

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Quantifizierung frühbesiedelnder oraler *Actinomyces* spp. mittels neu  
etablierter TaqMan-PCRs

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ilka Jane Herrmann

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachterin: Prof. Dr. B. Henrich

Zweitgutachter: Prof. Dr. S. Rüttermann

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

„Reexamination *In Vitro* and *In Situ* of an Antibacterially Modified Experimental Dental Resin Composite with Molecular Methods: A Pilot Study”

Birgit Henrich, Ilka Herrmann, Mara Di Giulio, Karl Köhrer, René Deenen, Sugi Sivalingam, Ulrike Peters, Thomas Beikler, Ralf Janda, Stefan Rüttermann

Advances in Materials Science and Engineering, Volume 2016, Article ID 6367234

## I Zusammenfassung

Eine reduzierte Anheftung von Bakterien an dentale Füllmaterialien wird als eine Möglichkeit diskutiert, die Entstehung von Sekundärkaries an Füllungsrandern zu verhindern. Aus diesem Grund entwickelte die Arbeitsgruppe von Prof. Rüttermann an der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie der Heinrich-Heine-Universität vier modifizierte dentale Kunststofffüllmaterialien, die eine reduzierte Adhäsion von Bakterien (Kunststoffe P2 und P7) bzw. bakterizide Eigenschaften (Kunststoffe P8/9 und P9) aufweisen sollten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Etablierung von zwei TaqMan-PCRs für die den dentalen Biofilm frühbesiedelnden Actinomycetenspezies *A. naeslundii* und *A. viscosus*, um im Folgenden die vier modifizierten dentalen Kunststoffe auf ihre adhäsiven Eigenschaften im Vergleich zu einem Standardkunststoff *in vitro* und *in situ* zu charakterisieren.

Die Entwicklung von TaqMan-PCRs, bei denen eine Quantifizierung der Keime durch simultane Amplifizierung von Standards bekannter Konzentration möglich ist, erforderte die Auffindung speziesspezifischer Regionen im Genom der Bakterienspezies *A. naeslundii* und *A. viscosus*. Hierfür zeigten sich eine Region des *nanH*-Gens von *A. viscosus* und ein Bereich des 16S rDNA-Gens von *A. naeslundii* geeignet. Die Spezifität der qPCRs wurde mittels Homologievergleichen zu Sequenzen anderer Bakterien aus Datenbanken *in silico* verifiziert, darunter *A. odontolyticus*, *A. oris* und *A. johnsonii*, als auch durch Testung der DNA homologer Spezies in den PCRs bestätigt.

Zur Charakterisierung der adhäsiven Eigenschaften wurden die Kunststofffüllmaterialien *in vitro* mit einem Bakteriengemisch aus den fünf frühbesiedelnden Keimen *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *S. mitis*, *S. oralis* und *S. sanguinis*, für 8 und 24 Stunden inkubiert. Für die *in situ* Versuche wurden die Füllmaterialien jeweils 8 Stunden im Mund von zwei Probanden getragen. Schließlich wurden die an die Füllmaterialien adhärenenten Bakterien lysiert und die gewonnene DNA zur Quantifizierung beider Actinomycetenspezies in den entwickelten TaqMan-PCRs amplifiziert.

Es zeigte sich bei den *in vitro* Versuchen, dass der Kunststoff P9, der durch Zugabe von Methacryl-Irgasan modifiziert worden war, eine ca. 25%ige Reduktion der Bakterienadhärenz von *A. naeslundii* und *A. viscosus* von 8 Stunden auf 24 Stunden aufwies. Der Standardkunststoff zeigte hingegen immer eine erhöhte Adhäsion. Die übrigen modifizierten Kunststoffe zeigten keine eindeutigen Ergebnisse.

Bei den *in situ* Versuchen zeigten sich Probanden-spezifische Ergebnisse, die sich von den *in vitro* Versuchen unterschieden. Bei Proband 1 zeigte sich an Kunststoff P2 immer eine reduzierte Eubakterien- und Actinomycetenadhäsion im Vergleich zu den anderen getesteten Kunststoffen, bei Proband 2 hingegen war an die Kunststoffe P2 und P9 eine erhöhte Anheftung zu verzeichnen. Die Keimzahl in Speichel und Abstrich von Proband 2 war insgesamt höher als bei Proband 1. So scheint das individuelle Mikrobiom einen entscheidenden Einfluss auf die Adhäsion frühbesiedelnder Actinomyceten an die getesteten Kunststoffe zu haben.

So lässt sich aus der hier vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass der modifizierte Kunststoff P9 *in vitro* einen anti-adhäsiven Effekt aufweist, dies jedoch nicht die *in situ* Situation widerspiegelt, sodass weitere Versuchsreihen mit einer größeren Probandenzahl und längeren Tragezeiten der Kunststoffe im Mund durchgeführt werden sollten, um anti-adhäsive Kunststoffe umfassend charakterisieren und identifizieren zu können.

## II Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Actinomyces	<b>L</b>	Liter
<b>Act</b>	Actinomyces	<b>LB</b>	lysogeny broth
<b>Amp</b>	Ampicillin	<b>m</b>	milli
<b>Anae</b>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	<b>μ</b>	mikro
<b>Aqua dest.</b>	Destilliertes Wasser	<b>M</b>	Molar
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>MGB</b>	Minor Groove Binder
<b>atpA-Gen</b>	ATP-Synthase, F1alpha Untereinheit	<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>Avis</b>	<i>Actinomyces viscosus</i>	<b>nanH-Gen</b>	Sialidase-Gen
<b>BHQ</b>	Black Hole Quencher	<b>ng</b>	Nanogramm
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>CHX</b>	Chlorhexidin	<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>dUTP</b>	Desoxyuridin-Triphosphat	<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	<b>RFU</b>	Relative Fluoreszenzeinheit
<b>Euba</b>	Eubakterien	<b>S.</b>	Streptococcus
<b>FAM</b>	6-Carboxy-Fluorescein	<b>SOC</b>	Salz-optimiertes Medium mit Glukose
<b>F1a-Gen</b>	ATP-Synthase-Gen, F1alpha Untereinheit	<b>sp/spp</b>	Spezies
<b>g</b>	Gramm	<b>TAMRA</b>	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
<b>h</b>	Stunde	<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA
<b>HEX</b>	Hexachloro-6-Carboxyfluorescein	<b>TexRed</b>	Texas Red
<b>HCl</b>	Salzsäure	<b>Tris</b>	Trishydroxymethyl-aminomethan
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
<b>k</b>	Kilo		
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid		

### III Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Zielsetzung.....	6
3. Material und Methoden.....	7
3.1 Material.....	7
3.1.1 Primer und Sonden .....	7
3.1.2 MasterMixe .....	8
3.1.3 Kits.....	8
3.1.4 Bakterienstämme.....	9
3.1.5 Klonierungsvektor .....	9
3.1.6 Chemikalien.....	10
3.1.7 Prüfkörper .....	10
3.1.8 Bakteriengemisch.....	11
3.1.9 Weitere Materialien .....	12
3.1.10 Software/ Programme .....	12
3.1.11 Geräte .....	12
3.2 Methoden.....	13
3.2.1 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	13
3.2.2 Ligation .....	13
3.2.3 Transformation .....	14
3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA.....	15
3.2.5 Glycerinstocks .....	15
3.2.6 Herstellung von Quantifizierungsstandards.....	16
3.2.7 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	17
3.2.7.1 Konventionelle PCR.....	17
3.2.7.2 PCR mit MESA GREEN .....	18
3.2.7.3 TaqMan PCR.....	19
3.2.8 Gelelektrophorese .....	21
3.2.9 <i>In vitro</i> Adhäsionsassay an Prüfkörper.....	21
3.2.10 <i>In situ</i> Adhäsionsassay an Prüfkörper .....	22
3.2.11 Isolierung genomischer DNA von den Prüfkörpern .....	22
3.2.12 Isolierung genomischer DNA aus Abstrichen .....	22

