

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Kulturunabhängige Analyse der subgingivalen bakteriellen
Flora bei Hypophosphatasiepatienten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Giuseppe Valenza
aus Palermo/Italien

Würzburg, Mai 2003

Referent: Prof. Dr. med. U. Vogel

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. U. Schlagenhauf

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2003

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Hypophosphatasie	1
1.2. Parodontitis	2
1.2.1. Klassifizierung der Parodontalerkrankungen	2
1.2.2. Pathogenese	3
1.2.2.1. Pathogenitätsfaktoren von Parodontalkeimen	5
1.3. Assoziation zwischen Hypophosphatasie und Parodontitis	7
1.4. Molekulare Phylogenie	9
1.4.1. Phylogenie der Bakterien	9
1.5. Anwendung der 16S rRNA Technologie in der Umweltmikrobiologie und bei Bakterien höherer Lebewesen	10
1.5.1. Studium der parodontalen Flora mittels 16S rRNA Analyse	10
1.6. Technische Probleme bei der Anwendung der 16S rRNA Technologie	11
1.7. Fragestellung	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Material	14
2.1.1. Geräte	14
2.1.2. Verbrauchsmaterial	15
2.1.3. Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme	16
2.1.4. Puffer und Lösungen	17
2.1.5. Nährmedien	18
2.1.6. Kulturbedingungen	20
2.1.7. Plasmid PCR-Script Amp SK (+)	20
2.1.8. Oligonukleotide	20
2.2. Methoden	21
2.2.1. Parodontalstatus der Patienten mit Hypophosphatasie	21

2.2.2. Materialverarbeitung subgingivaler Patientenproben	22
2.2.3. DNA-Extraktion aus den Proben	22
2.2.4. Universelle PCR	22
2.2.4.1. Universelle PCR: 27f/519r	23
2.2.4.2. Universelle PCR : 515f/1525r	24
2.2.4.3. Aufreinigung der PCR-Produkte	25
2.2.5. Klonierung	25
2.2.5.1. Polishing	26
2.2.5.2. DNA-Ligation	26
2.2.5.3. Durchführung der Elektroporation	28
2.2.5.4. Amplifikation der PCR-Script Amp SK (+)	28
2.2.6. Automatisierte DNA-Sequenzierung	29
2.2.7. Sequenzanalysen	30
2.2.8. Statistik	30
2.2.9. Taxonomie	31
3. ERGEBNISSE	31
3.1. Molekulare Untersuchungen	31
3.2. Eigenschaften der 16S rRNA Genbanken	31
3.3. Taxonomie	32
3.4. Unterschied der bakteriellen Familien in den zwei Genbanken	35
3.5. Vergleich der Häufigkeit der putativen Parodontalpathogene bei den Hypophosphatasiepatienten und Parodontitispatienten vorheriger Studien	36
4. DISKUSSION	42
4.1. Fragestellung	42
4.2. Patientenkollektiv	42
4.3. Untersuchungsprotokoll	43
4.4. Bakterielle Diversität bei Hypophosphatasiepatienten	44

4.5. Vergleich der bakteriellen Diversität bei Hypophosphatasie- und Parodontitispatienten vorheriger Studien	44
4.6. Analyse der Parodontalflora des Hypophosphatasiekollektivs durch Dot-Blot Technik	45
4.7. Parodontitisnachweis beim Hypophosphatasiekollektiv	47
5. ZUSAMMENFASSUNG	49
6. LITERATURVERZEICHNIS	50
DANKSAGUNG	
LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG

1.1. Hypophosphatasie

Die Hypophosphatasie ist eine seltene autosomale rezessive angeborene Erkrankung, die mit einer Prävalenz ca. 1/100.000 auftritt. Sie wird durch eine Punktmutation des Gens der Gewebe-unspezifischen alkalischen Phosphatase (TNSALP) auf Chromosom 1 verursacht (Whyte, 1995). Obwohl im TNSALP-Gen von Patienten mit Hypophosphatasie 65 verschiedene Arten von Punktmutationen identifiziert worden sind, ist ihre Assoziation mit dem Schweregrad der Erkrankung noch nicht geklärt (Orimo *et al.* 2001). Bezüglich der Symptome und des Alters der Patienten werden fünf klinische Formen der Hypophosphatasie unterschieden: die perinatal-foetale, die frühinfantile, die infantil-juvenile und die adulte Verlaufsform. Die perinatal-foetale ist die schwerste Form und oft mit Fehlgeburten assoziiert. Die frühinfantile Form manifestiert sich innerhalb von sechs Monaten nach Geburt, die Prognose ist schlecht aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz. Die Symptomatologie der infantil-juvenilen Form besteht aus Schwäche und Schmerzen der Beinmuskeln, Fehlstellung der Beine (Valgus- oder Varusstellung), Knochenschwäche, Frakturprädisposition. Von zahnärztlicher Relevanz ist eine Zementhypoplasie mit Prädisposition zum frühen Verlust der Milchzähne sowie zu Karies und Parodontitis. Die adulte Form tritt im mittleren Alter auf und hat einen milden Verlauf (Whyte, 1995).

Die TNSALP metabolisiert Substrate wie Pyridoxalphosphat und Phosphoethanolamin. Bei funktionell relevanter Mutation der TNSALP lagern sich diese Stoffen in kristalliner Form in Gelenken und in Knochen ab. Die Konsequenz ist die Auslösung einer Entzündungsreaktion mit Prostaglandinausschüttung durch lokale Chondrozyten, Synoviozyten und Osteoblasten. Die Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle für das Auftreten der Symptome. Sie verursachen unter anderem Knochenresorption und Schmerz (Dayer *et al.* 1997; Girschick *et al.* 1999; Whyte, 1994).

Die Diagnose wird mit Hilfe von Laborparametern gestellt. Typischerweise zeigt sich ein Mangel von TNSALP im Serum, eine Leukozytopenie, eine Erhöhung der Phosphoethanolamin- und der Prostaglandin E₂-Werte im Urin, sowie eine Abnahme der Knochendichte. Letztere kann mittels peripherer quantitativer Computertomographie bestimmt werden (Whyte, 1995). Die Therapie erfolgt mit nichtsteroidalen Antiphlogistika. Durch Hemmung der Prostaglandinausschüttung wirken nichtsteroidale Antiphlogistika sehr gut gegen Knochenresorption und Schmerz (Girschick und Seyberth 1999).

1.2. Parodontitis

Die Parodontitis ist eine Entzündung des Parodonts, die durch eine polymikrobielle Infektion verursacht wird. Zu den mit der Parodontitis assoziierten Bakterien werden *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Treponema socranskii*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* und *Eikenella corrodens* gezählt (Darveau *et al.* 1997). Die hauptsächlichsten klinischen Zeichen einer Parodontitis sind *Attachment*-Verlust (*Attachment*: Bindung der Wurzeloberfläche an den Alveolarknochen), alveolare Knochenresorption, Entstehung parodontaler Taschen, gingivale Blutung und im Endstadium Zahnverlust. Unter den histopathologischen Zeichen werden innerhalb der parodontalen Tasche ein Kollagenfaserverlust und die Anwesenheit von Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen beobachtet (Flemmig 1999).

1.2.1. Klassifizierung der Parodontalerkrankungen

Bezüglich des Verlaufs der Parodontalerkrankung werden verschiedene klinische Formen der Parodontitis unterschieden: chronische Parodontitis; aggressive Parodontitis; rezidivierende Parodontitis (Armitage 1999; Flemmig 1999). Die chronische Parodontitis tritt üblicherweise nach dem 35. Lebensjahr auf.

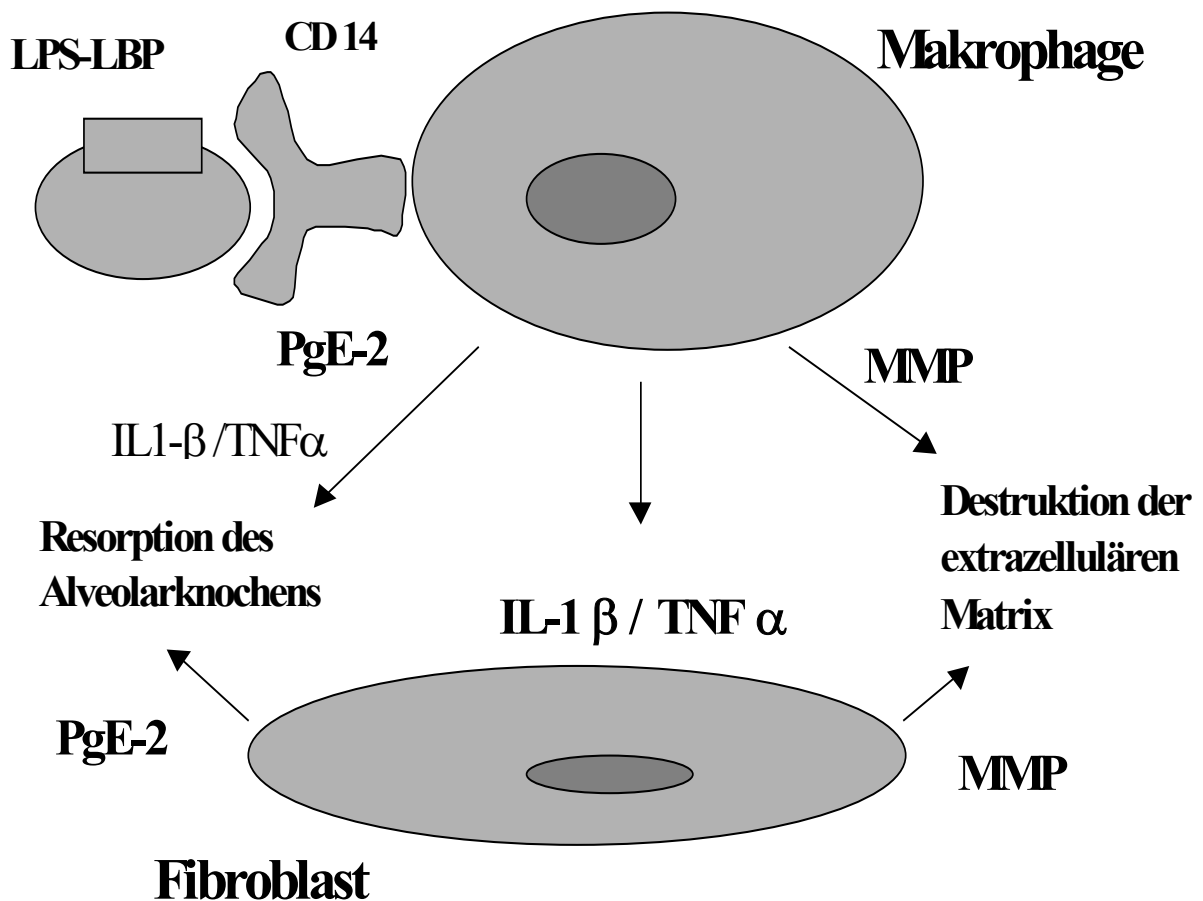
Diese Form ist durch eine vorwiegend langsame Progression charakterisiert. Sie kann mit Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus assoziiert sein. Weitere

Risikofaktoren sind Tabakrauchen und emotionaler Stress. Die aggressive Parodontitis ist durch eine rasch fortschreitende Gewebedestruktion charakterisiert. Unter den putativen Erregern kommt häufig *Actinobacillus actinomycetemcomitans* vor. Diese Form ist oft mit einer abnormalen Phagozytenfunktion assoziiert. Die rezidivierende Parodontitis ist eine Sonderform der chronischen Parodontitis, die trotz adäquater chirurgischer und konservierender Behandlung fortschreitend verläuft; eine angeborene Störung der Leukozytenchemotaxis und der Phagozytosemechanismen liegt bei dieser Form häufig vor (Armitage 1999; Flemmig 1999).

1.2.2. Pathogenese

Schlechte Mundhygiene bei gleichzeitigem Vorhandensein anderer Risikofaktoren wie z.B. Rauchen und angeborener oder erworbener Fehlfunktionen des Immunsystems verursacht eine Veränderung der normalen parodontalen Flora durch pathogene gramnegative, anaerobe Bakterienarten, insbesondere *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* (Salvi *et al.* 1997). Die dauernde Freisetzung von gramnegativen Zellwandbestandteilen in die Mundhöhle verursacht eine unspezifische Reaktion der Immunabwehr. Makrophagen sezernieren nach Stimulation durch Lipopolysaccharid das Prostaglandin E₂ (PgE₂) und die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α , die die parodontale Knochenresorption vermitteln (Gemmell *et al.* 1997; Page *et al.* 1997). Solche Zytokine fördern durch endotheliale Expression von E-Selektin die Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen (Darveau *et al.* 1995). Des Weiteren induzieren sie die Freisetzung von PgE₂ sowie von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) der gingivalen Fibroblasten. Die Folge ist eine Förderung der Alveolarknochenresorption und Destruktion der extrazellulären Matrix im Sulkusbereich (Page *et al.* 1997). Durch LPS wird der alternative Weg des Komplements ausgelöst, welcher Leukozyten aktiviert und die Opsonierung von Bakterien fördert (Dennison *et al.* 1997) (siehe Abb.1).

