle und des oberen Respirationstraktes (4, 11, 75, 77, 93). Gleichzeitig wird es als Pathogen für Parodontitis (4, 9, 11, 87) angesehen und darüber hinaus für extraorale Infektionen verantwortlich gemacht (9, 23, 27, 29, 46, 75, 77, 80, 90). Da *E. corrodens* in früheren Studien eine erhöhte genetische Heterogenität aufwies (9, 12, 13, 15, 28, 80, 98), ergab sich die Fragestellung, ob bestimmte Klone mit Parodontitis oder extraoralen Infektionen assoziiert sein können und nach den Differenzierungsmöglichkeiten von diesen. Es wurden bereits verschiedene genetische Bestimmungsmethoden für Isolate aus verschiedenen Individuen und verschiedenen Infektionen angewandt (9, 12, 13, 89, 29). Die Ergebnisse dieser Studien zeigten alle eine enorme genetische Variabilität von *E. corrodens* - Isolaten, die aus der dentalen Plaque, von der Schleimhautoberfläche der Mundhöhle sowie aus extraoralen Infektionen isoliert worden waren. Diese Variabilität der *E. corrodens* – Isolate trat bei parodontal erkrankten, als auch bei parodontal gesunden Patienten (14, 9, 29) und bei Isolaten aus extraoralen Infektionen (89, 80) auf. Basierend auf diesen Ergebnissen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass zur Zeit noch keine Verbindung zwischen spezifischen Klonen und Parodontitis oder anderen spezifischen Infektionen hergestellt werden kann (9, 29). Seit jedoch genetische Analysen anderer pathogener Bakterien zeigten, dass unterschiedliche Klone für spezifische Infektionen respektive einzelne Krankheitsausbrüche verantwortlich sein können (1, 63), wird immer wieder die Möglichkeit diskutiert, ob nicht auch einzelne Stämme von *E. corrodens* mit verschiedenen klinischen Manifestationen von Infektionen in Verbindung zu bringen seien (9, 29, 80).

Mit dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit die ERIC2-PCR und die Sequenzierung des 16S-rRNA Gens an 69 verschiedenen *E. corrodens* - Isolaten durchgeführt, um genetische Verwandtschaftsverhältnisse zwischen diesen Isolaten, gewonnen von Patienten mit Parodontitis, Tonsillitis, Sinusitis, Osteomyelitis, Sepsis und Lungenabszessen, zu untersuchen.

Zunächst sollen die Ergebnisse beider Verfahren unabhängig voneinander betrachtet werden.

Bei der Darstellung der Ergebnisse der ERIC2-PCR wurde bereits erwähnt, dass bei der durch den ABI 310 ermöglichten genauen Angabe der Basenpaaranzahl eines jeden DNA-Fragmentes auch kleinste Abweichungen in der Größe des „Amplikons“ (Fragments) registriert werden. Diese können beim rein visuellen Betrachten der Darstellung im Agarosegel nicht wahrgenommen werden. Schon geringe Abweichungen führen jedoch unter Umständen dazu, dass Isolate, welche bei der Agarosegelelektrophorese als homolog erkannt würden, durch die genauere Größendarstellung keinerlei Übereinstimmungen mehr aufweisen könnten. Verglichen mit anderen Studien und deren elektrophoretischen Auswertungen (17, 21, 22, 30, 44, 50, 52, 62, 74) ist deshalb anzunehmen, dass die im Agarosegel dargestellten Fragmente eindeutiger auszuwerten sind, als die durch den ABI 310 aufgetrennten „Amplikons“. Dennoch lassen sich die Isolate aufgrund ihrer ermittelten Fragmentgrößen und -anzahl zu einzelnen Gruppen zusammenfassen, auch wenn der Verwandtschaftsgrad prozentual betrachtet zum Teil nur relativ gering ausfällt. Ein weiterer Nachteil der Auswertung im ABI 310 ist, dass alle aus den Ergebnissen gebildeten Gruppen keinerlei Zugehörigkeit zueinander zeigen, so dass eine Clusterbildung aus einer gemeinsamen Herkunft heraus nicht realisierbar ist. Somit wäre vor der Bestimmung eines Stammes eine zusätzliche Untersuchung hinsichtlich der Zugehörigkeit zur Spezies *E. corrodens* erforderlich.

Betrachtet man die Herkunft der Isolate in Verbindung mit den gebildeten Gruppen, so sind bei Isolaten gleicher Herkunft sowohl Zuordnungen in dieselbe Gruppe, als auch Zuweisungen in völlig unterschiedliche Gruppen möglich. Auch sind in einzelnen Gruppen Isolate aus verschiedenen Infektionen nebeneinander aufgeführt. Lediglich in der Gruppe H (Abb. 7, S. 37) kumulieren ausschließlich Isolate, welche von Patienten mit Parodontitis gewonnen wurden. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der prozentuale Anteil der von letztgenannten Patienten gewonnenen Isolate hinsichtlich der Gesamtzahl der Isolate bei 58% liegt. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine

Gruppe ausschließlich aus Isolaten dieser Patienten zusammensetzt, verhältnismäßig groß. Betrachtet man des Weiteren nur die Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate, welche aus subgingivalen Plaqueproben gewonnen wurden, so wird auch hier eine weit gefächerte Heterogenität deutlich. Eine gemeinsame Herkunft lässt sich auch aus diesem Stammbaum nicht ableiten, die Anzahl der Hauptgruppen reduziert sich zwar um 50% auf sieben, ist aber für die Anzahl der 43 Isolate immer noch recht groß, zumal der Verwandtschaftsgrad innerhalb dieser Gruppen auch hier nur im mittleren Bereich liegt. Die vorliegenden Ergebnisse schließen sich demnach Ergebnissen vorheriger Studien an, welche besagen, dass bisher noch keine eindeutige Verbindung spezifischer Klone zu bestimmten Erkrankungen hergestellt werden kann (9, 29).