3.2.13 Isolierung genomischer DNA aus Speichel .....	23
3.2.14 Probanden und Ethikvotum .....	23
4. Ergebnisse .....	24
4.1 Bekannte qPCRs ermöglichen keinen speziesspezifischen Nachweis von <i>A. naeslundii</i> und <i>A. viscosus</i> .....	24
4.2 Die neu designte Anae3-Taqman PCR eignet sich zum speziesspezifischen Nachweis von <i>A. naeslundii</i> .....	27
4.3 Das F1A-Gen und das <i>nanH</i> -Gen erscheinen für den speziesspezifischen Nachweis von <i>A. viscosus</i> geeignet.....	34
4.4 Die Avis-Duplex-PCR zeigt eine höhere Sensitivität als die Monoplex-PCR.....	38
4.5 Das <i>nanH</i> -Gen eignet sich zum speziesspezifischen Nachweis von <i>A. viscosus</i> DSM 43327 .....	39
4.6 Linearität .....	41
4.7 Die Qualität der Standards wird durch die Lagerungsbedingungen beeinflusst .....	43
4.8 Charakterisierung der adhäsiven Eigenschaften unterschiedlicher Kunststoffprüfkörper .....	45
4.8.1 Die Standardpaste zeigt im Vergleich zu den modifizierten Kunststoffen <i>in vitro</i> die stärkste Zunahme adhärenter Keime von 8 auf 24 Stunden .....	46
4.9 Das probandenspezifische Mikrobiom hat Einfluss auf die <i>in situ</i> Adhäsion an die Prüfkörper .....	49
4.9.1 Die Bakterienlast in Speichel und Abstrich variiert Probanden-spezifisch .....	49
4.9.2 Die Bakterienadhärenz an die modifizierten Kunststoffe im Vergleich zur Standardpaste zeigt Probanden-abhängige Unterschiede .....	51
4.9.3 Die EZ1-Aufreinigung verändert die Bakterienlast der Proben.....	52
5. Diskussion.....	54
5.1 Die TaqMan-PCR zur Quantifizierung von Mikroorganismen .....	54
5.2 Bewertung der gewählten Gene zum speziesspezifischen Nachweis von <i>A. naeslundii</i> und <i>A. viscosus</i> .....	55
5.3 Vergleichbarkeit der PCR-Läufe .....	57
5.4 <i>in vitro</i> Versuche .....	58
5.4.1 Die Taxonomie von <i>A. viscosus</i> .....	60
5.5 <i>in situ</i> Versuche .....	63
6. Schlussfolgerungen .....	66
7 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	67

## 1. Einleitung

In der menschlichen Mundhöhle spielt die Interaktion und Kommunikation von Bakterien eine entscheidende Rolle für die Bildung des bakteriellen Biofilms auf Zahnoberflächen [1]. Durch Anheftung an das Zahnpellikel und Verknüpfungen der Bakterien untereinander [1,2] wird ein aus verschiedenen Bakterienspezies bestehender Biofilm gebildet, der auch als Plaque bezeichnet wird. Innerhalb dieses Biofilms fungieren die verschiedenen Spezies als eine stets wechselnde, aber koordinierte Gemeinschaft [1].

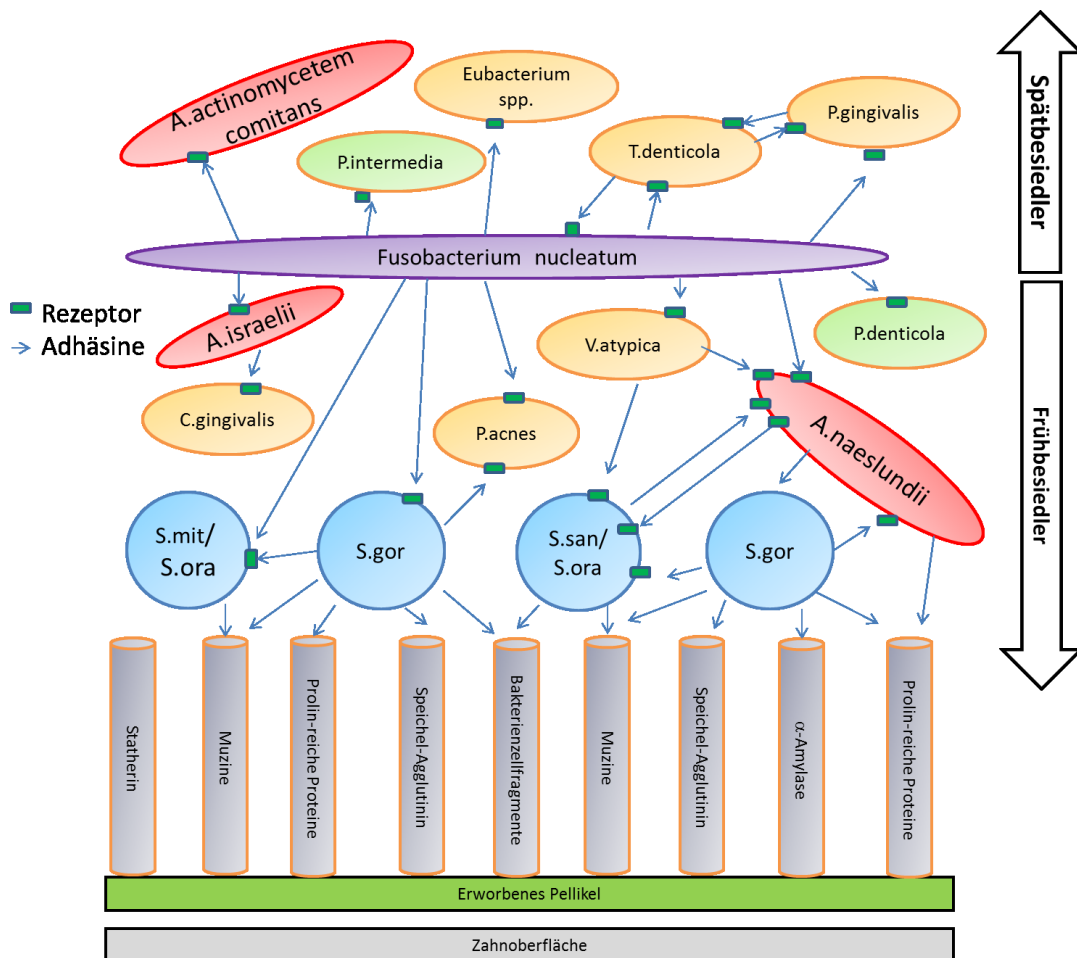
Die Anzahl der verschiedenen Spezies in der menschlichen Mundhöhle schwankt je nach Untersuchungsmethode zwischen 500-700 Spezies, wobei zwischen Früh- und Spätbesiedlern der Zahnoberfläche unterschieden wird [1-3]. Zu den Frühbesiedlern zählen die Actinomyceten, darunter die Spezies *A. viscosus* und *A. naeslundii*, die neben den Streptokokken in den sehr früheren Phasen der Biofilmbildung als vorherrschende Bakterien angesehen werden [2-4-6,9].