Abb.1: Pathogenese der Parodontitis. Makrophagen sezernieren nach Stimulation durch Lipopolysaccharid Prostaglandin E2 (PgE2) und proinflammatorischen Zytokine (IL-1 β und TNF α). Solche Zytokine induzieren die Freisetzung von PgE2 sowie von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) der gingivalen Fibroblasten. Die Folge ist eine Förderung der Resorption des Alveolarknochens und Destruktion der extrazellulären Matrix im Sulkusbereich (nach Page *et al.* 1997).



1.2.2.1. Pathogenitätsfaktoren von Parodontalkeime

Insbesondere für die parodontalen Pathogene *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* sind eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren beschrieben worden, die in folgender zusammengefasst werden (siehe Tab.1). Die Kolonisation des Sulkusepithels von *A. actinomycetemcomitans* wird durch Bakterioxine begünstigt, die andere Bakterien der Parodontalflora wie *Streptococcus sanguis* und *Actinomyces viscosus* eliminieren (Hammond *et al.* 1987). Die folgende Adhäsion an dem Sulkusepithel wird durch Fimbrien vermittelt (Rosan *et al.* 1988). Gleichzeitig wird die Immunantwort des Wirts mittels Leukotoxin, Fc-bindende Proteine und Chemotaxisinhibitor inhibiert. Das Leukotoxin zerstört Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten (Zambon *et al.* 1983). Die Fc-bindenden Proteine binden an das Fc-Fragment der Immunglobuline und hemmen als Folge die Opsonisierung (Mintz *et al.* 1994). Die Chemotaxisinhibitor verhindern die Rekrutierung der Leukozyten im Entzündungsbereich (Van Dyke *et al.* 1982). Als Invasionsfaktoren werden von *A. actinomycetemcomitans* Zytotoxine und Kollagenase gebildet. Sie vermitteln das Eindringen des Keimes im Sulkusbereich. Die Zytotoxine zerstören die Epithelzellen des Saumepithels und die Fibroblasten (Helgeland *et al.* 1993), die Kollagenase spaltet das Kollagen der extrazellulären Matrix des Bindegewebes (Page *et al.* 1973). Wichtig ist auch die Fähigkeit von *A. actinomycetemcomitans*, die gingivalen Epithelzellen zur aktiven Aufnahme der Bakterien zu veranlassen. Die Bakterien treten in die Epithelzellen durch einen Phagozytose-ähnlichen Prozess über Vakuolen ein und vermehren sich im Zytosol nach der Zerstörung der Vakuolmembran. Die freigesetzten Bakterien können die benachbarten Zellen infizieren. Die befallenen Zellen werden schließlich zerstört (Christersson *et al.* 1987; Saglie *et al.* 1986).

P. gingivalis bindet an die Sulkusepithelzellen ebenfalls mittels Fimbrien (Lee *et al.* 1991; Sojar *et al.* 1991). Die Phagozytose von *P. gingivalis* durch Makrophagen im Sulkusbereich wird von der Kapsel des Keimes gehemmt (Sundqvist *et al.* 1991; van Winkelhoff *et al.* 1993). Verschiedene sezernierte Enzyme von *P. gingivalis*

vermitteln durch hydrolytische, proteolytische und lipolytische Wirkung die Zerstörung des Parodontalgewebes (Grenier *et al.* 1993; Holt *et al.* 1991; Kuramitsu *et al.* 1995; Yamamoto *et al.* 1996). Solche Enzyme werden nach ihren katalytischen Eigenschaften in Serin-, Aspartat-, Thiol- und Metallo-Proteinasen eingeteilt (Holt *et al.* 1999). Zu diesen Proteinasen werden die *trypsin like*-Proteasen gezählt. Diese Enzyme können die Komplementfaktoren C3 und C5 sowie die Immunglobuline G und M des Wirts inaktivieren (Discipio *et al.* 1996; Grenier *et al.* 1992; Travis *et al.* 1997).

Bei der Parodontitis sind die auf der Zahnwurzel siedelnden Bakterien in komplexen Biofilme organisiert. Der Biofilm ist eine bakterielle Gemeinschaft, die in einer extrazellulären Matrix eingewickelt ist. Es ist anzunehmen, daß die Genexpression der am Biofilm beteiligten Bakterien durch die Einbindung in den Biofilm modifiziert wird (Costerton *et al.* 1999; Frias *et al.* 2001; Fuqua *et al.* 1996). An diesem Phänomen ist das *Quorum Sensing* beteiligt. Die Genexpression von *Pseudomonas aeruginosa* in planktonischen Zellen und im Biofilm wurde in einer Studie durch *DNA-Mikroarrays* analysiert. Die Studie zeigte eine unterschiedliche Expression in 1% der Gene der zwei Wachstumsformen. Die Synthese von Pili und Flagellen ist z.B. in den Biofilmzellen unterdrückt. Pili und Flagellen spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Biofilmentwicklung, aber nicht in der Biofilmerhaltung (Whiteley *et al.* 2001). Eine durch die Biofilmorganisation erzielte Resistenz von Bakterien gegen Komplement, Antibiotika, und neutrophilen Granulozyten konnte bewiesen werden (Anwar *et al.* 1989; Anwar *et al.* 1992; Jensen *et al.* 1993; Stewart *et al.* 2001; Whiteley *et al.* 2001). Vermutlich werden tief im Biofilm eingebettete Bakterien durch die als mechanische Barriere wirkende Matrix vor Faktoren des Immunsystems und vor Antibiotika geschützt. Des Weiteren wird die Umweltresistenz dieser Bakterien durch ihre reduzierte metabolische Aktivität erhöht. Lytische Enzyme, die von Makrophagen und Granulozyten sezerniert werden, haben keinen Effekt auf Keime. Sie zeigen jedoch eine gewebsdestruierende Wirkung.

Tabelle 1: Virulenzfaktoren von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>
Kolonisationsfaktoren:	Adhesine, Bakterioxine	Adhesine
Wirtimmunantwort interferierende Faktoren:	Leukotoxin, Fc-bindende Proteine, Chemotaxishemmer	Kapsel, Immunoglobulinproteinase, Chemotaxishemmer
Zerstörende Wirtsgewebefaktoren:	Zytotoxine, Kollagenase, LPS-induzierte Knochenresorption, intrazelluläres Wachstum	Kollagenase, Trypsin like Protease, Gelatinase, Aminopeptidase, Phospholipase A, Chondroitin sulfatase, Hyaluronidase, Keratinase, Nuklease, LPS- induzierte Knochenresorption

1.3. Assoziation zwischen Hypophosphatasie und Parodontitis

Eine Assoziation zwischen Hypophosphatasie und Parodontitis wird seit längerem vermutet. Die Literatur hierzu besteht allerdings ausschließlich aus Fallberichten. Baab *et al.* haben drei Geschwister mit Hypophosphatasie und vorzeitigem Verlust der vorderen Milchzähne untersucht. Die Studie zeigte eine Alteration der Monozytenchemotaxis und wies Antikörper gegen verschiedene Parodontitiseime bei allen Kinder auf (Baab *et al.* 1985; Baab *et al.* 1986). Watanabe *et al.* haben ein Kind mit Hypophosphatasie, vorzeitigem Verlust der vorderen Milchzähne und Alveolarknochenresorption untersucht. In diesem Kind wurden Antikörper gegen *Porphyromonas gingivalis* und *Fusobacterium nucleatum* nachgewiesen (Watanabe H. *et al.* 1993). Eine Hypothese über die Assoziation zwischen Hypophosphatasie und Parodontitis wurde von Page und Baab aufgestellt. Nach Page und Baab stört die mit der Hypophosphatasie assoziierte Zementhypoplasie die Bindung der Wurzeloberfläche an den Alveolarknochen. Dadurch wird das Eindringen der Bakterien in den subgingivalen Raum erleichtert und die Entwicklung einer Parodontitis begünstigt (Page *et al.* 1985). In einer Studie von Blomlöf wurden die extrahierten Zähne von 11 Patienten mit lokalisierter und

generalisierter juvenile Parodontitis durch *scanning* Elektronen- Mikroskopie (SEM) analysiert. Die Untersuchung wies interessanterweise besonders bei Patienten mit einer weitläufigen Knochenresorption eine massive Zementhypoplasie auf. Allerdings wurden die Patienten nicht weiter auf das Vorliegen einer Hypophosphatasie untersucht (Blomlöf *et al.* 1986). In einer weiteren Studie wurden bei 18 Patienten mit einer *Early-Onset* Parodontitis die Werte der TNSALP im Serum und der Phosphoethanolamine im Urin bestimmt. Die Werte der TNSALP lagen bei fast allen Patienten im Normbereich. Die Phosphoethanolamine konnten bei keinem der Patienten im Urin nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Befunde konnte bei den oben genannten Patienten eine Hypophosphatasie ausgeschlossen werden, und deswegen wurde die Assoziation zwischen Hypophosphatasie und Parodontitis angezweifelt. (Machtei *et al.* 1994). Es ist aber wegen der niedrigen Prävalenz der Hypophosphatasie (1/100.000 in den USA) im Vergleich zur juvenilen Parodontitis (500/100.000 in den USA) nicht davon auszugehen, dass Hypophosphatasie ein bedeutender Risikofaktor für Parodontitis ist (Loe *et al.* 1991; Whyte, 1995). Es sollte gefragt werden, ob Hypophosphatasiepatienten selbst vermehrt unter Parodontitis leiden. Hierfür liegt in der Literatur keine ausreichende Evidenz vor. Insbesondere mangelt es an mikrobiologischen Studien.

1.4. Molekulare Phylogenie

Emile Zuckerkandl und Linus Pauling stellten 1965 die Hypothese auf, dass Moleküle als Nachweise der Evolutionsgeschichte verwendet werden können (Zuckerkandl und Pauling 1965). Jahre später schlug Carl Woese die 16S rRNA als phylogenetisches Markermolekül vor und entwickelte die ersten 16S rRNA basierte Stammbäume zur Darstellung phylogenetischer Verwandtschaften zwischen Prokaryonten (Woese 1987). Ein phylogenetisches Markermolekül muss die folgende Eigenschaften haben: Es muß in allen Organismen anwesend sein, seine Sequenz muss konservierte Regionen enthalten und lang genug sein, um eine phylogenetische Analyse zu ermöglichen. Die 16S rRNA erfüllt die oben genannten Bedingungen (Woese 1987).

1.4.1. Phylogenie der Bakterien

Im *Bergey's Manual* (Garrity et al. 2001) gründen die phylogenetischen Beziehungen zwischen Prokaryonten auf 16S rRNA Stammbäumen. Die Domäne Bacteria besteht aus 23 Phyla, und jedes Phylum ist in Klasse, Ordnung, Familie, Gattung und Spezies aufgeteilt. Die Tab. 2 zeigt als Beispiel die Phylogenie von *Porphyromonas gingivalis*.

Tabelle 2: Phylogenie von *Porphyromonas gingivalis*.

Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung	Spezies
BXX- <i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>P.gingivalis</i>

1.5. Anwendung der 16S rRNA Technologie in der Umweltmikrobiologie und bei Bakterien höherer Lebewesen

Die 16S rRNA Analyse ermöglicht eine akurate Untersuchung gemischter bakterieller Gemeinschaften, die in der Umwelt und in Lebewesen vorkommen. Zahlreiche Studien dieser Gemeinschaften, basierend auf 16S rRNA Analyse, sind in der Literatur beschrieben (siehe Tab.3).