Bei der Sequenzierung hingegen ergeben sich aufgrund der langen Grundsequenzlänge der 16S rRNA relativ hohe Übereinstimmungen und darüber hinaus ist eine eindeutige Zuordnung der Isolate zur Spezies *E. corrodens* möglich. Da auch eine Zusammenfassung der einzelnen Gruppen in Cluster möglich ist, eignet sich dieses Verfahren eventuell eher zur Subtypisierung der Spezies *E. corrodens* als die ERIC2-PCR.

Betrachtet man auch hier wieder die Herkunft der Isolate hinsichtlich der Gruppenzusammensetzung, so stellt sich in etwa das gleiche Ergebnis wie bei der ERIC2-PCR dar: Isolate gleicher Herkunft können sich sowohl in gleichen, als auch in verschiedenen Gruppen befinden. Auch bei diesem Verfahren beinhalten einzelne Gruppen als auch einzelne Cluster sowohl Isolate von Patienten mit Parodontitis als auch von anderweitigen Infektionen, womit vorangenannte Studien ebenfalls bestätigt werden können. Allerdings enthalten hier die Cluster B und D ausschließlich Isolate von an Parodontitis erkrankten Patienten und auch einige Gruppen setzen sich nur aus Isolaten zusammen, welche aus subgingivalen Plaqueproben gewonnen wurden, oder aber aus extraoralen Regionen stammenden Proben. Diese Ergebnisse deuten zumindest auf die Möglichkeit hin, dass einzelne Klone mit bestimmten Erkrankungen assoziiert werden könnten.

Für die Multiklonalität einer Infektion mit *E. corrodens* mag es eine einfache Erklärung geben, wenn sie im Kontrast zur überwiegend monoklonalen Infektion mit Spezies wie *A. actinomycetemcomitans* gesehen wird (29). *E. corrodens* ist ein komensalisches Bakterium in seiner subgingivalen ökologischen Nische. Es besteht die Möglichkeit, dass ein jeder Mensch irgendwann in seinem Leben *E. corrodens* subgingival beherbergt. Die hohe Prävalenz von *E. corrodens* führt zu einer größeren Wahrscheinlichkeit für einzelne Individuen, fremden *E. corrodens* Klonen ausgesetzt zu werden und so eine größere Akkumulation von verschiedenen *E. corrodens* Klonen über die Lebenszeit hinweg zuzulassen. Im Gegensatz hierzu mag die vorwiegend monoklonale Infektion von *A. actinomycetemcomitans* die Konsequenz einer relativ niedrigen Prävalenz in der Bevölkerung sein (29).

Beim Vergleich der in der vorliegenden Arbeit angewandten Verfahren sind Übereinstimmungen der Ergebnisse kaum erkennbar. Nach den Ergebnissen der Sequenzierung konnten alle Isolate einer Genospezies zugeordnet werden, wohingegen die Ergebnisse der ERIC2-PCR keine eindeutige Zuordnung zu einer Hauptspezies zuließen. Die Zusammenstellung der Gruppen aus den Isolaten differiert weitestgehend. Beim Abgleich der Gruppen- bzw. Clusterbildung im Hinblick auf die Herkunft der Isolate, finden sich die Isolate des „Parodontitis-Clusters“ B (Abb.9, S. 44) der Sequenzierung (bis auf drei Isolate) in der „Parodontitis-Gruppe“ H (Abb.7, S. 37) der ERIC-PCR wieder. Da dieses Ergebnis jedoch ausschließlich in nur einem Cluster beziehungsweise einer Gruppe zu finden ist, unterstreicht dieses die Notwendigkeit des Suchens nach weiteren Verfahren mit der Zielsetzung, eine Zuordnung von bestimmten Klonen von *E. corrodens* zu spezifischen Erkrankungen möglich zu machen.

Es stellt sich nun die Frage hinsichtlich der Praktikabilität der hier verwendeten Verfahren, um erstens die Spezies *E. corrodens* in einzelne Stämme zu unterteilen, und zweitens dann diese spezifischen Stämme spezifischen Erkrankungen zuzuordnen. Bei der Interpretation der Ergebnisse beider Verfahren dürfen die sich häufig wiederholenden Mutationen nicht außer Acht gelassen werden. So können zum Beispiel Punktmutationen, Transformationen und Translationen verschiedene Ergebnisse erzielen:



- das Muster eines Isolates ist nicht vom Muster eines anderen Isolates zu unterscheiden
- es liegt nur eine eingeschränkte Übereinstimmung vor
- es liegt überhaupt keine Übereinstimmung vor (96).