Die Actinomyceten zählen zu den gram-positiven, fakultativ anaeroben, unbeweglichen und zur Fadenbildung neigenden Bakterien aus der Familie der *Actinomycetaceae* [7]. Sie sind in der Regel gerade oder gekrümmte stäbchenförmige Zellen mit einem Durchmesser von 0,2–3,0 µm. Einige Arten bilden kleine, verzweigte Myzelien, weswegen sie lange als Pilze angesehen wurden. Sie gelten als fakultativ pathogene Schleimhautkommensale der Mundhöhle, selten auch des Verdauungs- und Genitaltrakts des gesunden Erwachsenen und auch warmblütiger Wirtsorganismen [7,8]. Die Spezies *A. naeslundii*, *A. viscosus* und *A. odontolyticus* werden häufig als Erreger milder Infektionen der Tränenkanälchen isoliert und sind an der Karies- und Parodontitisgenese beteiligt [7].

Als weitere Frühbesiedler lassen sich Streptokokken, wie zum Beispiel *S. mitis* oder *S. oralis*, *Haemophilus* spp., *Prevotella* spp. und *Veillonella* spp. nachweisen [1]. Innerhalb kürzester Zeit nach der Zahnreinigung bildet sich an der Zahnoberfläche ein aus Speichelglykoproteinen, Phosphoproteinen und Lipiden bestehendes Pellikel, das als Rezeptor für die Anheftung der Frühbesiedler dient [10,11]. Die Anheftung erfolgt über an der Bakterienoberfläche liegende Adhäsine [10]. Die *Actinomyces* spp. verfügen über zwei verschiedene, aus mehreren Untereinheiten bestehende Fimbrien, über die sie sich sowohl an Hartgewebe, wie die Zahnoberfläche (Typ-1-Fimbrien), als auch an Weichgewebe, wie die Mundschleimhaut, oder an andere Mikroorganismen anheften können (Typ-2-Fimbrien) [12-14].



Eine Übersicht über die bakterielle Architektur an der Zahnoberfläche ist in Abbildung 1 dargestellt (nach Kolenbrander et al., 2002 [1]).



**Abb. 1: Modell der bakteriellen Kolonisation der Zahnoberfläche (nach Kolenbrander et al., 2002 [1]).**

Es ist eine Unterteilung der den Zahn besiedelnden Bakterien in Früh-/und Spätbesiedler vorgenommen worden (schwarze Pfeile). Die Vernetzung der Bakterien untereinander, sowie an das Pellicel erfolgt über Rezeptoren (grüne Kästen und blaue Zylinder) und Adhäsine (blaue Pfeile). Die dargestellten Bakterienspezies sind die Streptokokken-Spezies *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii* und *S. sanguinis* (blaue Kreise), die *Actinomyces* spp. *A. naeslundii* und *A. israelii* (rote Ellipsen), *Prevotella denticola*, *Prevotella intermedia* (grüne Ellipsen), *Veillonella atypica*, *Propionibacterium acnes*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, weitere Eubakterien (orange) sowie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (rot).

Das Vorhandensein eines Biofilms wird als Voraussetzung für das Auftreten von Infektionen in der Mundhöhle, wie zum Beispiel Parodontitis und Karies, diskutiert [3,4,6,15,16].

Neben der Biofilmbildung auf Zahnoberflächen und der Mundschleimhaut wird auch das Auftreten von Biofilmen an dentalen Füllungsmaterialien beobachtet und als Ursache für das Auftreten von Sekundärkaries und Demineralisationsprozessen an Schmelz und Dentin angesehen [17-20]. Als Sekundärkaries bezeichnet man kariöse Läsionen an den Rändern einer Zahnrestauration [21,22], wobei zwei Formen unterschieden werden. Die erste Form findet sich an der äußeren Zahnoberfläche neben dem Füllungsrand, die zweite Form ist an der Zahninnenfläche zu finden, die der Füllung anliegt, und entsteht bei Undichtigkeiten zwischen Zahn und Füllung [22]. Der Austausch einer Restauration ist zu 60 % der Sekundärkaries geschuldet [21].

Bereits kurz nach Einsetzen verschiedener Füllungsmaterialien in den Mund kann auf der Füllungsoberfläche der Beginn der Biofilmbildung beobachtet werden [20]. Es wird vermutet, dass die Art des Füllmaterials mit seinen spezifischen Materialeigenschaften einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung eines Biofilms auf dem Füllmaterial besitzt [19] und dass verschiedene Materialien unterschiedlich starke Plaqueakkumulationen und Bakterienadhäsionen aufweisen [21].

Studien zufolge weisen Amalgamfüllungen einen antibakteriellen Effekt auf [23], der durch die Freisetzung von Quecksilberionen entsteht [21,23]. Da jedoch der Wunsch nach ästhetischen, zahnfarbenen Füllmaterialien besteht und Ängste über eventuelle Nebenwirkungen von Amalgamfüllungen bestehen, werden immer mehr alternative Materialien, wie zum Beispiel Kunststoffe (Komposite) oder Glasionomere, als Restaurationsmaterial benutzt [24]. Als nachteiliger Effekt bei den Kompositfüllstoffen ist die auftretende Polymerisationsschrumpfung zu sehen, bei der es zwischen Zahn und Füllmaterial zur Bildung eines Spaltes kommen kann [24,25], der von Mikroorganismen besiedelt wird und die Entstehung von Sekundärkaries begünstigen kann [21,24,26,28]. Ein direkter antibakterieller Effekt von nicht modifizierten Kompositen war jedoch experimentell bisher nicht nachweisbar [21,24,26,27]. Mehrere Publikationen weisen bei Glasionomeren einen antibakteriellen Effekt nach [24,28-31]. Jedoch ist er als Füllungswerkstoff nicht polierbar und die Kantenfestigkeit ist schlecht, weswegen er allenfalls im Milchgebiss oder bei Kavitäten im Wurzelzement verwendet wird, wohingegen Komposit für die Füllung von Front- und Seitenzähnen geeignet ist [32].

Für die Entwicklung eines zahnfarbenen Füllmaterials, das die Bakterienadhäsion und somit auch die Biofilmbildung und befürchtete Sekundärkaries reduziert oder verhindert, wurden in den letzten Jahren verschiedene Forschungsarbeiten durchgeführt, bei denen modifizierte Komposite untersucht wurden.

Ein Triclosan-haltiges Komposit wurde, im Vergleich zu einem nicht modifizierten Material, als antibakteriell eingestuft, da die Bakterienspezies *A. viscosus*, *S. mutans* und *Lactobacillus casei* in Einzelsuspension getestet und unterschiedlich stark in ihrem Wachstum gehemmt wurden [27]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Wachstum eines Biofilms auf einem Chlorhexidin-modifizierten Komposit verlangsamt war [33]. Durch Zusatz von quartärem Ammonium war in einer weiteren Studie eine antibakterielle Aktivität nachweisbar, die mindestens einen Monat anhielt [34]. Die Modifikation durch Zusatz von Silbermikropartikeln wirkte *in vitro* sowohl anti-adhäsiv als auch bakterizid auf *Streptococcus mutans* [35].