Tabelle 3: Studien gemischter bakterieller Gemeinschaften mittels 16S rRNA

Studien	Mikrobielle Gemeinschaft
Chapelle <i>et al.</i> 2002	hydrothermale Gewässer
Giovannoni <i>et al.</i> 1995	ozeanische Systeme
Hughenholz <i>et al.</i> 1998; Ward <i>et al.</i> 1990	heiße Quellen
Leser <i>et al.</i> 2002	Schweinedarm
Zhu <i>et al.</i> 2002	Huhndarm
Paster <i>et al.</i> 2001; Hutter <i>et al.</i> 2003	Subgingivale Plaque des Menschen

1.5.1. Studium der parodontalen Flora mittels 16S rRNA Analyse

Es wurde schon Anfang der 90er Jahre geschätzt, dass ungefähr 500 bakterielle Spezies die Mundhöhle besiedeln (Moore *et al.* 1994; Socransky *et al.* 1994). Die Mehrheit dieser Organismen sind Kommensale. Nur einige von ihnen wirken unter besonderen Bedingungen als opportunistische Pathogene und sind in oralen und systemischen Krankheiten involviert. Orale Bakterien sind zum Beispiel an der bakteriellen Endokarditis (Berbari *et al.* 1997), an der Aspirationspneumonie (Scannapieco, F.A. 1999), und an der Osteomyelitis bei Kindern (Dodman *et al.* 2000) beteiligt. Die Anwendung der 16S rRNA Technologie hat gezeigt, dass die durch kulturelle Methode identifiziert bakterielle Diversität unterschätzt wurde. In der Tat sind unter den oralen Bakterien nicht alle kultivierbar. Verschiedene Studien zeigten, dass 75% der oralen *Treponema* Spezies nicht kultivierbar sind

(Choi *et al.* 1994; Dewhirst *et al.* 2000). Zahlreiche Studien der parodontalen Flora mittels 16S rRNA Analyse wurden in der Literatur beschrieben. In einer von diesen Studien wurden an einem einzigen Patienten mit Parodontitis 59 Phylotypen nachgewiesen, die zu den bakteriellen Klassen *Bacilli*, *Chlostridia*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Spirochaetes* und *Chlamidiae* gehören (Kroes *et al.* 1999). In zwei Patienten wurden von Sakamoto *et al.* *Bacilli*, *Chlostridia*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroides* und *Spirochaetes* nachgewiesen, die jeweils eine Erwachsene-Parodontitis und eine aggressive Parodontitis hatten (Sakamoto *et al.* 2000). In einer weiteren Studie wurde mittels 16S rRNA Analyse die bakterielle Diversität der subgingivalen Plaque bei gesunden Probanden und bei Patienten mit rezidivierender Parodontitis, Erwachsenenparodontitis, HIV-Parodontitis, akuter nekrotisierender ulzerativer Gingivitis (ANUG) bestimmt. Die Studie wies unter anderem Bakterien der Klassen *Deferribacteres* und *Mollicutes* nach, zudem wurde mit Hilfe von spezifischen Primerpaaren, die Kenntnis der Diversität der *Spirochaetes* und *Bacteroides* Spezies gefördert, die an der Parodontitis beteiligt sind. Insgesamt sind 347 Phylotypen identifiziert worden, von denen 40% ganz neu entdeckt wurden (Paster *et al.* 2001). Im Rahmen einer Studie am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg wurde unter Beteiligung des Promovenden eine umfassende Evaluation von 16S rRNA Genbanken durchgeführt, und es konnten vierzehn bisher unbekannte Phylotypen detektiert werden. Im Vergleich zu Gesunden wurde insbesondere für *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema socranskii*, *Filifactor alocis* und *Dialister pneumosintes* eine Korrelation zur Parodontitis herausgearbeitet (Hutter *et al.* 2003).

1.6. Technische Probleme bei der Anwendung der 16S rRNA Technologie

Die bakterielle Diversität der parodontalen Flora, deren Nachweis mittels der 16S rRNA Analyse erreicht wird, ist von verschiedenen technischen Faktoren beeinflusst. Zu diesen Faktoren werden hier gezählt: Die Lyse der Zellen und DNA-Extraktion (Picard *et al.* 1992), *Template*-Zusammensetzung (Giovannoni *et al.*

1995; Reysenbach *et al.* 1992; Suzuki *et al.* 1995), Wahl der Primer (Giovannoni *et al.* 1995; Suzuki *et al.* 1995), Anzahl der Amplifikationszyklen (Suzuki *et al.* 1995), Entstehung von Chimären (Giovannoni *et al.* 1995; Kopczynsky *et al.* 1994; Larsen *et al.* 1993), Anzahl der untersuchten Klone (Giovannoni *et al.* 1995; Good I.J. 1953). Die Lyse der Zellen zur DNA-Extraktion ist besonders erschwert bei Mikroorganismen mit einer dicken Zellwand. Um den Gewinn der DNA zu optimieren, wurden verschiedene Lysetechniken wie z.B. Ultraschallbehandlung, Mikrowellen-Erhitzung, thermaler Schock vorgeschlagen (Picard *et al.* 1992). In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass die 16S rRNA Gene von Mikroorganismen mit einem großen Anteil an Guanin und Cytosin schlecht amplifizierbar sind. In der Tat behindert ein großer Anteil an Guanin und Cytosin die Denaturierung der DNA während der PCR. Eine Folge dieser Tatsache könnte die Unterschätzung der Anzahl der oben genannten Mikroorganismen in einer 16S rRNA Genbank sein. Um diesen unerwünschten Effekt zu minimieren, kann dem PCR-Ansatz Acetamide zugegeben werden (Giovannoni *et al.* 1995; Reysenbach *et al.* 1992; Suzuki *et al.* 1995). Die am häufigsten verwendeten 16S rRNA Primer enthalten Ambiguitäten an einzelnen Sequenzpositionen, an denen Polymorphismen bekannt sind. Ein Einfluß der Verwendung solcher Primer auf die Biodiversität ist nicht auszuschließen (Giovannoni *et al.* 1995; Suzuki *et al.* 1995). Ein anderer Faktor ist die Anzahl der Amplifikationszyklen. Die PCR-abhängige Amplifikation verhält sich exponentiell. Demzufolge verschiebt sich das Verhältnis zwischen den verschiedenen bakteriellen Spezies mit Zunahme der Zyklen zugunsten der häufiger vertretenen Spezies. Hingegen wird der Nachweis von seltenen bakteriellen Spezies schwieriger (Suzuki *et al.* 1995). Während einer PCR ist die Entstehung von chimären DNA-Sequenzen möglich. Wenn nach einem PCR-Zyklus ein *Template* nicht ganz kopiert wird, kann im nächsten Zyklus die partielle Kopie eine konservierte Region eines ganz anderen *Template* hybridisieren, der für die weitere Synthese des Gens verwendet wird. Die Folge ist die Entstehung einer Chimäre. Die Identifizierung von Chimären kann

durch Computerprogramme unterstützt werden (Giovannoni *et al.* 1995; Kopczynsky *et al.* 1994; Larsen *et al.* 1993).

1.7. Fragestellung

Ziel dieser Studie war die kulturunabhängige Analyse der bakteriellen Diversität der subgingivalen Plaque bei einem Kollektiv aus sieben männlichen Patienten mit einer infantil-juvenilen Hypophosphatasie. Das Alter der Patienten lag zwischen 7 und 23 Jahren. Das Kollektiv wurde über mehrere Jahre vom Priv. Doz. Dr. H.J. Girschick der Kinderklinik der Universität Würzburg betreut und in mehreren Arbeiten dokumentiert (Girschick *et al.* 1999; Girschick *et Seyberth* 1999; Orimo *et al.* 2001). Es sollten mikrobiologische Evidenzen für oder gegen die Hypothese einer frühen Parodontitis bei Hypophosphatasie-Patienten gewonnen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Brutschränke

B 6200 (Heraeus, Hanau)

Elektrophoresekammern

DNA Subcell™ (BioRad, München)

Wide Mini-Subcell™ (BioRad, München)

Geräte zur Elektroporation

Gene Pulser™ (BioRad, München)

Pulse Controller™ (BioRad, München)

Heizblöcke

BT1 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

Schüttelinkubatoren

Certomat H (B.Braun)

Sequenziergeräte

ABI Prism™ Sequencer 310 und 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Spannungsgeräte

Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia, Freiburg)

Power Supply 3000Xi (BioRad, München)

Speed Vac[®] Plus SC110A (Savant, New York, USA)

Gel Dokumentationssystem

UVT-28 MP (Herolab, Wiesloch)

ICU-1 (Herolab, Wiesloch)

Thermocycler

TRIO (Biometra, Göttingen)

Primus 96 plus (MWG/ Biotech)

Zentrifugen

Biofuge 15 (Heraeus, Hanau)

Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Elektroporationsküvetten, 0,2 cm (Eurogentec, Seraing, Belgien)

0,5-1,5-2,0 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)

Pipettenspitzen mit Filter 10-100-1000 µl (Peq Lab, Erlangen)

2.1.3. Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

von AppliChem, Heidelberg

Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)
X-Gal

von Bayer, Leverkusen

Ampicillin (Binotal[®])

von Eurogentec, Seraing, Belgien

Smart-Ladder

von Perkin Elmer, Weiterstadt

Ampli Taq Gold DNA-Polymerase
AmpliTaq[®]
10x PCR Buffer II
MgCl₂

von Peq Lab, Biotechnologie, Erlangen

dNTPs

von Qiagen, Hilden

QIAamp DNA Blood mini Kit
QIAprep Spin Miniprep Kit
QIAquick Gel Extraction Kit
QIAquick PCR Purification Kit

von Roth, Karlsruhe

Agarose NEE0

von Stratagene, La Jolla, CA, USA

PCR Script Amp cloning Kit

2.1.4. Puffer und Lösungen

GEBS

20	%	Glycerin
50	mM	EDTA
0,05	%	Bromphenolblau
0,5	%	N-Lauroylsarkosin

PBS

10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4
140 mM NaCl

1xTBE

100 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM Borsäure
2,5 mM EDTA, pH 8,3

TE (10/1)

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.5. Nährmedien

LB-Broth-Base, Invitrogen, Paisley, Schottland

LB-Agar, Invitrogen, Paisley, Schottland

Rich-Treponema-Fluid (RTF)

Lösung 1	75 ml
Lösung 2	75 ml
0,1 M EDTA	10 ml
8% Natriumcarbonat Na_2CO_3	5 ml
1% Dithiothreitol	20 ml
Glukose	250 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Lösung 1

0,6% di-Kaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4

Lösung 2

1,2% NaCl

1,2% Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,6% Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4

0,25% Magnesiumsulfat MgSO_4

pH 7,0

SOB-Medium

2 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

SOC-Medium

SOB-Medium + 20 mM Glucose

10 mM MgCl_2

10 mM MgSO_4

2.1.6. Kulturbedingungen

Alle Inkubationen erfolgten bei 37 °C. Escherichia coli (Stamm DH5α) wurde auf LB-Agar inkubiert. Zur Selektion rekombinanter Bakterienstämme wurde dem Medium Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt.

2.1.7. Plasmid PCR-Script™Amp SK(+)

Das PCR-Script™Amp SK(+) ist ein Derivat des pBluescript®II SK(+) mit zusätzlicher Srf I-Schnittstelle zur Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Enden.

2.1.8. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von ARK Scientific, Darmstadt bezogen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Oligonukleotide

PRIMER	SEQUENZ 5'-3'	SPEZIFITÄT	POSITION	LITERATUR
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Eubakterielle 16S rRNA	8-27	Lane et al.1991
519r	GWATTACCGCGGCKGCTG	Eubakterielle 16S rRNA	536-519	Lane et al.1991
515f	GTGCCSGCMGCCGCGCTAA	Eubakterielle 16S rRNA	515-533	Kroes et al.1999
1525r	AAGGAGGTGATCCAGCC	Eubakterielle 16S rRNA	1541-1525	Kroes et al.1999
329	ACCATGATTACGCCAAGC	PCR Script™ Amp SK (+)	813-796	
KB9	AATACGACTCACTATAGGGC	PCR Script™ Amp SK (+)	617-646	

2.2. Methoden

2.2.1. Parodontalstatus der Patienten mit Hypophosphatasie

In dieser Arbeit wurde die subgingivale Flora bei Hypophosphatasiepatienten und ihren Angehörigen bestimmt. Die klinische Untersuchung der Probanden erfolgte durch Kooperationspartner und wird daher an dieser Stelle vorgestellt. Bei sieben männlichen Patienten mit einer infantil-juvenilen Hypophosphatasie und ihren Eltern und Geschwistern wurde von Prof. Dr. U. Schlagenhauf und seinen Mitarbeitern (Abteilung von Parodontologie, Universität Würzburg) der Parodontalstatus erhoben. Das Alter der Patienten lag zwischen 7 und 23 Jahren. Alle Patienten berichteten über einen vorzeitigen Verlust der vorderen Milchzähne (durchschnittliches Alter des Zahnverlusts: 2,6 Jahre). Keiner der Patienten wurde in den zwei Monaten vor der Untersuchung mit Antibiotika oder mit nichtsteroidalen Antiphlogistika behandelt. Die Werte der PgE2-Konzentration im Urin waren zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht erhöht (Priv. Doz. Dr. H.J. Girschick der Kinderklinik der Universität Würzburg: persönliche Mitteilung). Die klinische Untersuchung bestand aus der Messung von zwei Entzündungsparametern: PPD (Pocket Probing Depth/Tiefe der Parodontaltasche) und BOP (Bleeding on Probing/Blutung während der Sondenuntersuchung) in sechs verschiedenen Mundregionen (distal-buccal, buccal, mesio-buccal, mesio-oral, oral, distal-oral). Die Parameter wurden mit der Einführung einer Sonde in die Parodontaltasche bestimmt. Die PPD-Werte waren nie größer als 5 mm. Patient 6 hatte einen mäßigen PPD (13,6% der untersuchten Stellen zeigten einen PPD von 4-5 mm). Die anderen Patienten hatten einen geringeren PPD (0,6% bis 4,6% der untersuchten Stellen hatten einen PPD von 4-5 mm). Die BOP-Werte waren niedrig außer im Patient 5 (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Ergebnisse der klinischen Untersuchung (Prof. Dr. U. Schlagenhauf und Dr. S. Burgemeister: persönliche Mitteilung, unveröffentlicht)

Patient Nr.	Alter (Jahre)	Anzahl der untersuchten Parodontpunkte	Alter des Verlusts der Milchzähne (Jahre)	Parodontpunkte mit PPD von 4-5 mm (%)	Parodontpunkte mit BOP (%)
1	7	108	2	4.6	6
2	11	90	2	0	0
3	7	102	3	2	2.9
4	23	102	nicht bekannt	0.6	0
5	18	102	3	3	10
6	13	102	3	13.6	3
7	11	102	1	4.5	8.3

2.2.2. Materialverarbeitung subgingivaler Patientenproben

Von jedem Patienten wurden vier subgingivale Plaqueproben (eine pro Mundquadrant) mit Papierspitzen gewonnen und unmittelbar nach Entnahme in vorreduziertes RTF (300 µl) gegeben. Die Vorreduktion des RTF erfolgte für 12 Stunden bei 4°C in Gefäßen unter anaeroben Bedingungen. Die Proben wurden auf Eis konserviert und baldmöglichst bei -20°C eingefroren. Im Folgenden wurden 50 µl pro Patientenprobe für die DNA-Extraktion gepoolt.