Alle drei Konsequenzen vorgenannter genetischer Ereignisse konnten bei den hier untersuchten Verfahren beobachtet werden. Da *E. corrodens* von Natur aus genetischen Austausch durch horizontalen Gen-Transfer zeigt, können sich ständig neue Genotypen durch Rekombination ergeben (29). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine ausgesprochen breite genetische Variabilität vermuten.

Für die Anwendung der ERIC2-PCR in Verbindung mit der Auftrennung im ABI 310 könnten Mutationen eine besondere Rolle spielen. Durch eine Variabilität in der Basenpaarabfolge ist es möglich, dass ein Amplikon seine Länge um nur einige Nukleotide verkürzt oder verlängert. Dies hat bei der Auftrennung mittels ABI 310 unmittelbar zur Folge, dass es keine Übereinstimmung mehr mit einem vorher übereinstimmenden Segment eines anderen Isolates zeigt. Diese relativ „kleinen“ Variabilitäten würden bei der visuellen Auswertung im Agarosegel aber wahrscheinlich nicht registriert, was eine Reduzierung der dargestellten Heterogenität von *E. corrodens* zur Folge haben könnte und dadurch eine bessere Möglichkeit zur Subtypisierung gegeben wäre. Auf der anderen Seite ist es jedoch auch möglich, dass durch Mutationen gesamte Fragmente wegfallen oder hinzukommen. Diese Ereignisse werden natürlich auch im Agarosegel elektrophoretisch dargestellt, sind jedoch durch ihre eindeutige Interpretierbarkeit durchaus dazu geeignet, zur Subtypisierung von *E. corrodens* beizutragen.

Im Gegensatz dazu zeigen Mutationen des 16S rRNA-Gens keine so gravierenden Konsequenzen. Die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens wurde schon in früheren Studien zur Klassifikation von Bakterien verwendet und ist dafür bekannt, in eher geringem Maße evolutionären Veränderungen unterworfen zu sein (39, 54, 66). So zeigt sich auch in dieser Arbeit, dass Mutationen zwar in geringem Ausmaß stattfinden, sich aber auf einzelne Basen oder sehr kurze Sequenzstrecken begrenzen. Im Hinblick auf das gesamte Gen

sind die Auswirkungen auf den Nachweis verwandtschaftlicher Beziehungen verschwindend gering. Dies begründet sich darin, dass ein Basenaustausch bei der Sequenzierung zwar registriert wird, es durch die Länge der untersuchten Sequenz jedoch prozentual gesehen zu einer sehr kleinen Abweichung in der Übereinstimmung mit anderen Isolatsequenzen kommt. Eine Verwandtschaft der untersuchten Isolate wird immer auszumachen sein, da der Großteil der Basenpaarabfolge identisch bleibt.

Die genetische Heterogenität von *E. corrodens* wurde bisher durch die DNA-Hybridisierung (14), Restriktions-Endonukleasen-Analyse (12), Makrorestriktionsanalyse (89) und „random primed“ PCR (9, 29, 80) untersucht und bestätigt. Die genetische korreliert offenbar mit einer phänotypischen Heterogenität, wie durch unterschiedliche Muster der äußeren Membranproteine gezeigt werden konnte (13). Auch Analysen der Lipopolysaccharid-Bandenmuster in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zeigten eine hohe Heterogenität (94). Einige Verfahren offerieren vielversprechende Ansätze zur Eignung für die Subtypisierung von *E. corrodens*. Hierzu zählen vor allem die Makrorestriktionsanalyse sowie die „random primed“ PCR.

Bei der Makrorestriktionsanalyse wird das gesamte Genom auf die An- und Abwesenheit einer Erkennungssequenz für eine selten schneidende Restriktionsendonuklease untersucht. Somit wird auch das gesamte Genom als Restriktionsfragmentpolymorphismus genutzt und ist damit durchaus für epidemiologische Fragestellungen geeignet (89). Die Anwendung dieses Verfahrens bei mehreren Isolaten und deren Vergleich und gegebenenfalls Zuordnung zu einzelnen Untergruppen steht allerdings noch aus.

Bei den bisherigen PCR-Studien (9, 80, 29) zeigte sich immer eine ausgeprägte Heterogenität, die eine Subtypisierung zwar möglich machte, die Anzahl der Untergruppen eine weitere Anwendbarkeit aber uneffektiv erscheinen lässt. Das gleiche Resümee kann aus der ERIC2-PCR der vorliegenden Arbeit gezogen werden. Da schon 69 Isolate insgesamt 14 Untergruppen zugewiesen werden, lässt dies erwarten, dass sich bei der Untersuchung weiterer Isolate neue Untergruppen ergeben würden. Dies ist vor allem bei der Anwendung des ABI

310 zu erwarten. Trotzdem stellt die ERIC2-PCR eine Möglichkeit dar, die Spezies *E. corrodens* in Stämme zu unterteilen. Hierzu sind in jedem Fall weitere Untersuchungen mit einer Vielzahl an Isolaten erforderlich, bei denen der elektrophoretischen Darstellung im Agarosegel aus vorgenannten Gründen eventuell der Vorzug gegeben werden sollte.