Neben Modifikationen von Komposit durch antibakterielle Zusätze wurde ebenfalls untersucht, ob Materialien mit geringer Oberflächenenergie und glatterer Oberflächenbeschaffenheit einen Einfluss auf die Biofilmbildung haben [18,36,37]. Carlen et al. beobachteten 2001, dass auf polierten Kunststoffoberflächen, im Vergleich zum selben unpolierten Material, weniger Biofilmbildung stattfand [36]. Rüttermann et al. entwickelten 2010 bakterizid und anti-adhäsiv modifizierte Kunststoffe (Zusammensetzung s. Kap. 3.1.7), bei denen sie durch Zugabe von bestimmten Wirkstoffen die Oberflächenenergie im Vergleich zu einem nicht modifizierten Standardkunststoff reduzieren konnten [37]. Im Jahr 2012 überprüften sie mittels Fluoreszenzmikroskopie, ob sich die Überlebensfähigkeit dentaler frühbesiedelnder Bakterien (darunter die Streptokokkenspezies *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis* und die Actinomycetenspezies *A. naeslundii* und *A. viscosus*) auf der Oberfläche dieser modifizierten Kunststoffe von denen des Standardkunststoffes unterschied. Sie stellten fest, dass sich die modifizierten Materialien eigneten, um die bakterielle Adhäsion und Überlebensrate zu reduzieren [18]. Da mittels Fluoreszenzmikroskopie keine Quantifizierung einzelner adhärenter Bakterienspezies im Bakteriengemisch eines Biofilms möglich war, wurden die von Rüttermann et al. modifizierten Kunststoffe zur Verfügung gestellt, um im Rahmen dieser Arbeit mittels TaqMan-PCRs eine Quantifizierung der Actinomycetenspezies *A. naeslundii* und *A. viscosus* auch aus polybakteriellen Biofilmen durchführen zu können.

In der TaqMan-PCR, bei der neben einem Primerpaar auch eine speziesspezifische Sonde eingesetzt wird, werden Genfragmente, bzw. Nukleinsäureabschnitte, vervielfältigt und in Echtzeit (Real-time) quantifiziert [38]. Es ist eine verbreitete Methode zur Analyse klinisch-mikrobiologischer Proben [39]. Die Anwendungsbreite der Real-time PCR hat in den letzten Jahren zugenommen, da es eine schnelle und sensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung von Bakterien in Proben darstellt [40]. Es können absolute Bakterienzahlen bestimmt werden, wenn simultan zur Amplifikation der unbekannt Probe Quantifizierungsstandards in bekannten Konzentrationen analysiert werden [40,41]. Da so auch der Nachweis von schwierig zu kultivierenden Bakterien gelingt [40,58], wurde die TaqMan-PCR bereits zur Quantifizierung oraler Mikroorganismen in dentalen Biofilmen eingesetzt [9,39,40]. Die Auswahl geeigneter Primer- und Sondenbindungsstellen, die speziesspezifisch für die nachzuweisenden Organismen sein müssen, ist essentiell für den Erfolg einer TaqMan-PCR. Meist werden hierfür speziesspezifische Bereiche des 16S rRNA-Gens gewählt oder Bereiche in Genen, die für speziesspezifische Proteine kodieren [9].

Die Identifikation von Bakterienspezies anhand ihrer 16S rRNA Gensequenz gilt als weit verbreitete Methode [43], jedoch lassen sich manche eng verwandte Spezies so nicht eindeutig differenzieren. Auch für einige *Actinomyces* Spezies, wie zum Beispiel *A. naeslundii*, wurde die 16S rDNA-basierte Typisierung als nicht sehr zuverlässig angesehen [42,43]. Im Genom von *A. naeslundii* und *A. viscosus* wurden jedoch auch andere Gene identifiziert, die für eine Differenzierung dieser Actinomycetenspezies geeignet zu sein schienen. Mehrere Publikationen bezogen sich dabei auf die Charakterisierung der Gene *fimA* und *fimP*, die für die Untereinheiten der bakteriellen Fimbrien kodieren [12,13,14] und *nanH*, das Sialidase kodiert [12,44]. Die Arbeitsgruppe von Henssge et al. versuchte 2009, die drei verschiedenen Genotypen von *A. naeslundii* anhand ihrer sechs *housekeeping*-Gene *atpA* oder F1A (ATP-Synthase F1  $\alpha$ -Untereinheit), *rpoB* (RNA-Polymerase  $\beta$ -Untereinheit), *pgi* (Glucose-6-Phosphat-Isomerase), *metG* (Methionyl-tRNA Synthase), *gltA* (Citrat-Synthase I) und *gyrA* (DNA-Gyrase A-Untereinheit) zu differenzieren und von anderen Actinomycetenspezies abzugrenzen. Es ergab sich, dass die Differenzierung der drei Genotypen am besten anhand der Gene *atpA* und *metG* durchzuführen war [43]. In verschiedenen Actinomyceten wurden darüber hinaus die Gene *levJ* und *ureC*, die für die am Stoffwechsel beteiligten Enzyme Levanase und Urease kodieren, zur Speziesdifferenzierung mittels Southern Blot herangezogen [12] und sollten somit ebenfalls für die speziesspezifische Amplifikation mittels Realtime PCR geeignet sein.

## 2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung von TaqMan-PCRs zum speziesspezifischen Nachweis der beiden Bakterienspezies *Actinomyces naeslundii* und *Actinomyces viscosus*. Es sollten hierzu zuerst Bereiche im Genom der beiden Spezies gefunden werden, die einen speziesspezifischen Nachweis des jeweiligen Bakteriums ermöglichen. Nach erfolgreicher Etablierung sollten die entwickelten PCRs in einer Versuchsreihe, die in Zusammenarbeit mit der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie der Heinrich-Heine-Universität stattfand, zum Einsatz kommen, um modifizierte Füllungskunststoffe auf ihre anti-adhäsiven, beziehungsweise bakteriziden Wirkungen auf orale Frühbesiedler im Vergleich zu einem Standardfüllungskunststoff zu untersuchen.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Primer und Sonden

Mit dem Computerprogramm „Primer Express“ (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) wurden Primer und Sonden für TaqMan PCRs selbst konfiguriert.