2.2.3. DNA-Extraktion aus den Proben

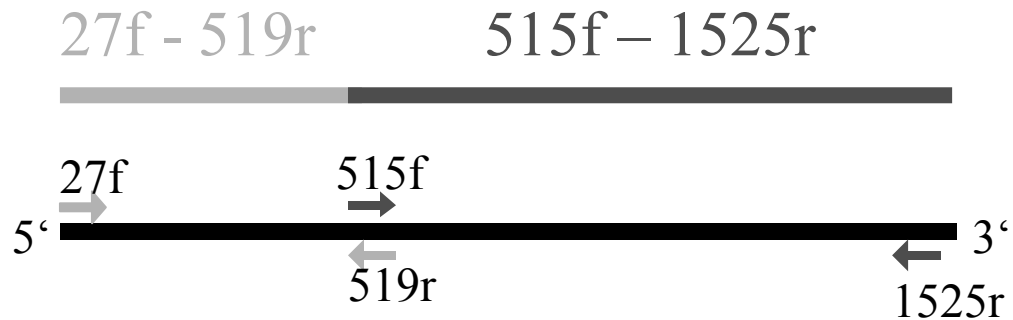
Die Extraktion von DNA erfolgte aus den Proben der Probanden mit Hilfe des QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Extraktion der DNA erfolgte aus 200 µl Probenvolumen.

2.2.4. Universelle PCR

Die Amplifikation der eubakteriellen 16S rRNA Gene erfolgte unter Verwendung der Primerpaare 27f/519r und 515f/1525r. Die Primerpaare binden an konservierte Regionen der 16S rRNA Gene aller eubakteriellen Mikroorganismen (Lane et al.1991; Kroes et al.1999). Eubakterielle 16S rRNA Gene sind ca. 1500 bp lang. Ein erster Abschnitt des Gens (circa 500 bp lang)

wurde mittels der 27f/519r PCR amplifiziert. Die Amplifikation des zweiten Abschnitts (circa 1000 bp lang) wurde mit Hilfe der 515f/1525r PCR durchgeführt (Abb. 2).

Abb. 2: Universelle PCR 27f/519r und 515f/1525r



2.2.4.1. Universelle PCR: 27f/519r

Jeder PCR-Ansatz wurde nach folgendem Schema angesetzt:

- 10 µl extrahierte DNA aus den Patientenproben als Template
- 5 µl 10 x PCR-Puffer II
- 3 µl MgCl₂ (25mM)
- 1 µl dNTP (2,5 mM pro dNTP)

1 µl Primer 27f (10 µM)

1 µl Primer 519r (10 µM)

0,4 µl Ampli Taq Gold (5U/µl)
ddH₂O ad 50 µl

Reaktionsablauf im Thermocycler:

1. Denaturierung 10 min. bei 95°C

2. Denaturierung 30 sec. bei 94°C

3. Annealing 60 sec. bei 55°C

4. Polymerase-Reaktion 90 sec. bei 72°C

5. Polymerase-Reaktion 20 min. bei 72 °C (abschließende Auffüllreaktion)

Die Schritte 2-4 wurden 20 mal durchlaufen.

2.2.4.2. Universelle PCR: 515f/1525r

Jeder PCR-Ansatz wurde nach folgendem Schema angesetzt:

10 µl extrahierte DNA aus den Patientenproben als Template

5 µl 10 x PCR-Puffer II

3 µl MgCl₂ (25mM)

1 µl dNTP (2,5 mM pro dNTP)
1 µl Primer 515f (10 µM)
1 µl Primer 1525r (10 µM)
0,4 µl Ampli Taq Gold (5U/µl)
ddH₂O ad 50 µl

Reaktionsablauf im Thermocycler:

1. Denaturierung 10 min. bei 95°C
2. Denaturierung 30 sec. bei 94°C
3. Annealing 60 sec. bei 58°C
4. Polymerase-Reaktion 90 sec. bei 72°C
5. Polymerase-Reaktion 10 min. bei 72 °C (abschließende Auffüllreaktion)

Die Schritte 2-4 wurden 36 mal durchlaufen.

2.2.4.3. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Isolierung amplifizierter DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Dieses Verfahren basiert auf der selektiven Bindung der DNA an Silikagel-Membranen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. 40 µl des PCR-Ansatz wurden den Angaben des Herstellers entsprechend behandelt. Die aufgereinigte DNA wurde mit 30 µl Elutionspuffer (EB) eluiert.

2.2.5. Klonierung

Die PCR-Produkte wurden mit dem PCR-Script Amp cloning kit entsprechend der Angaben des Herstellers kloniert. Die PCR-Fragmente werden in einen mit Srf I geschnittenen pPCR-Script Amp SK (+) cloning Vektor ligiert. Während der Ligation ist Srf I anwesend. Vektor-DNA, die mit sich selbst ligiert, wird auf diese Weise gleich wieder geschnitten, während die Schnittstelle durch die Insertion des PCR-Produktes zerstört wird und die gewünschte Ligationsprodukte vom Restriktionsverdau verschont bleiben. Die DNA-Erkennungsstelle des Restriktionsenzym Srf I umfasst acht Nukleotide. Die Wahrscheinlichkeit, dass im Fragment eine Srf I-Schnittstelle liegt, die ebenfalls geschnitten wird, ist dadurch relativ gering.

2.2.5.1. Polishing

Um die durch die universelle PCR entstandenen kohäsiven Enden in glatte Enden zu überführen, wurde die Pfu-DNA-Polymerase verwendet.

Der Versuchsansatz war wie folgt:

- 10 µl gereinigtes PCR-Produkt
- 1 µl 10mM dNTP-Mix (2,5mM)
- 1,3 µl 10xPolishing-Puffer
- 1 µl Pfu-DNA-Polymerase (0,5U/µl).

Reaktionsablauf im Thermocycler: 72 °C / 30 Min.

2.2.5.2. DNA-Ligation

Die Ligation der PCR-Fragmente in einen mit Srf I geschnittenen pPCR-Script Amp SK (+) cloning Vektor erfolgte mit Hilfe von T4-DNA Ligase. Die T4-DNA Ligase katalysiert die Verknüpfung zwischen einer 3'-Hydroxyl- und einer 5'-Phosphatgruppe zu einer Phosphodiesterbindung.

Der Versuchsansatz war wie folgt:

- 4 μ l blunt-end PCR-Produkt
- 1 μ l PCR-Script Amp SK(+) Vector (10 ng/ μ l)
- 1 μ l 10xReaction-Puffer
- 0,5 μ l 10mM rATP
- 1 μ l Srf I (5U/ μ l)
- 1 μ l T4 DNA Ligase (4U/ μ l)
- 1,5 μ l ddH₂O

Inkubation: 1 Stunde bei Raumtemperatur (22 °C).

Der Ligationsansatz wurde mit ddH₂O auf 100 μ l aufgefüllt, mit 250 μ l Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gut gemischt und zentrifugiert (2 min, 13414 xg/RT, Biofuge 15). Der Überstand wurde abgenommen und die Phenolphase erneut mit 50 μ l ddH₂O extrahiert, um die DNA möglichst quantitativ zurückzugewinnen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 150 μ l Diethylether versetzt, gemischt und zentrifugiert (5 min, 13414 xg/RT, Biofuge 15), um Phenolreste zu entfernen. Die Etherphase wurde unter einem Abzug entnommen, und geringfügige Etherreste wurden durch eine 10minütige Inkubation bei 37 °C im Heizblock verflüchtigt. Der DNA-Lösung (wässrige Phase) wurden 1/10 Volumen einer Acrylamid-Lösung (200 μ g/ml) als Carrier für die DNA sowie 1/10 Volumen 5 M NaCl zugesetzt. Die Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 540 μ l 100%igem Ethanol für 30 min bei -70 °C. Nach der Zentrifugation (15 min, 13414 xg, 4 °C, Biofuge 15 R) wurde das Sediment mit 70%igem Ethanol zweimal gewaschen und in der Speedvac getrocknet. Abschließend wurde der aufgereinigte Ligationsansatz in 10 μ l ddH₂O aufgenommen und für die Elektroporation verwendet.

2.2.5.3. Durchführung der Elektroporation

Für die Elektroporation wurden kompetente Zellen (Escherichia coli-Stamm DH5 α) nach Standardprotokoll hergestellt (Böttger et al.1988). 40 μ l der Zellsuspension ($2,5 \times 10^{12}$ CFU/ml) wurden auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 20-40 ng aufgereinigter DNA wurde die Mischung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm) pipettiert. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser™ (BioRad, München) unter den folgenden Einstellungen durchgeführt: 400 Ω , 25 μ F, 2,5 kV/cm. Die elektroporierten Bakterienzellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der Elektroporationsansatz wurde in geeigneten Aliquots auf Ampicillin-haltigem LB-Agar (100 μ g/ml) ausplattiert, unter Zusatz von 6 μ l IPTG (1M) und 8 μ l X-Gal (250 mg/ml in Dimethylformamid) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bakterienkolonien, in denen das LacZ-Gen des PCR-Script Amp SK(+) durch die Insertion eines DNA Fragments zerstört ist, bleiben nach Induktion mit IPTG weiß, da sie X-Gal nicht in ein blaues Produkt umsetzen können.

2.2.5.4. Amplifikation der PCR-Script Amp SK(+) Inserts durch PCR mit den Vektorprimer KB9 und 329

Die Inserts von PCR-Script Amp SK(+)-haltigen Escherichia coli Zellen wurden durch PCR mit den Vektorprimer Kb9 und 329 analysiert.

Jeder PCR-Ansatz wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- 5 μ l 10 x PCR-Puffer II
- 3 μ l MgCl₂ (25mM)
- 5 μ l dNTP (2 mM pro dNTP)

0,5 µl Primer KB9 (20 µM)

0,5 µl Primer 329 (20 µM)

0,2 µl Ampli Taq (5U/µl)

ddH₂O ad 50 µl

Reaktionsablauf im Thermocycler:

1. Denaturierung 10 min. bei 94°C
2. Denaturierung 60 sec. bei 94°C
3. Annealing 60 sec. bei 50°C
4. Polymerase-Reaktion 90 sec. bei 72°C
5. Polymerase-Reaktion 10 min. bei 72 °C (abschließende Auffüllreaktion)

Die Schritte 2-4 werden 36 mal durchlaufen.

2.2.6. Automatisierte DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte im DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie mit dem automatischen Sequenzierungsgerät ABI Prism™ Sequencer 310 für die PCR Produkte 27f-515r und mit dem ABI Prism™ Sequencer 377 für die PCR Produkte 515f-1525r nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode. Dem DNA-Labor wird ein Sequenzieransatz der zu untersuchenden Probe zur Verfügung gestellt.

Sequenzieransatz

ca.100 ng aufgereinigtes PCR-Produkt

(Abschätzung nach Agarosegel-Elektrophorese)

1 µl Primer (10 µM)
ddH₂O ad 8 µl

2.2.7. Sequenzanalysen

Die Chromatogramme der DNA-Sequenzen wurden mit den Sequenzierungsgeräten ABI Prism™ Sequencer 310 und 377 erstellt. Es folgte ein Vergleich der Sequenzen mit der GenBank Database durch den BLAST Server des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequenzen mit weniger als 99% Identität mit den Genbank Database Einträgen wurden mit dem Programm Chimera-Check des Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>) untersucht. Phylotypen (Gruppen von Sequenzen mit einer Identität größer oder gleich 99%) wurden mittels Alignment anhand des Clustal V Algorithmus (Lasergene sequence analysis software: Dnastar, Madison, WI, USA) ermittelt. Die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Similarity} = (100 \times \text{Consensus Length}) / (\text{Consensus Length} + \text{Mismatches} + \text{Gaps})$$

Alle Daten wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel dokumentiert. Zusätzlich wurden die Sequenzdaten distinkter Phylotypen in eine von einem Stand alone Blast-Server verwaltete Datenbank integriert (Hutter et al.2003). Der Stand alone Blast-Server ermöglichte einen Vergleich zwischen den Sequenzen dieser Studie und den Sequenzen vorheriger Studien (Hutter et al.2003; Paster et al.2001).

2.2.8. Statistik

Für den Vergleich relativer Häufigkeiten wurde der Fisher's exact test verwendet (Fisher's Exact Test; <http://www.matforsk.no/ola/fisher.htm>). Der Coverage wird bezeichnet als der Anteil einer hypothetischen Genbank von unendlicher Größe, der von einer experimentellen Genbank repräsentiert wird

(Giovannoni et al. 1995; Good I.J. 1953). Der Coverage der 16S rRNA Genbanken dieser Studie wurde mit der folgenden Formel bestimmt:

$$C=1-(n1/N) \times 100$$

C steht für Coverage; n1 ist die Anzahl der Phylotypen, die nur einmal erscheinen; N ist die Anzahl der Klone.