Die Sequenzierung der 16S rRNA von *E. corrodens* wurde in dieser Arbeit erstmals mit der Fragestellung verwendet, ob die Möglichkeit einer Subtypisierung mit diesem Verfahren gegeben ist. Da alle Isolate der gleichen Spezies zugeordnet werden können und die Anzahl der gebildeten Cluster nicht die Höhe der bei der PCR gebildeten Gruppen erreicht, ist dieses Verfahren für eine Subtypisierung eventuell eher geeignet. Es stellt sich jedoch die Frage, ob eine Heterogenität, welche prozentual gesehen unter 2% liegt, für eine aussagekräftige Subtypisierung als ausreichend anzusehen ist.

Die mögliche Zuordnung spezifischer Klone zu bestimmten Erkrankungen stellt eine zukünftige Aufgabe dar. Die Ergebnisse der Cluster- und Gruppenbildung in dieser Arbeit lassen zwar die Vermutung zu, dass eine gewisse Assoziation zu einzelnen Krankheiten möglich sein könnte, Beweise oder eindeutige Hinweise konnten jedoch nicht erbracht werden. Die angestellte Vermutung wird von einer früheren Studie unterstützt, in der die klonale Diversität und Stabilität von *E. corrodens* - Isolaten über längere Zeit untersucht wurde (29). Mit Hilfe der „random primed“ PCR wurde dargestellt, dass die klonale Diversität von *E. corrodens* bei Parodontitis bei einer Koinfektion mit *P. gingivalis* signifikant zunahm. Andere demographische oder mikrobiologische Variablen konnten mit der subgingivalen klonalen Diversität von *E. corrodens* allerdings nicht in Verbindung gebracht werden (29).

Schlussendlich bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass *E. corrodens* eine Spezies mit einer großen genetischen Heterogenität darstellt, welche zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Assoziation verschiedener klonaler Untergruppen mit Parodontitis und extraoralen Infektionen Anlass gibt. Die Sequenzierung der 16S rRNA und die ERIC2-PCR bieten zwar noch Potential für weitere Forschungen, jedoch ist mit diesen beiden Verfahren die Fragestellung der Subtypisierung nicht zufrieden stellend zu beantworten.

## 5. Zusammenfassung

*Eikenella corrodens* gilt als typischer Besiedler der Mundhöhle und des Respirationstraktes und wird als Pathogen unter anderem mit der Parodontitis assoziiert. Da es phänotypisch und genetisch eine hohe Heterogenität aufweist, wird die Zuordnung verschiedener Klone zu verschiedenen Krankheitsentitäten diskutiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit zwei Verfahren („ERIC2-PCR“ und „Sequenzierung des 16S rRNA-Gens“) die genotypische Variabilität von *E. corrodens* darzustellen und die daraus resultierende Möglichkeit zur Subtypisierung auch im Hinblick auf die Herkunft der Isolate zu überprüfen.

An 69 klinischen Isolaten wurde zum einen die ERIC2-PCR in Verbindung mit der Kapillarelektrophorese unter Einsatz eines internen Größen-Standards als Referenz durchgeführt. Die Gegenüberstellung der erzielten Fragmentgrößen und –anzahl der einzelnen Isolate führte zur Bildung von 14 Hauptgruppen, welche untereinander keine Gemeinsamkeiten mehr aufweisen. Zum anderen wurden die selben Isolate nach der Sequenzierung ihres 16S rRNA-Gens hinsichtlich Variabilitäten in der Nukleotidabfolge untersucht, wodurch acht Cluster gebildet werden konnten, welche sich wiederum aus Untergruppen zusammensetzen. Alle Cluster sind auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen. Sowohl bei der ERIC2-PCR als auch bei der Sequenzierung lässt sich ein Einfluss der Herkunft der Isolate auf Gruppen- oder Clusterbildung kaum erkennen.

Die Ergebnisse bestätigen die bekannte große Heterogenität der Spezies *E. corrodens*. Für die Subtypisierung sind die untersuchten Verfahren jedoch unzureichend. Die ERIC2-PCR ist durch die große Anzahl der entstehenden Gruppen, welche zudem der Spezies nicht mehr eindeutig zugeordnet werden können, als nicht praktikabel anzusehen. Die Sequenzierung erlaubt zwar eine Zuordnung zur Hauptspezies, die prozentuale Heterogenität erscheint jedoch für eine daraus hervorgehende eindeutige Subtypisierung als zu gering. Eine genaue Zuordnung bestimmter Klone zu einzelnen Krankheitsbildern ist ebenfalls mit beiden Verfahren nicht durchführbar.

**6. Literaturverzeichnis**

1. Achtman, M. 1997. Microevolution and epidemic spread of serogroup A *Neisseria meningitidis* – a review. *Gene*. 192: 135-149.
2. Alcalá, L., F. Garcia-Garrote, E. Cercenado, T. Peláez, G. Ramos, E. Bouza. 1998. Comparison of Broth Microdilution Method Using Haemophilus Test Medium and Agar Dilution Method for Susceptibility Testing of *Eikenella corrodens*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2386-2388.
3. Allaker, R.P., L.S. Silva Mendez, J.M. Hardie, N. Benjamin. 2001. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 16: 253-256.
4. 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. Immun.* 11: 266-273.
5. Behling, U.H., P.H. Pham, A. Nowotny. 1979. Biological Activity of the Slime and Endotoxin of the Periodontopathic Organism *Eikenella corrodens*. *Infect. Immun.* 26: 580-584.
6. Bigl, P., V. Pavek, L. Brezinova. 1990. *Eikenella corrodens* infection of the oral cavity as a cause of bacterial endocarditis. *Czech. Med.* 13: 38-42.
7. Brocchieri, L. 2001. Phylogenetic inferences from molecular sequences: review and critique. *Theo. Popul. Biol.* 59: 27-40.
8. Burkhardt, F. 1992. Mikrobiologische Diagnostik. In: Burkhardt, F. (Hrsg). Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1. Aufl., S. 181-187.