Die folgenden Primer und Sonden (s. Tab.1) wurden bei der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

**Tabelle 1: Sequenzen der getesteten Primer und Sonden**

Spezies	Primer/Sonden	Sequenz (5'-3')	Amplikon - größe /bp	Gen	Literatur
Eubakterien	Euba-for (P891)	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA	143	16S rDNA	*
	Euba-rev (P1033)	TGCGGGACTTAACCCAACA			
	Euba-S (P1024)	TexRed-CACGAGCTGACGACARCCATGCA-BHQ			
Act.spp	Act-174-F	GGTCTCTGGGCGGTTACTGA	112	16S rDNA	[45]
	Act-281-R	GRCCCCCACCCTAGTG			
	Aodo-R	TGGCCCCCACCCTAGTG			
	Act-237-T	FAM-CTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGG-BHQ			
<i>A. naeslundii</i>	Anae-F1	TCGAAACTCAGCAAGTAGCCG	96	k.A.	[9]
	Anae-R1	AGAGGAGGGCCACAAAAGAAA			
	Anae-S1	HEX-GGGTACTCTAGTCCAACTGGCGGATAGCG-TAMRA			
<i>A. naeslundii</i>	Anae-F2	GTTCTGTGTCTTTGTTGTTGTTT	69	ISR	[40]
	Anae-R2	CTTCATCGGCCCTGATG			
	Anae-S2	FAM-TGAGCGTTCGGTGGAT-MGB			
<i>A. viscosus</i>	Avis-F2	ATGTGGGTCTGACCTGCTGC	96	k.A.	[9]
	Avis-R2	CAAAGTCGATCACGCTCCG			
	Avis-S2	FAM-ACGGAGGTCGGAACGGTGAAG-TAMRA			
<i>A. viscosus</i>	Avis-F1	GTAACCTGCCCCCTTCTTCTG	103	16S rDNA	selbst
	Avis-R1	AACACCCAAAGGCGCATCT			
	Avis-S1	HEX-CGGGATATTCTGGGTCTGTCGCATG-BHQ			
<i>A. viscosus</i> + <i>A. naeslundii</i>	ANVF	TAACCGCATGAAAGTGTGGGC		16S rDNA	selbst
<i>A. naeslundii</i>	ANF3	GGGCCTGGGAAAGATTG		16S rDNA	selbst
Act. spp	ActR3	CAAGCTGATAGCCGCGA		16S rDNA	selbst
<i>A. naeslundii</i> + <i>A. viscosus</i>	ANVR	TGACCGTGACCCTCTCA		16S rDNA	selbst

A. <i>naeslundii</i>	Anae S3	FAM-TTTTTGGTGT TTTTGGTGGGGGATC-BHQ-1		16S rDNA	selbst
A. <i>viscosus</i>	Avis S3	Hex-CCTGGGAAAGTTTGTTCGGTGG-BHQ-1		16S rDNA	selbst
A. <i>viscosus</i>	Avis <i>nanH</i> -34F	GTCGACAACCAGACGGGC	76	<i>nanH</i>	selbst
	Avis <i>nanH</i> -109R	CGGCCTGTGAGTGGCC			
	Avis <i>nanH</i> -64T	FAM-TTCCACGTCAAGTCCTTCGACCAGG-BHQ-1			
	Avis <i>nanH</i> -F2	CGCCCAACCCGAACCAC	250	<i>nanH</i>	*
	Avis <i>nanH</i> -R2	CATCCAAGCCGAGGTCTCCAC			
	AvisF1A-257F	GGGCCGGCTCCATGA	123	F1A	selbst
	AvisF1A-379R	TGAACAGGTCAGACTGGAGGAA			
	AvisF1A-238T	Hex-ATCATCGAGACCAAGCCAACGACG-BHQ-1			

\* =designt im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

k.A. = keine Angabe des Gens

selbst = im Rahmen dieser Arbeit selbst designt

Primer und Sonden wurden als Lyophilisate erhalten, durch Zugabe von 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 auf eine Konzentration von 100 pmol/  $\mu$ l (= 100 $\mu$ M) verdünnt und bei -20°C als Stocklösung gelagert.

### 3.1.2 MasterMixe

- Mesa Green qPCR Mastermix plus (Eurogentec, Seraing, Belgien) für Realtime PCRs ohne Sonde
- qPCR Mastermix No ROX ( Eurogentec, Seraing, Belgien) für TaqMan-PCRs mit Sonde
- iQ Supermix (Biorad / Hercules, Canada) für konventionelle PCRs

### 3.1.3 Kits

- High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Mannheim, Deutschland)
- Nucleo Spin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Rapid DNA Ligation Kit (Roche, Mannheim, Deutschland)

### 3.1.4 Bakterienstämme

Zur Etablierung und Evaluierung von TaqMan PCRs wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

**Tabelle 2: verwendete Bakterienstämme**

Spezies	Abkürzung	Bezeichnung / Stamm
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Axyl	SP 6486-2012 (Patientenisolat)
<i>Actinomyces europaeus</i>	Aeur	Ringversuchsstamm INSTAND 2004
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Anae	ATCC 19039(= DSM 17233) (Anae I) ATCC 12104 (= DSM 43013) (Anae II)
<i>Actinomyces neuii anitratus</i>	Aneu	Ringversuchsstamm INSTAND 2003
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Aodo	SP 6320-2012 (Patientenisolat)
<i>Actinomyces urogenitalis</i>	Auro	Ringversuchsstamm INSTAND 2002
<i>Actinomyces viscosus</i>	Avis	ATCC 15987 (= DSM 43327) (Avis I) DSM 43329 (Avis II)
<i>Escherichia coli</i>	E.coli	DH5 $\alpha$
<i>Haemophilus influenzae</i>	Hinf	SP 299-2013 (Patientenisolat)
<i>Streptococcus intermedius</i>	Sint	SP14964-2012 (Patientenisolat)
<i>Streptococcus mitis</i>	Smit	ATCC 49456 (= DSM 12643)
<i>Streptococcus oralis</i>	Sora	ATCC 35037 (=DSM 20627)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Ssan	DSM 20068
<i>Veillonella parvula</i>	Vpar	ATCC 17745

### 3.1.5 Klonierungsvektor

pGEM-T Vector System ( Promega, Madison, USA) (Vektorgröße: 3003 bp)



### 3.1.6 Chemikalien

- Biozym LE Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- DNA-Marker „Massruler DNA Ladder, Mix“ (Thermo Scientific, Waltham, USA)
- Ethidiumbromid (Konzentration 1mg/ml, Biorad, Hercules, Canada)
- Glycerin
- IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) (Thermo Scientific, Waltham, USA)
- LB-Medium [5g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton und 10g/l NaCl] (Life Technologies, Carlsbad, USA)
- 6x Mass Ruler Loading Dye (Fermentas von Thermo Scientific, Waltham, USA)
- PBS (pH 7,4) [137mM NaCl, 2,7mM KCl, 12mM Phosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )] (Life Technologies, Carlsbad, USA)
- SOC-Medium (pH 7) [0,5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20mM Glucose] (Life Technologies, Carlsbad, USA)
- 0,5 x TBE Puffer [ 89mM Tris, 89mM Borsäure, 2mM EDTA] (Thermo Scientific, Waltham, USA)
- 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (Promega, Madison, USA)
- X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) (Thermo Scientific, Waltham, USA)

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von Sigma, Serva oder Merck bezogen.

### 3.1.7 Prüfkörper

Kunststoffprüfkörper (Durchmesser 10mm, Dicke 1mm, einseitig poliert) wurden von der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie zur Verfügung gestellt. Mittels aktiver Substanzen waren die Kunststoffe P2 und P7 (beide weniger adhäsiv) und P8/9 und P9 (beide bakterizid) im Vergleich zum herkömmlich verwendeten Standardkunststoff ST (Zusammensetzung siehe Tabelle 3, sowie [18]) modifiziert worden.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der modifizierten Kunststoffe P2-P9 und des Standardkunststoffes ST.**

	ST	P2	P7	P8/9	P9
<b>Glas</b>	73%	68,2%	73%	73%	73%
<b>Matrix</b>	27%	26,8%	24,3%	19%	23%
<b>Aktive Substanz</b>	0%	4%(Poly-Dimeth 80%)	2,7% (Tegorad 2250)	8%(Methacryl- Irgasan)	4%(Methacryl- Irgasan)

Angabe von Gewichtsprozent von Glas, Matrix und aktiver Substanz, wobei Poly-Dimeth80% = Poly Pore gefüllt mit 80% Dimethicone  $D=1.0 \text{ g cm}^{-3}$  und Tegorad 2250 = Silicone Polyether Acrylat  $D= 1.05 \text{ g cm}^{-3}$ .