2.2.9. Taxonomie

Die in dieser Arbeit verwendete Taxonomie war die Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera (Garrity et al. 2001).

3. ERGEBNISSE

3.1. Molekulare Untersuchungen

In dieser Arbeit wurde bei sieben Patienten mit einer infantil-juvenilen Hypophosphatasie mit Hilfe von 16S rRNA Analyse die bakterielle Diversität der subgingivalen Plaque bestimmt. Subgingivale Plaqueproben wurden von jedem Patienten mit sterilen Papierspitzen entnommen. Anschließend folgte die DNA Extraktion aus den Plaqueproben und die Amplifikation der 16S rRNA Gene mittels zweier verschiedener universeller Primer-Paare: 27f/519r; 515f/1525r. Die PCR-Produkte wurden in *Escherichia coli* (Stamm DH5 α) kloniert. Nach einer weiteren Amplifikation der 16S rRNA Gene folgte die DNA-Sequenzierung und ein Vergleich der Sequenzen mit der *Genbank Database* durch den *BLAST-Server* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, MD, USA). Das hier verwendete Verfahren wurde zuvor unter Mitarbeit des Promovenden an Proben von Parodontitispatienten validiert (Hutter et al. 2003).

3.2. Eigenschaften der 16S rRNA Genbanken

Insgesamt wurden zwei verschiedene 16S rRNA Genbanken erstellt und 101 Klone pro Genbank identifiziert. Der Mittelwert der Sequenzlängen betrug 375 bp in der 27f/519r Genbank und 540 bp in der 515f/1525r Genbank. Die

unterschiedliche Länge ist mit der organisationsbedingten Verwendung von zwei verschiedenen Sequenziergeräten (ABI Prism 310 und ABI Prism 377) zu erklären. Mit der 27f/519r PCR wurden 15 bakterielle Familien, mit der 515f/1525r PCR 10 bakterielle Familien identifiziert. 66 Phylotypen (Gruppen von Sequenzen mit einer Identität gleich oder größer als 99%) wurden in der 27f/519r Genbank identifiziert, 41 in der 515f/1525r Genbank. Der *Coverage* (Anteil einer hypothetischen Klon-Genbank von unendlicher Größe, der von einer aktuellen Genbank repräsentiert wird) war 50% in der 27f/519r Genbank und 73% in der 515f/1525r Genbank (siehe Tab. 6).

Tabelle 6: Eigenschaften der zwei 16S rRNA Genbanken

	27f/519r	515f/1525r
Anzahl der Patienten	7	7
Anzahl der Klone	101	101
Länge der Sequenzen (Mittelwert)	375 bp	540 bp
Anzahl der bakteriellen Familien	15	10
Phylotypen*	66	41
<i>Singletons</i>**	50	27
<i>Coverage</i> (%)***	50	73

* Gruppen von Sequenzen mit einer Identität gleich oder größer als 99%

** Phylotypen, die nur einmal vorkommen

*** Anteil einer hypothetischen Klon-Genbank von unendlicher Größe, der von einer experimentellen Genbank repräsentiert wird (Giovannoni *et al.* 1995; Good. 1953)

3.3. Taxonomie

Die durch 16S rRNA-Sequenzierung identifizierten Bakterien wurden nach den *Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera* (Garrity *et al.* 2001) zugeordnet (siehe Tab. 7 und 8).

Tabelle 7: Taxonomie der 27f/519r Genbank

Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung (Anzahl der Klone)
<i>BXII-Proteobacteria</i>	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Eikenella</i> (2), <i>Neisseria</i> (1), <i>Kingella</i> (3)
	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pasteurellales</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Haemophilus</i> (5)
	<i>ε-Proteobacteria</i>	<i>Campylobacteriales</i>	<i>Campylobacteriaceae</i>	<i>Campylobacter</i> (5)
<i>BXIII-Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i> (11)
		<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Acidaminococcaceae</i>
			<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i> (1)
			<i>Peptococcaceae</i>	<i>Centipeda</i> (1)
<i>BXIV-Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i> (10)
			<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i> (3)
			<i>Micrococcaceae</i>	<i>Rothia</i> (6)
<i>BXVII-Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i> (3)
<i>BXX-Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i> (5)
			<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i> (15)
			<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Capnocytophaga</i> (9)
<i>BXXI-Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriales</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i> (12), <i>Leptotrichia</i> (4)

Tabelle 8: Taxonomie der 515f/1525r Genbank

Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung: Klone-Anzahl
<i>BXII-Proteobacteria</i>	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i> (7), <i>Kingella</i> (2), <i>Eikenella</i> (4)
<i>BXIII-Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Selenomonas</i> (13), <i>Dialister</i> (1), <i>Veillonella</i> (3)
			<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i> (2)
			<i>Peptococcaceae</i>	<i>Centipeda</i> (4)
			<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Johnsonella</i> (2)
			<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Peptostreptococcus</i> (1)
	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Gemella</i> (6)
			<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcus</i> (49)
			<i>Aerococcaceae</i>	<i>Abiotrophia</i> (1)
<i>BXVII-Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i> (5)

3.4. Unterschied der bakteriellen Familien in den zwei Genbanken

Die bakteriellen Familien, die in den zwei 16S rRNA Genbanken vorkommen, sind in Tabelle 6 vergleichend gezeigt. Einige Familien wurden mit der ersten PCR (z.B: *Fusobacteriaceae*) und andere Familien mit der zweiten PCR (z.B: *Acidaminococcaceae*) am besten identifiziert. Das ist mit der Verwendung von zwei verschiedenen Primerpaaren zu erklären (siehe Tab. 9).

Tabelle 9: Bakterielle Familien der zwei 16S rRNA Genbanken

Familien	27f/519r*	515f/1525r*	P-Value**
<i>Fusobacteriaceae</i>	16	0	0,000016
<i>Prevotellaceae</i>	15	0	0,000034
<i>Streptococcaceae</i>	11	49	4,879x10 ⁻⁹
<i>Actinomycetaceae</i>	10	0	0,00154
<i>Flavobacteriaceae</i>	9	0	0,0032
<i>Neisseriaceae</i>	6	13	0,14 (n.s)
<i>Micrococcaceae</i>	6	0	0,0289
<i>Bacteroidaceae</i>	5	0	0,059 (n.s)
<i>Campylobacteriaceae</i>	5	0	0,059 (n.s)
<i>Pasteurellaceae</i>	5	0	0,059 (n.s)
<i>Acidaminococcaceae</i>	3	17	0,00154
<i>Corynebacteriaceae</i>	3	0	0,24 (n.s)
<i>Spirochaetaceae</i>	3	5	0,72 (n.s)
<i>Eubacteriaceae</i>	1	2	1 (n.s)
<i>Peptococcaceae</i>	1	4	0,368 (n.s)
<i>Staphylococcaceae</i>	0	6	0,0289
<i>Lachnospiraceae</i>	0	2	0,49 (n.s)
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0	1	1 (n.s)
<i>Aerococcaceae</i>	0	1	1 (n.s)

* Anzahl der identifizierten Klone

** Fisher exact Test: n.s = nicht signifikant

3.5. Vergleich der Häufigkeit der putativen Parodontalpathogene bei den Hypophosphatasiepatienten und Parodontitispatienten vorheriger Studien

In einer vorherigen Studie wurde mittels 16S rRNA Analyse die bakterielle Diversität der subgingivalen Plaque bei gesunden Probanden und bei Patienten mit rezidivierender Parodontitis, Erwachsenenparodontitis, HIV-Parodontitis, akuter nekrotisierender ulzerativer Gingivitis (ANUG) bestimmt (Paster *et al.* 2001). Die bakteriellen Spezies, die in mindestens vier erkrankten Patienten, aber niemals in den gesunden Probanden vorkamen, wurden von Paster als putative Parodontalpathogene bezeichnet. Die Anwendung eines *Stand alone Blast-Server* ermöglichte einen Vergleich zwischen den Sequenzen dieser Studie und den Sequenzen von Paster. Nur die Sequenzen mit einer Identität größer oder gleich 99% wurden als identisch bezeichnet. Die Tabelle 10 zeigt wie häufig diese putativen Parodontalpathogene in den Hypophosphatasiepatienten vorkamen (siehe Tab.10).

Tabelle 10: Anzahl der putativen Parodontalpathogene nach Paster bei den Hypophosphatasiepatienten

Putative Parodontalpathogene (Paster <i>et al</i> 2001)	Accession no.	Patient Nr.						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>Treponema socranskii</i> subsp. <i>buccale</i>	AF033305						1	
<i>Haemophilus paraphrophilus</i>	M75082							
<i>Desulfobulbus</i> sp. oral clone R004	AY005037							
<i>Campylobacter rectus</i>	L06973							
Uncultured <i>Eubacterium</i> PUS9.170	AJ012604							
<i>Streptococcus constellatus</i>	AF104676							
<i>Selenomonas</i> -like sp. oral strain GAA14	AF287789							
<i>Megasphaera</i> sp. oral clone BB166	AF287783							
<i>Gemella haemolysans</i>	M58799							
<i>Filifactor alocis</i>	AJ006962							
<i>Eubacterium saphenum</i>	U65987							
<i>Dialister pneumosintes</i>	X82500							1
<i>Catonella morbi</i>	X87151							
<i>Granulicatella adiacens</i>	D50540	1						
Uncultured bacterium D084	AF125200							
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	L16492							
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	L16491							
<i>Tannerella forsythensis</i>	L16495							
<i>Atopobium rimae</i>	X67149							
<i>Atopobium parvulum</i>	X67150							

Unter den putativen Parodontalpathogenen kamen einmal *Granulicatella adiacens* beim Patienten Nr. 1, einmal *Treponema socranskii* beim Patienten Nr. 6 und einmal *Dialister pneumosintes* beim Patienten Nr. 7 vor.

In einer weiteren Studie wurden mit den hier verwendeten Methoden Patienten mit einer aggressiven Parodontitis untersucht (Hutter *et al.* 2003). Die Abbildungen 3 und 4 zeigen einen Vergleich der Häufigkeit der bakteriellen Familien in den Hypophosphatasiepatienten und in den Parodontitispatienten. In beiden Diagrammen zeigte sich nur eine geringe Überlappung der repräsentierten bakteriellen Familien trotz der Verwendung identischer Methoden. Der Vergleich beweist, dass die Parodontalflora der Hypophosphatasiepatienten deutlich von der Flora abweicht, die bei Patienten mit einer aggressiven Verlaufsform der Parodontitis gefunden wurde (siehe Abb. 3 und 4).

Abb. 3: Vergleich der Häufigkeit der Klone der 27f/519r bakteriellen Familien bei den Hypophosphatasiepatienten und bei den Parodontitispatienten