9. Chen, C. A. Ashimoto. 1996. Clonal Diversity of Oral *Eikenella corrodens* within Individual Subjects by Arbitrarily Primed PCR. J. Clin. Microbiol. 34: 1837-1839.
10. Chen, C. A. Ashimoto. 1998. Variable serum immunoglobulin G immune response to genetically distinct *Eikenella corrodens* strains coexisting in the human oral cavity. Oral Microbiol. Immunol. 13: 158-165.
11. Chen, C.K., R.G. Dunford, H.S. Reynolds, J.J. Zambon. 1989. *Eikenella corrodens* in the human oral cavity. J. Periodontol. 60: 611-616.
12. Chen, C.K., G.J. Sunday, J.J. Zambon, M.E. Wilson. 1990. Restriction endonuclease analysis of *Eikenella corrodens*. J. Clin. Microbiol. 28: 1265-1270.
13. Chen, C.K., M.E. Wilson. 1990. Outer membrane protein and lipopolysaccharide heterogeneity among *E. corrodens* isolates. J. Infect. Dis. 162: 664-671.
14. Chen, C.K., T.V. Potts, M.E. Wilson. 1990. DNA homologies shared among *E. corrodens* isolates and other corroding bacili from the oral cavity. J. Periodontal Res. 25: 106-112.
15. Chen, C.K., M.E. Wilson. 1992. *Eikenella corrodens* in human oral and non-oral infections: a review. J. Periodontol. 63: 941-953.
16. Cheng, A.F., J.R. South, G.L. French. 1988. *Eikenella corrodens* as a cause of brain abscess. Scand. J. Infect. Dis. 20: 667-671.
17. Cimolai, N. C. Trombley. 1997. Verification of a PCR-Based Typing Method for *Acinetobacter baumannii* in a Pseudo-Outbreak Investigation. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 28: 61-64.

18. Cobb, C.M., J.T. Helber, R. Hirschberg. 1994. Scanning electron microscopy of *Eikenella corrodens* colony morphology variants. J. Periodontal Res. 29: 410-417.
19. Coykendall, A.L., F.S. Kaczmarek. 1980. DNA homologies among *Eikenella corrodens* strains. J. Periodontal Res. 15: 615-620.
20. Darveau, R.P., A. Tanner, R.C. Page. 1997. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol. 14: 12-32.
21. De Bruijn, F.J. 1992. Use of Repetitive (Repetitive Extragenetic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2180-2187.
22. De Gheldre, Y., N. Maes, F. Rost, R. De Ryck, P. Clevenbergh, J.L. Vincent, M.J. Struelens. 1997. Molecular Epidemiology of an Outbreak of Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* Infections and In Vivo Emergence of Imipenem Resistance. J. Clin. Microbiol. 35: 152-160.
23. Decker, M.D., B.S. Graham, E.B. Hunter, S.M. Liebowitz. 1986. Endocarditis and infections of intravascular devices due to *Eikenella corrodens*. Am. J. Med. Sci. 292: 209-212.
24. Delaney, J.E., K.S. Kornman. 1987. Microbiology of subgingival plaque from children with localized prepubertal periodontitis. Oral Microbiol. Immunol. 2: 71-76.
25. Dudley, J.P., E.J. Goldstein, W.L. George, B.V. Bock, B.D. Kirby, S.M. Finegold. 1978. Sinus infection due to *Eikenella corrodens*. Arch. Otolaryngol. 104: 462-463.

26. Feres, M., A.D. Haffajee, C. Goncalves, K.A. Allard, S. Som, C. Smith, J.M. Goodson, S.S. Socransky. 1999. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (II). Effect on antibiotic resistance of subgingival species. *J. Clin. Periodontol.* 26: 784-792.
27. Flesher, S.A., E.J. Bottone. 1989. *Eikenella corrodens* cellulitis and arthritis of the knee. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2606-2608.
28. Fujise, O., W. Chen, S. Rich, C. Chen. 2004. Clonal Diversity and Stability of *Eikenella corrodens*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2036-2042.
29. Gargiulo, M., A. Gramenzi, L. Di Ottavio, P. Gandolfi, E. Manso. 1992. Septic shock from *Eikenella corrodens* and *Staphylococcus epidermidis* in HIV infection. *Lancet.* 340: 1227.
30. Gazouli, M., L.S. Tzouvelekis, A.C. Vatopoulos, E. Tzelepi. 1998. Transferable class C  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) closely related to *Citrobacter freundii* AmpC  $\beta$ -lactamase. *J. Antimicrobial Chemother.* 42: 419-425.
31. Geertsen, R., S. Emler, M. Maaerchy. 2000. *Eikenella corrodens* 16 S rDNA heterogeneity. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=12007403>
32. Goldstein, E.J.C., V.L. Sutter, S.M. Finegold. 1978. Susceptibility of *Eikenella corrodens* to ten cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14: 639-641.
33. Goldstein, E.J.C., E.O. Agyare, R. Silletti. 1981. Comparative Growth of *Eikenella corrodens* on 15 Media in Three Atmospheres of Incubation. *J. Clin. Microbiol.* 13: 951-953.