### 3.1.8 Bakteriengemisch

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte im Labor der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie der Heinrich-Heine-Universität. Für die Streptokokken-Anzucht wurde jeweils eine Kolonie in 40 ml TSB (Trypticase soy yeast Extract Medium, Firma Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA), für die Actinomyceten-Anzucht eine Kolonie in AM-B (Actinomyces-Bouillon, Firma Vegiton, Sigma-Aldrich Inc.) inkubiert (24h bei 37°C). Am Tag vor dem Experiment wurden jeweils 300 µl der Suspension in 50 ml steriles TSB, bzw. AM-B übertragen und für weitere 12 h bei 37°C inkubiert. Das Bakteriengemisch zur *in vitro* Prüfkörperinkubation bestand aus einer equivoluminösen Mischung von der Bakteriensuspensionen: *Actinomyces naeslundii* (DSM 17233), *Actinomyces viscosus* (DSM 43329), *Streptococcus oralis* (DSM 20627), *Streptococcus mitis* (DSM 12643) und *Streptococcus sanguis* (DSM 20068); mit je einer optischen Dichte von OD=1,0 (eingestellt nach Messung der optischen Dichte bei 600nm).

Ein Milliliter des Bakteriengemisches enthielt somit je 200 µl jeder Ausgangsbakteriensuspension.

### 3.1.9 Weitere Materialien

- LB-Amp-Platten (100 µg/ml Ampicillin, 15 g/l LB-Medium)
- 96 x 0,2ml-low profile PCR-Platten (Bioplastics, Landgraaf, Niederlande) mit 8er Deckelstreifen (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- 1,5 ml Eppendorf-Gefäße
- 0,5 ml Eppendorf-Gefäße
- Pipetten (Finnpipetten F1) 0,2-2µl/2-20µl/20-200µl/100-1000µl (Thermo Scientific, Waltham, USA) mit gestopften Pipettenspitzen „Tip One“ (Starlab, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge „Mini Spin“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

### 3.1.10 Software/ Programme

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]
- CFX Manager 2.1 (Bio-Rad, Hercules, Canada)
- Megalign (Lasergene Software package, DNA Star, Madison, USA)
- Microsoft Office Paket 2010
- Primer Express 2.0.0 (Applied Biosystems von life technologies, Carlsbad, USA)

### 3.1.11 Geräte

- EZ1-Biorobot (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- iCycler CFX96 (Bio-Rad, München, Deutschland)
- PCR-Cycler T-Gradient (Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Nucleo Spin Extract II- Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet:

Von 50  $\mu\text{l}$  PCR-Reaktion wurden 45  $\mu\text{l}$  für die Aufreinigung benutzt, mit 55  $\mu\text{l}$  aqua dest. auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 200  $\mu\text{l}$  NT Puffer versetzt. Eine Nucleo Spin Extract II Säule, die als Boden eine DNA-bindende, flüssigkeitsdurchlässige Matrix enthielt, wurde in ein 2 ml Auffanggefäß gesetzt und nach Umfüllen des PCR-Gemisches in die Säule für 1 min mit 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, und in die Säule 700  $\mu\text{l}$  NT3 Puffer pipettiert. Die im 2ml Auffanggefäß positionierte Säule wurde zuerst für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert, der Durchfluss aus dem Auffanggefäß entfernt, und das Säulen/Auffanggefäßset danach weitere 2 min zentrifugiert, um den Ethanol-haltigen NT3 Puffer möglichst komplett zu entfernen. Das Gefäßset wurde mit geöffnetem Säulendeckel für 5 min in den Brutschrank (37°C) gestellt, um restliches Ethanol von der Säulenmatrix zu entfernen. Die Nucleo Spin Extract II Säule wurde nun in ein neues 1,5 ml Auffanggefäß überführt und die Säulenmatrix mit 25  $\mu\text{l}$  NE Puffer getränkt. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur wurde erneut für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Das aufgereinigte PCR-Produkt, das nun im Säuleneluat im 1,5 ml Auffanggefäß vorlag, wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.2.2 Ligation

Zur Herstellung von Quantifizierungsplasmiden wurden die jeweiligen PCR-Produkte nach Aufreinigung aus einem konventionellen PCR-Ansatz (siehe Kap. 3.2.7.1) in den pGemT-Vektor kloniert.

Der Einfach-Ansatz für die Ligation bestand aus

- 0,5  $\mu\text{l}$  pGEM-T Vektor (50 ng/ $\mu\text{l}$ ) (s.Kap. 3.1.5)
- 1  $\mu\text{l}$  aqua dest.
- 2  $\mu\text{l}$  5x DNA Dilutionspuffer
- 5  $\mu\text{l}$  2x T4 DNA Ligationspuffer
- 0,5  $\mu\text{l}$  T4 DNA-Ligase (5 U/ $\mu\text{l}$ ).

Puffer und Ligase wurden dem Rapid DNA Ligation Kit der Firma Roche (s. Kap. 3.1.3) entnommen und entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Zu dem Ligationsansatz wurden 1  $\mu$ l der aufgereinigten PCR-Produkt-Lösung (ca. 5-25 ng DNA/ $\mu$ l) (s. Kap. 3.2.1) gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei das molare Verhältnis von Insert zu Vektor 2-5 betragen sollte.

### 3.2.3 Transformation

Zu dem Ligationsansatz wurden 100  $\mu$ l kompetente Bakterien des *E. coli* -Stammes DH5 $\alpha$  hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 2 min auf 42° C erwärmt und anschließend wieder kurz auf Eis gestellt.

Dem Ansatz wurden dann 800  $\mu$ l SOC-Medium hinzugefügt. Nach 1,5 stündigem Schütteln im Brutraum bei 37°C wurde der Transformationsansatz auf 2 LB-Amp-Platten verteilt (1/10 und 9/10), die zuvor durch Zugabe von 50  $\mu$ l SOC-Medium, 50  $\mu$ l X-Gal und 10  $\mu$ l IPTG vorbereitet wurden, um Insert-tragende Klone durch blau-weiß Selektion voneinander unterscheiden zu können. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet. Insert-tragende Klone erschienen in der Regel durch Inaktivierung des lacZ-Gens weiß, insertlose hingegen blau.

Am folgenden Tag wurden einzelne (weiße) Kolonien mit einer Pipettenspitze von den Platten gepickt, die Pipettenspitze dann in den entsprechenden PCR-Mix getaucht und anschließend in 5 ml LB-Amp-Medium überführt und zur Kultivierung des Klones über Nacht geschüttelt. Es wurden als Negativkontrollen sowohl eine blaue Kolonie als auch eine unbewachsene Stelle der Agarplatte ausgewählt und parallel zu den gepickten Klonen in der PCR amplifiziert.

Die Plasmid-DNA PCR-positiver Klone wurde anschließend mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) isoliert (s. Kap. 3.2.4), um anschließend Quantifizierungsstandards herzustellen, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben.