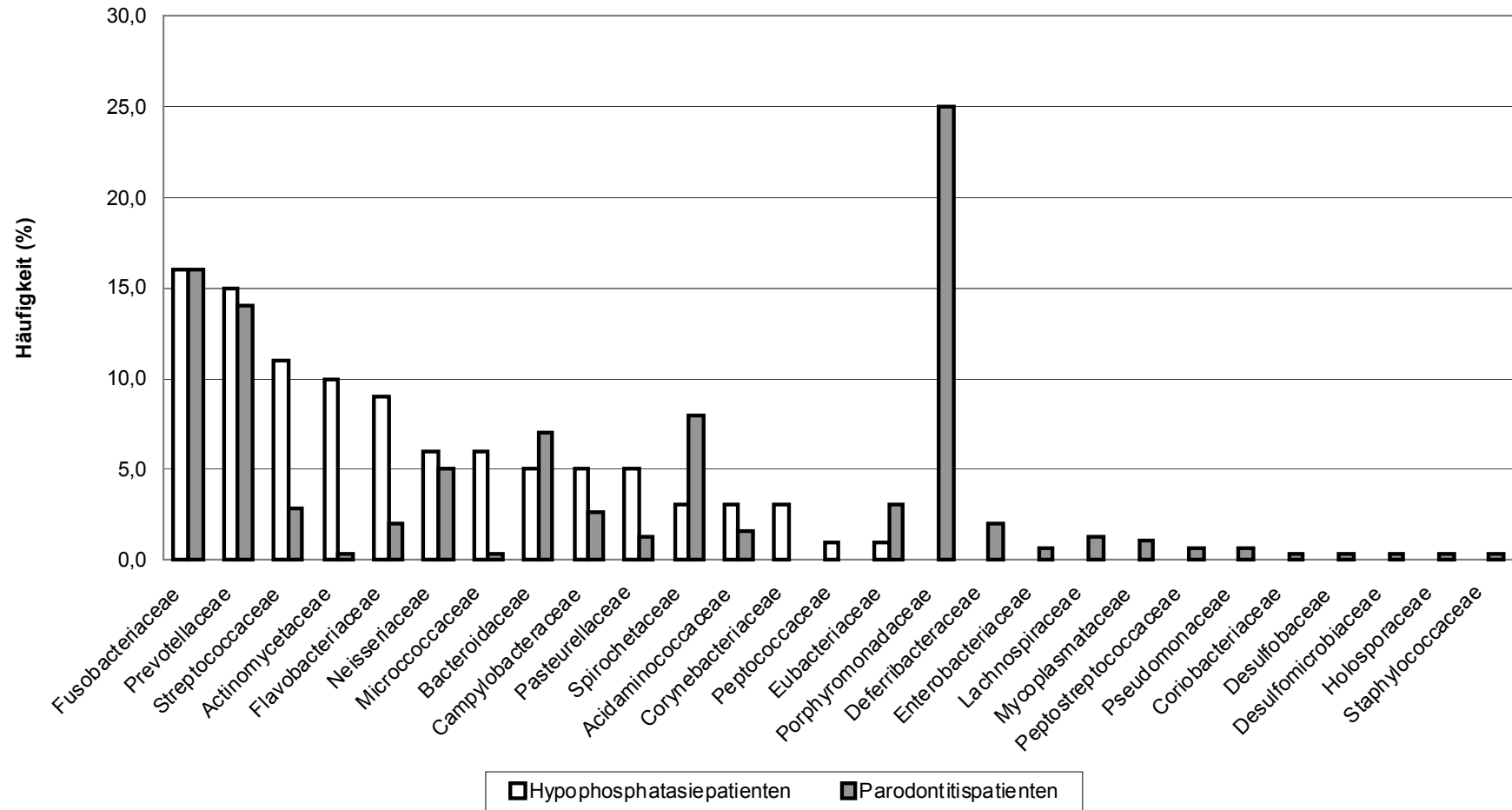
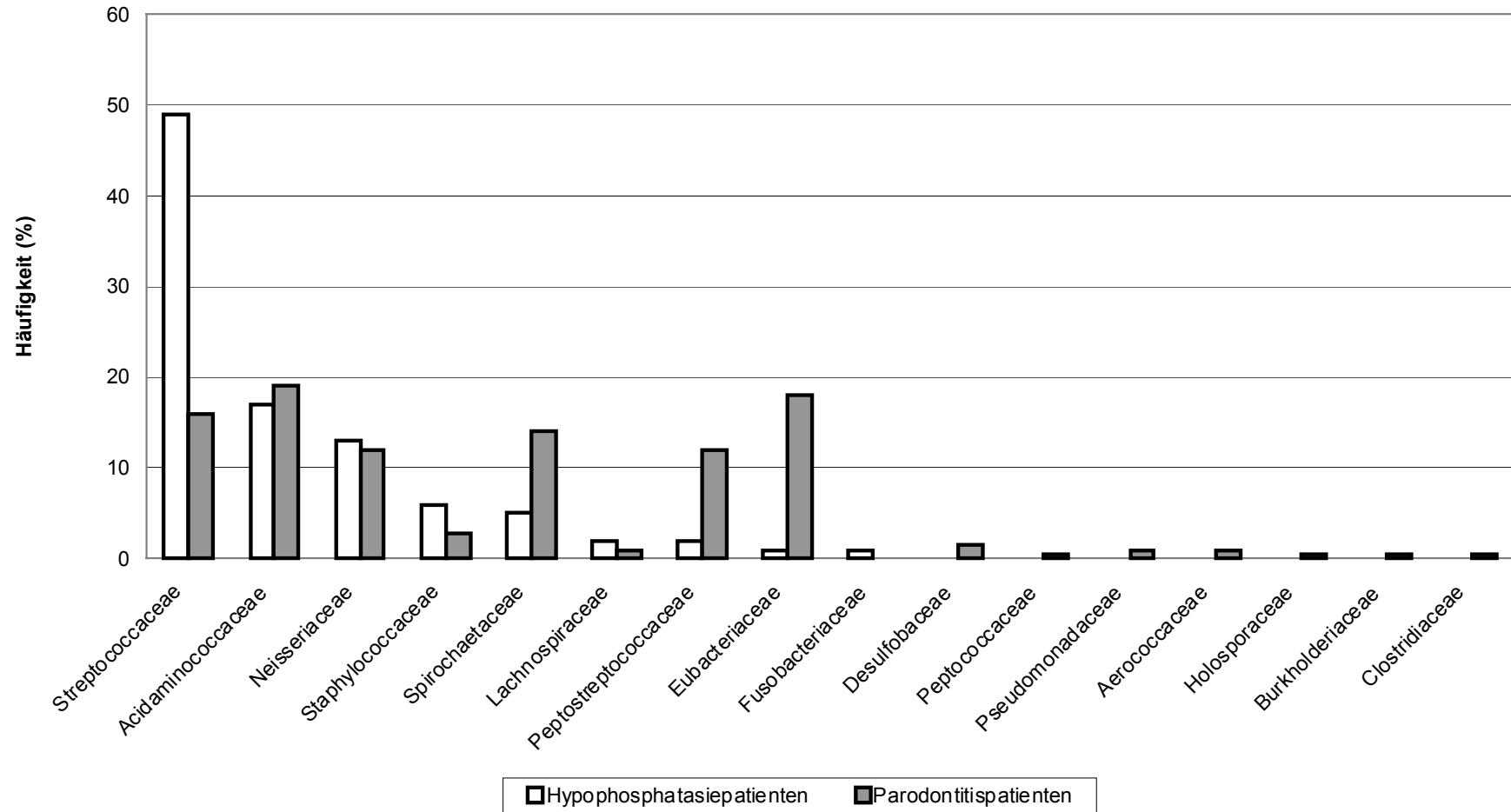


Abb. 4: Vergleich der Häufigkeit der Klone der 515f/1525r bakteriellen Familien bei den Hypophosphatasiepatienten und bei den Parodontitispatienten



Abschließend wurde mit dem obengenannten *Stand alone Blast-Server* die Anzahl der putativen Parodontalpathogene bei den Parodontitiskollektiven von Paster und von Hutter (*Paster et al.* 2001; *Hutter et al.* 2003) bei dem Hypophosphatasiekollektiv verglichen (siehe Tab.11).

Tabelle 11: Bakterielle Diversität bei Hypophosphatasiepatienten und bei den Parodontitispatienten

Putative Parodontalpathogene (Paster et al. 2001)	Parodontitis: Paster <i>et al.</i> , 9 Probanden	Parodontitis: Hutter <i>et al.</i> , 26 Probanden	Hypophosphatasie: diese Studie, 7 Probanden
<i>Treponema socranskii subsp. buccale</i>	1	7	1
<i>Haemophilus paraphrophilus</i>	1		
<i>Desulfobulbus sp. oral clone R004</i>	3	1	
<i>Campylobacter rectus</i>	3		
<i>Uncultured Eubacterium PUS9.170</i>	1		
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	1	
<i>Selenomonas-like sp. oral strain GAA14</i>	2	1	
<i>Megasphaera sp. oral clone BB166</i>	3	1	
<i>Gemella haemolysans</i>	1		
<i>Filifactor alocis</i>	4	9	
<i>Eubacterium saphenum</i>	3	1	
<i>Dialister pneumosintes</i>	1	3	1
<i>Catonella morbi</i>	2	1	
<i>Granulicatella adiacens</i>	1	1	1
<i>Uncultured bacterium D084</i>	1		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3	12	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	3	4	
<i>Tannerella forsythus</i>	2		
<i>Atopobium rimae</i>	1		
<i>Atopobium parvulum</i>	1		

Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythensis*, *Campylobacter rectus*, die auch von anderen Autoren zu den putativen Parodontalpathogenen gezählt wurden (*Albandar et al.* 1997; *Dewirst et al.* 2000; *Ximenez-Fyvie et al.* 2000), kamen häufig bei den Parodontitiskollektiven, aber niemals bei dem Hypophosphatasiekollektiv vor.

4. DISKUSSION

4.1. Fragestellung

Ziel dieser Studie war die Analyse der bakteriellen Diversität der subgingivalen Plaque bei einem Hypophosphatasiepatientenkollektiv durch Anwendung der kulturunabhängigen 16S rRNA Technologie. Das Kollektiv bestand aus sieben männlichen Patienten mit einer infantil-juvenilen Hypophosphatasie. Das Kollektiv wurde über mehrere Jahre von Priv. Doz. Dr. H.J. Girschick der Kinderklinik der Universität Würzburg betreut und in mehreren Arbeiten dokumentiert (Girschick *et al.* 1999; Girschick *et Seyberth* 1999; Orimo *et al.* 2001). Es sollten mikrobiologische Evidenzen für oder gegen die Hypothese einer frühen Parodontitis bei Hypophosphatasiepatienten gewonnen werden.

4.2. Patientenkollektiv

Das untersuchte Würzburger Hypophosphatasiekollektiv bestand aus Patienten mit einer infantil-juvenilen Hypophosphatasie. Im Vergleich mit anderen ähnlichen Studien (Baab *et al.* 1985; Baab *et al.* 1986; Watanabe H. *et al.* 1993) konnte mit einem recht großen Kollektiv gearbeitet werden. Insgesamt wurden sieben Patienten, die zu sechs verschiedenen Familien gehörten, untersucht. Die Werte der Prostaglandin E2 Konzentration im Urin waren zum Zeitpunkt der Untersuchung bei allen Patienten nicht erhöht. Die PgE2-Konzentration im Urin ist ein wichtiger Parameter, um den klinischen Verlauf der Hypophosphatasie zu bewerten. Der PgE2 Wert steigt bei einer nicht behandelten oder rezidivierenden Hypophosphatasie (Girschick und Seyberth 1999). In allen untersuchten Fällen handelte es sich wahrscheinlich um ein subklinisches Stadium der Erkrankung. Es ist in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, dass die Patienten unter engmaschiger Beobachtung stehen und bei Bedarf mit nicht-steroidalen Antiphlogistika behandelt werden. Eine klinische Untersuchung des Parodontalstatus der Patienten, von Prof. Schlagenhauf und seinen Mitarbeitern (Abteilung von Parodontologie, Universität Würzburg) durchgeführt, zeigte normale Werte der Tiefe der Parodontaltaschen. Sie waren bei allen Patienten nie größer als 4-5 mm. Eine gingivale Blutung kam bei allen

Patienten ganz selten während der Untersuchung vor. Aufgrund dieser Befunde konnte eine aktive Parodontitis ausgeschlossen werden. Man kann allenfalls bei wenigen Patienten von leichter lokalisierter Gingivitis sprechen.

4.3. Untersuchungsprotokoll

Die bakterielle Diversität der subgingivalen Plaque der sieben Patienten wurde mittels 16S rRNA Analyse bestimmt. In bisherigen Studien zur Parodontitis bei Hypophosphatasiepatienten wurden nur Antikörpernachweise für einzelne Bakterien im Serum durchgeführt (Baab *et al.* 1985; Baab *et al.* 1986; Watanabe H. *et al.* 1993). Dagegen bietet die 16S rRNA Technologie einen Überblick der gesamten Parodontalflora an und erleichtert dadurch die Interpretation der klinischen Daten über den Parodontalstatus der untersuchten Patienten. Die Amplifikation der 16S rRNA Gene erfolgte durch die universellen Primer-Paare 27f/519r und 515f/1525r. Die Anwendung zweier verschiedener Primer-Paare ermöglichte eine sehr gute bakterielle Diversität aufgrund ihrer unterschiedlichen Spezies-Repräsentation (Hutter *et al.* 2003). Die Primer 27f und 519r wurden schon für die Amplifikation der 16S rRNA Gene (27f) und für die Sequenzierung (519r) verwendet (Lane, 1991). Als Primer-Paar wurden sie für die Amplifikation der 16S rRNA Gene in zwei verschiedenen Studien verwendet, jedoch wurde die bakterielle Diversität zum Unterschied von dieser Arbeit durch spezifische Sonden (Hybridisierung) und nicht durch Sequenzierung der PCR-Produkten analysiert (Choi *et al.* 1994; Jung *et al.* 2000). In einer weiteren Studie wurde die Amplifikation der 16S rRNA Gene unter anderem mit dem Primer-Paar 515f/1525r durchgeführt (Kroes *et al.* 1999). Die Verwendung der Primer-Paare 27f/519r und 515f/1525r wurde kürzlich im Rahmen einer Studie am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg unter Beteiligung des Promovenden validiert und konnte eine exzellente Repräsentation der bei Parodontitis zu erwartenden Genera zeigen. Auffällig war allenfalls der seltene Nachweis von *Actinomyces sp.* bei Parodontitispatienten (Hutter *et al.* 2003). In der vorliegenden Studie wurde allerdings eine hohe Zahl an *Actinomycetaceae* nachgewiesen. Dieser Befund ist möglicherweise mit der unterschiedlichen Tiefe der Parodontaltaschen bei

den zwei Patientenkollektiven zu erklären. Bei den Hypophosphatasiepatienten war aufgrund der geringen Taschentiefe eine Entnahme supragingivaler Plaquebestandteile bei der Insertion der Papierspitze nicht auszuschließen. Ein anderer wichtiger Aspekt des Untersuchungsprotokolls war die Anwendung eines *Stand alone Blast-Servers* (Hutter *et al.*2003), der einen Vergleich zwischen den Sequenzen dieser Studie und den Sequenzen vorheriger Studien ermöglichte.