34. Gothe, E., R. Mutters, W. Mannheim. 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic variation among human isolates of *Eikenella corrodens*. Zentralbl. Bakteriol. 271: 61-69.
35. Gully, N.J., A.H. Rogers. 1995. Some observations on the nutritional requirements of *Eikenella corrodens* ATCC 23834T grown in continuous culture. Oral Microbiol. Immunol. 10: 115-118.
36. Gully, N.J., A.H. Rogers. 1996. Energy production and peptidase activity in *Eikenella corrodens*. FEMS. 139: 209-213.
37. Gully, N.J., A.H. Rogers. 2001. The characterization of a (nutritionally important) proline iminopeptidase from *Eikenella corrodens*. Oral Microbiol. Immunol. 16: 370-375.
38. Haffajee, A., S.S. Socransky. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000. 5: 78-111.
39. Harmsen, D., C. Singer, J. Rothganger, T. Tonjum, G.S. De Hoog, H. Shah, J. Albert, M. Frosch. 2001. Diagnostics of *neisseriaceae* and *moraxellaceae* by ribosomal DNA sequencing: ribosomal differentiation of medical microorganisms. J. Clin. Microbiol. 39: 936-942.
40. Han, X.Y., J. Weinberg, S. Prabhu, S.J. Hassenbusch, G.N. Fuller, J.J. Tarrand, D.P. Kontoyiannis. 2003. Fusobacterial brain abscess: five cases and an analysis of possible pathogenesis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=31323249>
41. Henriksen, S.D. 1969. Corroding bacteria from the respiratory tract. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 75: 91-96

42. Hulton, C.S., C.F. Higgins, P.M. Sharp. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 825-834.
43. James, A.L., J.V. Robinson. 1975. A comparison of the biochemical activities of *Bacteroides corrodens* and *Eikenella corrodens* with those of certain other gramnegative bacteria. *J. Med. Microbiol.* 8: 59-76.
44. Johnson, J.R., T.T. O'Bryan. 2000. Improved Repetitive-Element PCR Fingerprinting of *Salmonella enterica* with the Use of Extremely Elevated Annealing Temperatures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7: 258-264.
45. Johnson, J.R., C. Clabots, M. Azar, D.J. Boxrud, J.M. Besser, J.R. Thurn. 2001. Molecular Analysis of a Hospital Cafeteria-Associated Salmonellosis Outbreak Using Modified Repetitive Element PCR Fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3452-3460.
46. Joshi, N., T. O'Bryan, P.C. Appelbaum. 1991. Pleuropulmonary infections caused by *Eikenella corrodens*. *Rev. Infect. Dis.* 13: 1207-1212.
47. Kasten, R., R. Mutters, W. Mannheim. 1998. Catalase-positive *Eikenella corrodens* and *Eikenella*-like isolates of human and canine origin. *Zentralbl. Bakteriol.* 288: 319-329.
48. Kato, T., I. Takazoe, K. Okuda. 1989. Structural Analysis of Lipopolysaccharides from *Eikenella corrodens* by Use of Murine Antibodies. *Infect. Immun.* 57: 656-659.
49. Kayser, F.H., K.A. Bienz, J. Eckert, R.M. Zinkernagel. 1997. Medizinische Mikrobiologie. In: Kayser, F.H., K.A. Bienz, J. Eckert, R.M. Zinkernagel. (Hrsg.) Georg Thieme Verlag Stuttgart, 9. Aufl., S. 212-220

50. Kondoh, K., D. Furuya, A. Yagihashi, N. Uehara, M. Nakamura, D. Kobayashi, N. Tsuji, N. Watanabe. 2002. Comparison of arbitrarily primed-polymerase chain reaction and pulse-field gel electrophoresis for characterizing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology. 35: 62-67.
51. Krawczak, M., J. Schmidtke. 1994. DNA-Fingerprinting. In: Krawczak, M., J. Schmidtke. (Hrsg). Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin-Oxford. 1. Aufl., S. 40-42.
52. Kumao, T., W. Ba-Thein, H. Hayashi. 2002. Molecular Subtyping Methods for Detektion of *Salmonella enterica* Serovar Oranienburg Outbreaks. J. Clin. Microbiol. 40: 2057-2061.
53. Lacroix, J.M., C. Walker. 1991. Characterization of a beta-lactamase found in *Eikenella corrodens*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 886-891.
54. Lane, D.J., B. Pace, G.J. Olsen, D.A. Stahl, M.L. Sogin, N.R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 6955-6959.
55. Levine, M., A. Progulsk-Fox, N.D. Denslow, W.G. Farmerie, D.M. Smith, W.T. Swearingen, F.C. Miller, Z. Liang, B.A. Roe, H.Q. Pan. 2001. Identification of lysine decarboxylase as a mammalian cell growth inhibitor in *Eikenella corrodens*: possible role in periodontal disease. Microb. Pathog. 30: 179-192.
56. López-Molina, N., I. Laconcha, A. Rementeria, A. Audicana, I. Perales, J. Garaizar. 1998. Typing of *Salmonella enteritidis* of different phage types of PCR fingerprinting. Journal of Applied Microbiology. 84: 877-882.