### 3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das High Pure Plasmid Isolation Kit der Firma Roche verwendet.

4 ml der in LB-Amp-Medium über Nacht kultivierten *E. coli*- Bakterien (siehe Kap. 3.2.3) wurden 2 min bei 6000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Bakteriensediment wurde in 250 µl RNase-haltigem Puffer 1 (Suspensionspuffer) resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. 250 µl Puffer 2 (Lysepuffer) wurden hinzugefügt und nach leichtem Mischen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 350 µl gekühlter Puffer 3 (Bindungspuffer) wurden hinzugefügt und das geschlossene Gefäß kräftig geschüttelt, woraufhin eine flockige Lösung entstand. Diese wurde für 5 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Das protein- und genomische DNA-haltige Sediment wurde verworfen und die klare Plasmid-Lösung in eine High Pure Filter-Säule, die in ein Auffanggefäß gesetzt wurde, pipettiert. Nach 1 minütigem Zentrifugieren bei 13.000 x g wurde der Durchfluss verworfen und 500 µl Puffer 4 (Waschpuffer I) der High Pure Filter-Säule hinzugefügt. Es wurde erneut 1 min bei 13000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach der Zugabe von 700 µl Puffer 5 (Waschpuffer II) wurde erneut für 1 min bei 13000 x g zentrifugiert und nach Entfernen des Durchflusses eine weitere Minute. Zur Entfernung residueller Ethanolspuren wurde das Gefäß geöffnet und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor es in ein neues Auffanggefäß gestellt wurde. Anschließend wurden 50 µl Elutionspuffer auf die Säulenmatrix pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur und letztmaligem Zentrifugieren für 1 min bei 13.000 x g befand sich die Lösung der aufgereinigten Plasmid-DNA im Auffanggefäß. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNA-Lösung bei einer optischen Dichte von 260nm gemessen und ihre Reinheit über den 260nm/280nm-Quotienten bestimmt, der zwischen 1.8 und 2.1 liegen sollte. Die Plasmid-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.2.5 Glycerinstocks

Zur Herstellung von Glycerinstocks wurden 500 µl der in LB-Amp-Medium kultivierten *E. coli* - Bakterien mit 500 µl 100% (v/v) Glycerin versetzt und nach 20-30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur bei -80°C eingefroren.

### 3.2.6 Herstellung von Quantifizierungsstandards

Die aufgereinigte, das jeweilige PCR-Produkt als Insert tragende Plasmid-DNA (s. Kap. 3.2.4) wurde zur Konzentrationsbestimmung bei 260 nm unter Verwendung des „Nanodrop“-Gerätes vermessen. Nach Erstellung eines Nullwertes mit destilliertem Wasser wurde die Konzentration der Plasmid-DNA in ng/ $\mu$ l berechnet. Mit dieser Konzentration und der Größe des Insert-tragenden Vektors konnte über die Formel

$$1 \mu\text{l} = X \times (9,13 \times 10^8 / y) \text{ Plasmidkopien}$$

Mit  $X$  = gemessene DNA-Konzentration in ng/ $\mu$ l und  $y$  = Plasmidgröße (Insertgröße + 3,003) in kbp

die Anzahl der Moleküle in 1  $\mu$ l Eluat errechnet werden. Durch Verdünnung von jeweils 10  $\mu$ l des Eluats mit der errechneten Menge 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 wurde eine Konzentration von  $10^9$  Plasmidkopien /  $\mu$ l eingestellt und diese anschließend mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 seriell in 10er Schritten verdünnt. Zur Lagerung wurde die  $10^9$ -Verdünnung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert; die anderen Verdünnungen bei  $4^\circ\text{C}$  bzw.  $-20^\circ\text{C}$  (siehe Ergebnisteil, Kap.4.7).

Die Quantifizierungsstandards in Konzentrationen von  $10^5$ ,  $10^3$  und  $10^2$  Kopien/ $\mu$ l wurden später in den PCR-Läufen eingesetzt, um so die Kopienzahlen der zu detektierenden Bakterien einer unbekannt Probe bestimmen zu können.

Zur Bestimmung der Linearität jeder Amplifikationsreaktion wurden durch simultane Amplifikation der Quantifizierungsstandards über 4 Verdünnungsstufen ( $10^6 - 10^2$ ) in Vierfachbestimmung für jede PCR die Effizienz (E) und die Bestimmtheit ( $R^2$ ) mit Hilfe des Programmes Bio-Rad CFX Manager ermittelt.

Die Effizienz gibt Auskunft darüber, wie gut eine PCR einzustufen ist. Der optimale Wert für die Effizienz ist 2 (=100%). Das bedeutet, dass in jedem PCR-Zyklus die Zahl der Amplifikate verdoppelt wird und analog dazu auch die Fluoreszenz [38, 45, 51]. Die Effizienz E hängt von der Neigung der Standardkurve (slope) ab und kann folgendermaßen berechnet werden:

$$E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$$

Der optimale Wert der Neigung liegt bei -3,32 und entspricht einer Effizienz von 2 [45, 51]. PCRs werden als akzeptabel eingestuft, wenn E mehr als 90% aufweist [50]. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  (Pearson Correlation Coefficient), ausgedrückt als eine Zahl zwischen 0 und 1, gibt Auskunft, wie nah einzelne Messwerte eines Mehrfachansatzes dem Mittelwert sind. Anhand dieser Kriterien wurden die einzelnen PCRs beurteilt und ggf. optimiert [52].

### 3.2.7 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.2.7.1 Konventionelle PCR

Bei der konventionellen PCR erfolgt eine Vervielfältigung eines von zwei Primern flankierten DNA-Abschnittes. Bei Erhitzen des DNA-Doppelstrangs auf 95°C kommt es im Denaturierungsschritt zur Trennung der beiden DNA-Stränge, die bei Absenkung der Temperatur auf den für die Primerbindung spezifischen Wert die Hybridisierung der Primer an den kodogenen Strang (Reverse Primer) und den Antisinnstrang (Forward Primer) ermöglicht. Die im iQ Supermix enthaltene DNA-Polymerase ist nach Bindung an die Primer in der Lage, unter Einbau der Nukleotide den komplementären Strang in 3'-Richtung zu synthetisieren, sodass es pro Zyklus idealerweise zu einer Verdopplung der amplifizierten DNA-Region kommt.

Für die konventionelle PCR wurden 50 µl PCR-Ansätze in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert bestehend aus:

- 25 µl 2x iQ- Supermix (Biorad, München, Deutschland)
- 0,5 µl Forward Primer (100µM)
- 0,5 µl Reverse Primer (100µM)
- 23 µl aqua dest.
- 1 µl DNA-Probe (genomische DNA eingestellt auf 1ng/µl)

Die konventionelle PCR wurde auf einem T-Gradient-Gerät der Firma Whatman Biometra (Göttingen, Deutschland) durchgeführt, wobei auch die Verwendung jedes anderen PCR-Geräts ohne Temperaturgradienten möglich gewesen wäre. Das Temperaturprofil bestand aus 10 min bei 95°C, 35-40 Zyklen [15 s bei 95°C, 1 min bei 60°C] und einer Endtemperatur von 4°C.

Anschließend wurden zur Analyse des PCR-Produktes 5 µl des PCR-Ansatzes auf einem 2,5%igem Agarosegel gelelektrophoretisch getrennt (s. Kap. 3.2.8).