4.4. Bakterielle Diversität bei Hypophosphatasiepatienten

Mit der Anwendung der 16S rRNA Analyse wurden zwei verschiedene Genbanken erstellt und 101 Klone pro Genbank identifiziert. Die 27f/519r Genbank war repräsentativer als die 515f/1525r Genbank. 15 bakterielle Familien wurden mit dem Primer-Paar 27f/519r und nur 10 bakterielle Familien mit dem Primer-Paar 515f/1525r identifiziert. Dieses Ergebnis ist durch die unterschiedlichen diskriminierenden Leistungen der amplifizierten Teile der 16S rRNA bedingt. Einige bakterielle Familien, die in den zwei 16S rRNA Genbanken vorkamen, z.B. *Fusobacteriaceae*, wurden mit der 27f/519r PCR identifiziert, andere, z.B. *Acidaminococcaceae*, mit der 515f/1525r PCR vornehmlich identifiziert (siehe Tab.9). Es war möglich anhand des untersuchten Patientenkollektivs folgende Aussagen der Parodontitisstudie (Hutter *et al.*2003) zu bestätigen: (a) die 27f/519r PCR erlaubt eine bessere Diskriminierung der bakteriellen Spezies, (b) es besteht eine signifikant unterschiedliche Repräsentation der bakteriellen Familien durch die zwei oben genannten PCR.

4.5. Vergleich der bakteriellen Diversität bei Hypophosphatasie- und Parodontitispatienten vorheriger Studien

Kürzlich wurde mittels 16S rRNA Analyse die bakterielle Diversität der subgingivalen Plaque bei gesunden Probanden und bei Patienten mit rezidivierender Parodontitis, Erwachsenenparodontitis, HIV-Parodontitis, akuter nekrotisierender ulzerativer Gingivitis (ANUG) bestimmt (Paster *et al.* 2001). Die bakteriellen Spezies, die in mindestens vier erkrankten Patienten, aber niemals

in den gesunden Probanden vorkamen, wurden von Paster als putative Parodontalpathogene bezeichnet. Die Tabelle 11 (siehe Ergebnisse) zeigt, wie häufig putative Parodontalpathogene bei dem Hypophosphatasiekollektiv und bei Parodontitiskollektiven vorheriger Studien vorkamen (*Paster et al.* 2001; *Hutter et al.* 2003). Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis*, *Tannarella forsythensis*, *Campylobacter rectus*, die auch von anderen Autoren zu den putativen Parodontalpathogenen gezählt wurden (*Albandar et al.* 1997; *Dewirst et al.* 2000; *Ximenez-Fyvie et al.* 2000), kamen häufig bei den Parodontitiskollektiven, aber niemals bei dem Hypophosphatasiekollektiv vor. Das Hypophosphatasiekollektiv zeigte dagegen eine bedeutende Anzahl der Keime, die zu den Familien *Streptococcaceae* und *Actinomycetaceae* gehören, besonders im Vergleich mit dem Parodontitiskollektiv von *Hutter et al.* (siehe Abb. 3 und 4; Ergebnisse). Solche Keime werden zu den ersten besiedelnden Erregern im Sulkusbereich gezählt und stellen die physiologische Plaqueflora dar (*Darveau et al.* 1997).

4.6. Analyse der Parodontalflora des Hypophosphatasiekollektivs durch Dot-Blot Technik

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Frau Dr. A. Moter (Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Humboldt Universität, Berlin) wurde die subgingivale Plaque der Hypophosphatasiepatienten mit der Dot-Blot Technik analysiert. Die Untersuchung wurde mit Digoxigenin markierten Spezies-spezifischen DNA-Sonden durchgeführt. Es wurden Sonden verwendet, die die folgenden bakteriellen Spezies detektierten: *Tannarella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Treponema socranskii*.

Die Tabelle 12 zeigt einen Vergleich der Häufigkeiten der Parodontalkeime in den Hypophosphatasiepatienten, die mittels Dot Blot beziehungsweise PCR ermittelt wurden.

Tabelle 12: Häufigkeit bestimmter Parodontitiseime in den Hypophosphatasiepatienten (Vergleich von Dot Blot und PCR)

Bakterielle Spezies	Dot Blot Nachweis (Zahl der Patienten)	PCR Nachweis (Zahl der Patienten)	Nachweis mit beiden Methoden (Zahl der Patienten)
<i>Tannarella forsythensis</i>	2	2	1
<i>Fusobacteria</i>	7	4	4
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	6	2	2
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1	0	0
<i>Prevotella intermedia</i>	0	0	0
<i>Eikenella corrodens</i>	5	5	3
<i>Campylobacter rectus</i>	1	0	0
<i>Vellionella parvula</i>	5	0	0
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	6	0	0
<i>Treponema socranskii</i>	6	5	5

Bakterielle Spezies wie *Treponema socranskii* und *Eikenella corrodens* waren bei dem Hypophosphatasiekollektiv mit beiden Methoden sehr gut repräsentiert. *Treponema socranskii* wurde in 5 Patienten und *Eikenella corrodens* in 3 Patienten mit beiden Methoden nachgewiesen. *T. socranskii* wurde schon in verschiedenen Studien als Parodontalpathogen beschrieben (Sakamoto *et al.* 2000; Paster *et al.* 2001; Tacheuchi *et al.* 2001; Hutter *et al.* 2003). In einer der oben genannten Studien wurde die Häufigkeit von *T. socranskii* in der subgingivalen Plaque von 123 Probanden (38 Patienten mit aggressiver Parodontitis, 65 Patienten mit chronischer Parodontitis, 20 gesunde Probanden) durch Anwendung einer spezifischen PCR bestimmt. *T. socranskii* wurde in 71 % der Patienten mit aggressiver Parodontitis, in 89% der Patienten mit chronischer Parodontitis und nur in 30% der gesunden Probanden nachgewiesen (Tacheuchi *et al.* 2001). Die Assoziation zwischen *E. corrodens* und Gingivitis ist schon seit längerem bekannt (Darveau *et al.* 1997). *E. corrodens* wurde durch die Anwendung der 16S rRNA Technik auch bei

Parodontitispatienten nachgewiesen (Paster *et al.* 2001; Hutter *et al.* 2003). In einer anderen Studie wurde die Häufigkeit von *E. corrodens* in der subgingivalen Plaque von 273 Probanden (213 Patienten mit verschiedenen Arten von Parodontitis und 60 gesunde Probanden) mittels indirekter Immunfluoreszenztechnik bestimmt. *E. corrodens* kam am häufigsten bei Patienten mit juveniler Parodontitis (2.3%), weniger häufig bei Patienten mit chronischer Parodontitis (0.7%) und selten bei den gesunden Probanden (0.3%) vor (Suda *et al.* 2002). Der Nachweis von *T. socranskii* und *E. corrodens* in dem Hypophosphatasiekollektiv kann derzeit noch nicht hinreichend interpretiert werden. Wir untersuchen in einer laufenden Kontrollstudie die Gegenwart der Keime bei einem Kontrollkollektiv gleichen Alters und Geschlechts ohne Hypophosphatasie.

Wichtige Parodontalpathogene wie *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythensis* wurden übereinstimmend mit beiden Methoden nicht oder nur selten identifiziert. *P. gingivalis* wurde nur in einem Patienten mit dem Dot Blot und niemals mit der 16S rRNA Analyse identifiziert. *Tannerella forsythensis* wurde nur in einem Patienten mit beiden Methoden nachgewiesen. Im Vergleich mit der 16S rRNA Analyse hat die Dot-Blot Technik eine höhere Sensitivität für den Nachweis einzelner Spezies. Andererseits bietet sie einen eingeschränkten Blick auf die bakterielle Diversität.

4.7. Parodontitisnachweis bei dem Hypophosphatasiekollektiv

Die Analyse der bakteriellen Diversität der subgingivalen Plaque hat keine Evidenz für eine Parodontitis bei dem Hypophosphatasiepatientenkollektiv gezeigt und hat die Befunde der klinischen Untersuchungen bestätigt. Der Parodontalstatus der Patienten war gut. Die Parodontaltaschen waren nie tiefer als 4-5 mm, und gingivale Blutung kam ganz selten bei wenigen Patienten vor. Im allgemeinen zeigte sich eine bedeutende Anzahl der Keime der physiologischen Plaqueflora (*Streptococcus sp.* und *Actinomyces sp.*), dagegen kamen putative Parodontalpathogene wie *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythensis* und *Campylobacter rectus* niemals vor. Allenfalls

der Nachweis von *Eikenella corrodens* und *Treponema socranskii* bedarf einer kritischen Überprüfung durch die Untersuchung eines Kontrollkollektivs. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass nach dem derzeitigen Stand des Wissens ärztliche betreute Hypophosphatasiepatienten nicht an einer Parodontitis leiden. Jedoch bleibt fraglich, ob diese Schlußfolge aufgrund der fehlenden Untersuchung eines gesunden Patientenkollektivs als gültig anzusehen ist. Evidenzen für Parodontitis bei Hypophosphatasiepatienten wurden bis jetzt nur in Einzelfallstudien und bei Patienten mit einer Störung der Immunantwort gewonnen (Baab *et al.* 1985; Baab *et al.* 1986; Watanabe H. *et al.* 1993). Der Zustand des Immunsystems spielt wahrscheinlich in der Pathogenese der juvenilen Parodontitis eine bedeutendere Rolle als die Hypophosphatasie.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studie war die Analyse der bakteriellen Diversität der subgingivalen Plaque bei einem Hypophosphatasiepatientenkollektiv durch Anwendung der 16S rRNA Technologie. Das Kollektiv bestand aus sieben männlichen Patienten mit einer infantil-juvenilen Hypophosphatasie. Das Alter der Patienten lag zwischen 7 und 23 Jahren. Es sollten mikrobiologische Evidenzen für oder gegen die Hypothese einer frühen Parodontitis bei Hypophosphatasiepatienten gewonnen werden. Subgingivale Plaqueproben wurden von jedem Patienten entnommen. Anschließend folgte die DNA Extraktion aus den Plaqueproben und die Amplifikation der 16S rRNA Gene mittels zweier verschiedener universeller Primer-Paare: 27f/519r; 515f/1525r. Die PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert. Dann folgte ein Vergleich der Sequenzen mit der *Genbank Database* durch den *BLAST-Server* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Insgesamt wurden zwei verschiedene 16S rRNA Genbanken erstellt und 101 Klone pro Genbank identifiziert. Mit der 27f/519r PCR wurden 15 bakterielle Familien, mit der 515f/1525r PCR 10 bakterielle Familien identifiziert. 66 Phylotypen wurden in der 27f/519r Genbank identifiziert, 41 in der 515f/1525r Genbank. Der *Coverage* war 50% in der 27f/519r Genbank und 73% in der zweiten Genbank. In allgemeinen zeigte sich ein hoher Anzahl der Keime der physiologischen Plaqueflora (*Streptococcus sp.* und *Actinomyces sp.*), dagegen kamen putative Parodontalpathogene wie *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythensis*, *Campylobacter rectus* niemals vor. Die Analyse der bakteriellen Diversität der subgingivalen Plaque erbrachte eine deutlich andere Zusammensetzung im Vergleich zu Parodontitispatienten. Es zeigte sich somit keine mikrobiologische Evidenz für eine Parodontitis bei dem Hypophosphatasiepatientenkollektiv.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Albandar, J. M., Brown, L. J. & Loe, H. 1997. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J. Periodontol.* **68**: 973–981.

Anwar, H., van Biensen, T., Dasgupta, M., Lam, K., Costerton, J. 1989. Susceptibility of biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal actions of whole blood and serum. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**:235-241.

Anwar, H., Strap, J.L., Chen, K., Costerton, J.W. 1992. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother.* **36**:1208-14.

Armitage, G.C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.* **4**:1-6.

Baab, D.A., Page, R.C., Morton, T. 1985. Studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth. *J. Periodontol.* **56 (7)**:403-9.

Baab, D.A., Page, R.C., Ebersole, J.L., Williams, B.L., Scott, C.R. 1986. Laboratory studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth. *J. Clin. Periodontol.* **13 (7)**:677-83.

Berbari, E.F., Cockerill, F.R., Steckelberg, J.M. 1997. Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. *Mayo Clin. Proc.* **72(6)**:532-42.

Blomlöf, L., Hammarström, L., Lindskog, S. 1986. Occurrence and appearance of cementum hypoplasias in localized and generalized juvenile periodontitis. *Acta Odontol. Scand.* **44** :313-320.

Chapelle, F. H., O'Neill, K., Bradley, P. M., Methe, B. A., Clufo, S. A., Knobel, L. L., Lovely, D. R. 2002. A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature* **415**:312-315.

Choi, B. K., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Goebel, U. B. 1994. Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect. Immun.* **62**:1889-1895.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284 (5418)**:1318-22.

Christersson, L.A., Albin, B., Zambon, J.J., Wikesjo, U.M., Genco, R.J. 1987. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J. Periodontol.* **58(8)**:529-39.

Darveau, R.P., Cunningham, M.D., Bailey, T., Seachord, C., Ratcliffe, K., Bainbridge, B., Dietsch, M., Page, R.C., Aruffo A. 1995. Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion. *Infect. Immun.* **63**:1311-1317.