57. Lucangeli, C., S. Morabito, A. Caprioli, L. Achene, L. Busani, E. Mazzolini, A. Fabris, A. Macri. 2000. Molecular fingerprinting of strains of *Yersinia ruckeri* serovar O1 and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated in Italy. *Veterinary Microbiology*. 76: 273-281.
58. Maiden, M.F.J., A. Tanner, P.J. Macuch. 1996. Rapid Characterization of Periodontal Bacterial Isolates by Using Fluorogenic Substrate Tests. *J. Clin. Microbiol.* 34: 376-384.
59. Maliszewski, C.R., C.W. Shuster, S.J. Badger. 1983. A Type-Specific Antigen of *Eikenella corrodens* Is the Major Outer Membrane Protein. *Infect. Immun.* 42: 208-213.
60. Markiewicz, W.T., G. Gröger, R. Rösch, A. Zebrowska, M. Markiewicz, M. Klotz, M. Hinz, P. Godzina, H. Seliger. 1997. A new method of synthesis of fluorescently labelled oligonucleotides and their application in DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 25: 3672-3680.
61. Mehta, A. R.P. Leite Jr., Y.B. Rosato. 2001. Assessment of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from citrus in Brazil by PCR-RFLP of the 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer and rep-PCR fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*. 79: 53-59.
62. Mehta, Y.R., A. Mehta, Y.B. Rosato. 2002. ERIC and REP-PCR Banding Patterns and Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer of rDNA of *Stemphylium solani* Isolates from Cotton. *Current Microbiol.* 44: 323-328.
63. Morelli, G., B. Malorny, K. Müller, A. Seiler, J.F. Wang, J. del Valle, M. Achtman. 1997. Clonal descent and microevolution of *Neisseria meningitidis* during 30 years of epidemic spread. *Mol. Microbiol.* 25: 1047-1064.

64. Newton, C.R., A. Graham. 1994. PCR. In: Newton, C.R., A. Graham. (Hrsg). Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin-Oxford. 2. Aufl., S. 111-126.
65. Okuda, K. 1994. Bacteriological diagnosis of periodontal disease. Bull. Tokyo Dent. Coll. 35: 107-119.
66. Paster, B.J., F.E. Dewhirst, E. Olsen, G.J. Fraser. 1994. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas spp.* and Related Bacteria. J. Bacteriol. 176: 725-732.
67. 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
68. Paster, B.J., W.A. Falkler, Jr., C.O. Enwonwu, E.O. Idigbe, K.O. Savage, V.A. Levanos, M.A. Tamer, R.L. Ericson, C.N. Lau, F.E. Dewhirst. 2002. Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions. J. Clin. Microbiol. 40: 2187-2191
69. Progulske, A., S.C. Holt. 1984. Isolation and Characterization of the Outer Membrane and Lipopolysaccharide from *Eikenella corrodens*. Infect. Immun. 43: 166-177.
70. Progulske, A., R. Mishell, C. Trummel, S.C. Holt. 1984. Biological Activities of *Eikenella corrodens* Outer Membrane and Lipopolysaccharide. Infect. Immun. 43: 178-182.
71. Progulske, A., S.C. Holt. 1987. Studies on the growth of *Eikenella corrodens* strain 23834. Oral Microbiol. Immunol. 2: 2-9.

72. Renders, N., U. Römling, H. Verbrugh, A. van Belkum. 1996. Comparative Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Macrorestriction Fragments. J. Clin. Microbiol. 34: 3190-3195.
73. Roberts, A., J.B. Matthews, S.S. Socransky, P.P.E. Freestone, P.H. Williams, H.C. Chapple. 2002. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria in vitro. Oral Microbiol. Immunol. 17: 296-303.
74. Saxena, M.K., V.P. Singh, B.D. Lakhcharua, G. Taj, B. Sharma. 2002. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. Res. in. Veterinary Sci. 73: 313-314.
75. Schmidt, D.R., J.D. Heckman. 1983. *Eikenella corrodens* in Human Bite Infections of the Hand. J. Trauma. 23: 478-482.
76. Schröter G., J. Maier. 1974. Quantitative Untersuchungen zum Vorkommen von *Bacteroides corrodens Eiken* und verwandten Keimarten in exstirpierten Tonsillen. Zbl. Bakt. Hyg. 226: 355-363.
77. Selby, T., R.P. Allaker, D. Dymock. 2003. Characterization and expression of adjacent proline iminopeptidase and aspartase genes from *Eikenella corrodens*. Oral Microbiol. Immunol. 18: 256-259.
78. Sharples, G.J., R.G. Lloyd. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. Nucleic Acids Res. 18: 6503-6508.
79. Shashikant, M.S., E.N. Faerber, K.K. Belani. 1999. Respiratory foreign bodies and *Eikenella corrodens* brain abscess in two children. Pediatr. Radiol. 29: 327-330.