Darveau, R.P., Tanner, A., Page, R.C. 1997. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000.* **14**:12-32.

Dayer, J.M., Evequoz, V., Zavadil-Grob, C., Grynepas, M.D., Cheng, P.T., Schnyder, J., Trechsel, U., Fleisch, H. 1997. Effect of synthetic calcium pyrophosphate and hydroxyapatite crystals on the interaction of human blood mononuclear cells, and fibroblast. *Arthritis Rheum.* **30**:1372-1381.

Dennison, D.K., Van Dyke, T.E. 1997. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol. 2000.* **14**:54-78.

Dewhirst, F. E., Tamer, M. A., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Boches, S. K., Galvin, J. L., Paster, B. J. 2000. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol. Immunol.* **15** :196–202.

Discipio, R.G., Daffern, P.J., Kawahara, M., Pike, R., Travis, J., Hugli, T.E., Potempa, J. 1996. Cleavage of human complement component C5 by cysteine proteinases from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. Prior oxidation of C5 augments proteinase digestion of C5. *Immunology.* **88 (4)**: 657.

Dodman, T., Robson, J., Pincus, D. 2000. *Kingella kingae* infections in children. *J. Paediatr. Child. Health.* **36(1)**:87-90

Flemmig, T.F.1999. Periodontitis.*Ann. Periodontol.* **4(1)**:32-8. Review.

Frias, J., Olle, E., Alsina, Merce. 2001. Periodontal pathogens produce Quorum sensing signal molecules. *Infection and Immunity.* **69(5)**: 3431-3434.

Fuqua, C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:727-51.

Garrity, G.M., Winters, M., Searles, D.B. 2001. Taxonomic outline of the procaryotic genera. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, second Edition.

Gemmel, E., Marshall, R.I., Seymour G.J. 1997. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000.* **14**: 112-43

Giovannoni, S. J., Mullins, T. D. & Field, K. G. 1995. Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes.

Molecular Ecology of Aquatic Microbes, pp. 217–248. Edited by I. Joint. Berlin: Springer-Verlag.

Girschick, H.J., Schneider, P., Kruse, K., Huppertz, H.I. Bone metabolism and bone mineral density in childhood hypophosphatasia. *Bone*. **25(3)**:361-7.

Girschick, H.J., Seyberth, H.W., Huppertz, H.I. 1999. Treatment of childhood hypophosphatasia with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Bone*. **25(5)**:603-7.

Good, I.J. 1953. The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika*. **40**: 237-64.

Grenier, D. 1992. Inactivation of human serum bactericidal activity by a trypsinlike protease isolated from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. **60(5)**:1854-7.

Grenier, D., Michaud J. 1993. Evidence for the absence of hyaluronidase activity in *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*. **31(7)**:1913-5.

Hammond, B.F., Lillard, S.E., Stevens, R.H. 1987. A bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun*. **55(3)**:686-91.

Helgeland, K., Nordby, O. 1993. Cell cycle-specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblasts of a toxin isolated from the culture medium of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontal. Res*. **28(3)**:161-5.

Holt, S.C., Bramanti, T.E. 1991. Factors in virulence expression and their role in periodontal diseasepathogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med*. **2**:177-281.

Holt, S.C., Kesavalu, L., Walker, S., Genco, C.A. 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol.* 2000. **20**:168-238. Review.

Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L., Pace, N. R. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* **180** : 366–376.

Hutter, G., Schlagenhaut, U., Valenza, G., Horn, M., Burgemeister, S., Claus, H., Vogel, U. 2003. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology.* **149(Pt 1)**:67-75.

Jensen, E.T., Kharazmi, A., Garred, P., Kronborg, G., Fomsgaard, A., Mollnes, T.E., Hoiby, N. 1993. Complement activation by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb. Pathog.* **15(5)**:377-88.

Jung, I.Y., Choi, B.K., Kum, K.Y., Roh, B.D., Lee, S.J., Lee, C.Y., Park, D.S. 2000. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J. Endod.* **26(10)**:599-604.

Kopczynski, E. D., Bateson, M. M., Ward, D. M. 1994. Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 746–748.

Kroes, I., Lepp, P. & Relman, D. 1999. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**:14547–14552.

Kuramitsu, H.K., Yoneda, M., Madden, T. 1995. Proteases and collagenases of *Porphyromonas gingivalis*. *Adv Dent Res.* **9(1)**:37-40. Review.

Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp.115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.

Larsen, N., Olsen, G.J., Maidak, B.L., McCaughey, M.J., Overbeek, R., Macke, T.J., Marsh, T.L., Woese, C.R. 1993. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* **1;21(13)**:3021-3.

Lee, J., Sojar, H.T., Bedi, G.S., Genco, R.J. 1991. Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis fimbriin: size, amino-terminal sequence, and antigenic heterogeneity. *Infect Immun.* **59(1)**:383-9.

Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrona, R.H., Boye, M., Moller, K. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(2)**:673-90.

Loe, H., Brown, L.J. 1991. Early onset periodontitis in the United States of America. *J Periodontol.* **62(10)**: 608-16.

Machtei, E.E., Ben-Yehouda, A., Zubery, Y., Sela, B.A. 1994. Lack of evidence for hypophosphatasia as a factor in the pathogenesis of early-onset periodontitis. *J. West Soc. Periodontol.* **42(4)**:113-7.

Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D., Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* **64(2)**:795-9.

Mintz, K.P., Fives-Taylor, P.M. 1994. Identification of an immunoglobulin Fc receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **62(10)**:4500-5.

Moore, W.E.C., Moore, L.V.H. 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol.* 2000. **5**: 66-77

Orimo, H., Girschick, H.J., Goseki-Sone, M., Ito, M., Oda, K., Shimada, T. 2001. Mutational analysis and functional correlation with phenotype in German patients with childhood-type hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Res.* **16(12)**: 2313-9

Page, R.C., Davies, P., Allison, A.C. 1973. Effects of dental plaque on the production and release of lysosomal hydrolases by macrophages in culture. *Arch. Oral. Biol.* **18(12)**:1481-95.

Page, R.C., Baab, D.A. 1985. A new look at the etiology and pathogenesis of early-onset periodontitis. Cementopathia revisited. *J. Periodontol.* **56(12)**:748-51.

Page, R.C., Offenbacher, S., Schroeder, H.E., Seymour, G.J., Kornman, K.S. 1997. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol.* 2000. **14**:216-48. Review.

Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A., Dewhirst, F. E. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* **183**: 3770–3783.

Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., Simonet, P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* **58(9)**:2717-22.

Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S., Pace, N. R. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3417–3418.

Rosan, B., Slots, J., Lamont, R.J., Listgarten, M.A., Nelson, G.M. 1988. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Oral Microbiol Immunol.* **3(2):**58-63.

Saglie, F.R., Smith, C.T., Newman, M.G., Carranza, F.A. Jr, Pertuiset, J.H., Cheng, L., Auil, E., Nisengard, R.J. 1986. The presence of bacteria in the oral epithelium in periodontal disease. II. Immunohistochemical identification of bacteria. *J. Periodontol.* **57(8):**492-500.

Sakamoto, M., Umeda, M., Ishikawa, I., Benno, Y. 2000. Comparison of the oral bacterial flora in saliva from a healthy subject and two periodontitis patients by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *Microbiol. Immunol.* **44:** 643–652.

Salvi, G.E., Lawrence, H.P., Offenbacher, S., Beck, J.D. 1997. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol.* 2000. **14:**173-201. Review.

Scannapieco, F.A., Genco, R.J. 1999. Association of periodontal infections with atherosclerotic and pulmonary diseases. *Periodontal Res.* **34(7):**340-5.

Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Levin, A. E. 1994. 'Checkerboard' DNA–DNA hybridization. *Biotechniques* **17:** 788–792.

Sojar, H.T., Lee, J.Y., Bedi, G.S., Cho, M.I., Genco, R.J. 1991. Purification, characterization and immunolocalization of fimbrial protein from *Porphyromonas (bacteroides) gingivalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15;175(2):**713-9.

Stewart, P.S., Costerton, J.W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* **14;358(9276):**135-8. Review.

Suda, R., Lai, C.H., Yang, H.W., Hasegawa, K. 2002. Eikenella corrodens in subgingival plaque: relationship to age and periodontal condition. J Periodontol. **73(8)**:886-91.

Sundqvist, G., Figdor, D., Hanstrom, L., Sorlin, S., Sandstrom, G. 1991. Phagocytosis and virulence of different strains of Porphyromonas gingivalis. Scand. J. Dent. Res. **99(2)**:117-29.

Suzuki, M. T. & Giovannoni, S. J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl Environ Microbiol. **62** : 625–630.

Takeuchi, Y., Umeda, M., Sakamoto, M., Benno, Y., Huang, Y., Ishikawa, I. 2001. Treponema socranskii, Treponema denticola, and Porphyromonas gingivalis are associated with severity of periodontal tissue destruction. J Periodontol. **72(10)**:1354-63.

Travis, J., Pike, R., Imamura, T., Potempa, J. 1997. Porphyromonas gingivalis proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. J. Periodontal. Res. **32(1 Pt 2)**:120-5. Review.

Van Dyke, T.E., Bartholomew, E., Genco, R.J., Slots, J., Levine, M.J. 1982. Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. J. Periodontol. **53(8)**:502-8.

van Winkelhoff AJ, Appelmeik BJ, Kippuw N, de Graaff J. 1993. K-antigens in Porphyromonas gingivalis are associated with virulence. Oral. Microbiol. Immunol. **8(5)**:259-65.

Ward, D. M., Weller, R. & Bateson, M. M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature **345**: 63–65.

Watanabe, H., Umeda, M., Seki, T., Ishikawa, I. 1993. Clinical and laboratory studies of severe periodontal disease in a adolescent associated with hypophosphatasia. A case report. *J. Periodontol.* **64**:174-80.

Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature.* **413(6858)**:860-4.

Whyte, M.P. 1994. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrin. Rev.* **15**: 439-61.

Whyte, M.P. 1995. Hypophosphatasia. In: *The metabolic and molecular bases of inherited diseases.* New York: Mc Graw-Hill.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-71.

Ximenez-Fyvie, L., Haffajee, A. & Socransky, S. 2000. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **27**: 722–732.

Yamamoto, K., Kadowaki, T., Okamoto, K., Yoneda, M., Nakayama, K., Misumi, Y., Ikehara, Y. 1996. Structure and function of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) as a major periodontal pathogenic factor from *Porphyromonas gingivalis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **389**:33-42. Review

Zambon, J.J., Slots J., Genco, R.J., 1983. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect. Immun.* **41**: 19-27.

Zuckerkandl, E., Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history, *J. Theor. Biol.* **8(2)**:357-66.

Zhu, X. Y., Zhong, T., Pandya, Y. & Joerger, R. D. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 124–137.

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich folgenden Personen herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. med. U. Vogel für die Überlassung des Themas und die kontinuierliche Betreuung der vorliegenden Arbeit, die deren Vollendung erst ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. med. M. Frosch, der mir die Möglichkeit gegeben hat, am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg wissenschaftlich zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. med. dent. U. Schlagenhauf für die Übernahme des Co-Referats sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H. Girschick, Herrn Dr. med. dent. S. Burgemeister und Frau Dr. med. A. Moter für die konstruktive Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe für Parodontitis, insbesondere Frau Dr. rer. nat. Heike Claus, die mir jederzeit bei den experimentellen Versuchen zur Seite stand, sowie Frau Gabi Heinze für die geduldige Einweisung in die experimentelle Laborarbeit.

Sandra Maier, Christian Konrad und Carmen Roldan, die mir bei meiner Forschung und der Zusammenstellung der Dissertation halfen und mich ermutigten.

Florian Eichelsbacher, der mich sowohl mit seiner fachlichen Kompetenz in der Zahnmedizin als auch durch seine Freundschaft stets unterstützt hat.

Meiner Freundin Regine, die jeden meiner Tage zu einem besonderen macht.

LEBENS LAUF

Name	Giuseppe Valenza
Geburtsdatum	09.10.1976
Geburtsort	Palermo
Staatsangehörigkeit	italienisch
Familienstand	ledig
Eltern	Prof. Dr. Vincenzo Valenza Pina di Garbo
Schulbesuch	
1981-1983	Scuola element. „Ragusa Moleti“, Palermo
1983-1986	Scuola element. „Convitto nazionale“, Palermo
1986-1989	Scuola media „Convitto nazionale“, Palermo
1989-1994	Liceo classico „Convitto nazionale“, Palermo
Juli 1994	Maturità classica - Abitur - (Note: 60/60)
Studium	
1994-2000	Medizinstudium an der Universität Palermo
Juli 2000	Laurea in medicina e chirurgia - Abschluß des Medizinstudiums - (Note: 110/110 cum laude)
August 2000 bis Januar 2001	Tirocinio postlaurea
Juni 2001	Diploma di abilitazione all'esercizio della medicina e chirurgia - Diplom über die Befähigung zur Ausübung der Medizin und Chirurgie - (von der Landesärztekammer als äquivalent zur deutschen Vollapprobation anerkannt)
Berufliche Tätigkeit	
seit August 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg
Würzburg, im Mai 2003	