80. Sheng, W.S., P.R. Hsueh, C.C. Hung, L.J. Teng, Y.C. Chen, K.T. Luh. 2001. Clinical Features of Patients with Invasive *Eikenella corrodens* Infections and Microbiological Characteristics of the Causative Isolates. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20: 231-236.
81. Shiozu, I., J. Shiozu, I. Takazoe, K. Okuda. 1992. Corroding characteristics of *Eikenella corrodens*. Bull Tokyo Dent. Coll. 33: 1-6.
82. Slee, A.M., J.M. Tanzer. 1978. Selective Medium for Isolation of *Eikenella corrodens* from Periodontal Lesions. J. Clin. Microbiol. 8: 459-462.
83. Slots, J., A. Ashimoto, M.J. Flynn, G. Li, C. Chen. 1995. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. Clin. Infect. Dis. 20: 304-307.
84. Smith, L.M., J.Z. Sanders, R.J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C.R. Connell, C. Heiner, S.B. Kent, L.E. Hood. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature. 321: 674-679.
85. Socransky, S.S., A.D. Haffajee. 1992. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. J. Periodontol. 63: 322-331.
86. 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.
87. Soder, P.O., L.J. Lin, B. Soder. 1993. DNA probe detection of periodontopathogens in advanced periodontitis. Scand. J. Dent. Res. 101: 363-370.

88. Stackebrandt, E., B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
89. Steffens, L., S. Franke, S. Nickel, A. Schwarzkopf, T.F. Flemmig, H. Karch. 1994. DNA fingerprinting of *Eikenella corrodens* by pulsed-field gel electrophoresis. *Oral Microbiol. Immunol.* 9: 95-98.
90. Stoloff, A.L., M.L. Gillies. 1986. Infections with *Eikenella corrodens* in a general hospital: a report of 33 cases. 8: 50-53.
91. Suda R., C.H. Lai, H.W. Yang, K. Hasegawa. 2002. *Eikenella corrodens* in subgingival plaque: relationship to age and periodontal condition. *J. Periodontol.* 73: 886-891.
92. Suda, R., C. Kurihara, M. Kurihara, T. Sato, C.H. Lai, K. Hasegawa. 2003. Determination of eight selected periodontal pathogens in the subgingival plaque of maxillary first molars in Japanese school children aged 8-11 years. *J. Periodont. Res.* 38: 28-35.
93. Suwanagool, S., M.M. Rothkopf, S.M. Smith, D. LeBlanc, R. Eng. 1983. Pathogenicity of *Eikenella corrodens* in Humans. *Arch. Intern. Med.* 143: 2265-2268.
94. Tanner, A.C.R. 1986. Characterization of *Wolinella spp.*, *Campylobacter concisus*, *Bacteroides gracilis*, and *Eikenella corrodens* by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 24: 562-565.
95. Teng, Y.A. 2003. The Role of Acquired Immunity And Periodontal Disease Progression. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14: 237-252.



96. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, B. Swaminathan. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
97. Trallero, E.P., J.M.G. Arenzana, G.C. Eguiluz, J.T. Larrucea. 1986.  $\beta$ -Lactamase-Producing *Eikenella corrodens* in an Intraabdominal Abscess. *J. Infect. Dis.* 153: 379-380.
98. 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.
99. Vay, C., M. Almuzara, C. Barberis, C. Rodriguez, A. Togneri, J. Mattera, A. Famiglietti. 2002. Activity of 14 antimicrobials against *Eikenella corrodens*. *Rev. Argent. Microbiol.* 34: 230-234.
100. Versalovic, J., T. Koeth, J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic. Acids Res.* 19: 6823-6831.
101. Versalovic, J., M. Schneid, F.J. de Bruijn, J.R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40

## 7. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei den Herren Universitätsprofessoren Dr. med. Dag Harmsen 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 herzliches Danke an Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Beikler für die stetige Unterstützung in allen Belangen, zuletzt auch über die beträchtliche Distanz zwischen Garbsen und Seattle.

Das Team der Mikrobiologischen Abteilung der Klinik und Poliklinik für Parodontologie, insbesondere Frau Dr. rer. medic. Ulrike Peters, stand mir bei der Durchführung des praktischen Teils stets mit Rat und Tat zur Seite – vielen Dank hierfür.

Großer Dank gebührt meinem Vater für die unermüdliche Unterstützung bei allen computertechnischen Problemen - ohne ihn wäre ich so manches Mal verloren gewesen.

Ganz besonders herzlich aber möchte ich meinem Mann Uwe, meinen Eltern und meinen Freunden für ihr wohlthuendes Dasein zu jeder Zeit und ihre diversen Anstöße zum Durchhalten danken.

## 8. Lebenslauf



## 9. Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Seite 2
Abbildung 2	Seite 11
Abbildung 3	Seite 21
Abbildung 4	Seite 28
Abbildung 5	Seite 29
Abbildung 6	Seite 31
Abbildung 7	Seite 37
Abbildung 8	Seite 38
Abbildung 9	Seite 44

### 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Seite 6
Tabelle 2	Seite 17
Tabelle 3	Seite 19
Tabelle 4	Seite 34
Tabelle 5	Seite 41