### **3.2.7.2 PCR mit MESA GREEN**

Bei Realtime-PCRs mit MESA GREEN wurde auf eine Zugabe von spezifischen Sonden verzichtet. MESA GREEN ist ein unspezifischer, Doppelstrang-DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff. Durch die in der PCR ansteigende Zahl an doppelsträngigem DNA-Amplikon wird stöchiometrisch mehr MESA GREEN gebunden, was zu einem Anstieg der messbaren Fluoreszenz führt. Somit ist eine Quantifizierung der Keimlast einer Probe möglich. Da MESA GREEN in jegliche doppelsträngige DNA interkaliert und somit keine Sequenzspezifität aufweist, können jedoch auch falsch positive Amplifikationskurven z.B. durch Interkalation in Primerdimere entstehen.

Ein Einfach-Reaktionsmix bestand aus

- 12,5 µl Mesa Green qPCR MasterMix ( Eurogentec)
- 0,075 µl Forward Primer ( 100 µM)
- 0,075 µl Reverse Primer ( 100 µM)
- 10 µl aqua dest.

Jeweils 20 µl Reaktionsmix wurden in eine Vertiefung einer 96-Well-PCR-Platte pipettiert und mit 5 µl DNA-Probe, Quantifizierungsstandard ( $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ) oder Negativkontrolle (Aqua dest.) versetzt. Die PCR-Platte wurde mit Deckelstreifen verschlossen. Es wurde das Realtime Gerät iCycler CFX96 der Firma Biorad mit dem Programm TaqMan 1.2 verwendet. Das Temperaturprofil dieses Programmes bestand aus 10 min bei 50°C (dem AmpErase-Schritt, bei dem eingeschleppte, Uracil-haltige Amplikons zerstört werden), gefolgt von 10 min bei 95°C und 44 Zyklen [15 s bei 95°C, 1 min bei 60°C]. Die im Reaktionsansatz vorhandene AmpErase dient zu Beginn jeder TaqMan-PCR (bei 50 °C) der Kontaminationsverhinderung durch Zerstörung von eingeschleppten Amplikons, da Uracil statt Thymin in die PCR-Produkte eingebaut wird, welches dann durch die AmpErase hydrolysiert wird. So liegt in der dann folgenden Amplifikationsreaktion nur noch genomische DNA als Amplifikationsmatrize vor. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Bio-Rad CFX Manager 2.1, bei dem in einer Grafik die relativen Fluoreszenzänderungen (RFU) gegen die Zyklenzahl aufgetragen werden. Es entstehen sigmoide Kurven, die sich in drei Phasen einteilen lassen. Am Anfang ist die eigentliche Fluoreszenz nicht von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden. Während der exponentiellen Amplifikationsphase verdoppelt sich die Menge an DNA in jedem Zyklus. Dies führt schließlich zu einem Mangel einer Komponente und die Zunahme an Fluoreszenz verlangsamt sich und erreicht die Plateauphase.

Der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, wird als CT-Wert angegeben [38] und kann über den Threshold reguliert werden (s. Abbildung 2).

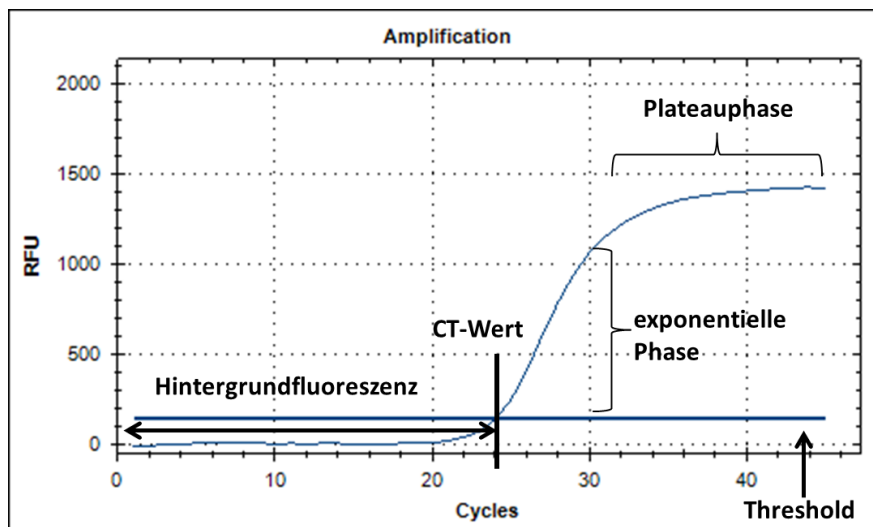


Abb. 2: Amplifikationskurve mit CT-Wert

### 3.2.7.3 TaqMan PCR

Im Gegensatz zu der konventionellen PCR erlaubt die TaqMan PCR eine Quantifizierung der Keimlast einer Probe. Des Weiteren wird bei der TaqMan PCR eine speziesspezifische Sonde eingesetzt, die am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Reporter) und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert ist und an einen Strang des vom Primerpaar flankierten Bereichs bindet. Die Reporterfluoreszenz wird bei intakter TaqMan Sonde durch den Quencher unterdrückt. Bei Bindung an den zu amplifizierenden Bereich kommt es aufgrund der Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zur Loslösung des Reporters und zur räumlichen Entfernung vom Quencher, sodass nun die Reporterfluoreszenz gemessen werden kann. Je mehr PCR-Produkt entsteht, desto stärker wird das messbare Fluoreszenzsignal [nach 45, 51]. Die im Reaktionsansatz vorhandene AmpErase dient zu Beginn jeder TaqMan-PCR (bei 50°C) der Kontaminationsverhinderung durch Zerstörung von eingeschleppten Amplikons (siehe Kap. 3.2.7.2). Für die TaqMan PCRs wurden 50-fach-Reaktionsmische in einem separaten Raum vorpipettiert, um eine Kontamination der MasterMische mit DNA zu vermeiden.

Ein 50-fach-Ansatz bestand bei einer Monoplex-PCR aus:

- 625  $\mu$ l 2xqPCR MasterMix No ROX ( Eurogentec)
- 3,75  $\mu$ l Forward Primer (100 $\mu$ M)
- 3,75  $\mu$ l Reverse Primer (100 $\mu$ M)
- 2,5  $\mu$ l Sonde (100 $\mu$ M)
- 375  $\mu$ l aqua dest.

Bei einer Duplex-PCR, bei der zwei verschiedene PCRs aufgrund unterschiedlich fluoreszierender Reporter-moleküle in einem Reaktionstube durchgeführt werden können, wurden entweder

1. jeweils die Hälfte an Forward-/ Reverse Primern und Sonde eingesetzt, d.h. 2x 1,875  $\mu$ l Forward- und Reverse Primer und 2x 1,25  $\mu$ l Sonden (später „2 x 0.5-fache Konz.“ genannt) oder
2. jeweils die normale Konzentration an Forward-/Reverse Primern und Sonde pipettiert, d.h. 2x 3,75  $\mu$ l der Primer und 2x 2,5  $\mu$ l der Sonden (später „2 x 1-fache Konz.“ genannt).

Von den fertigen MasterMixen wurden jeweils 20  $\mu$ l pro Well einer 96-Well-PCR-Platte pipettiert und schließlich bei den Vorversuchen mit 5  $\mu$ l Probe versetzt. Bei den späteren DNA-Proben der Prüfpasten wurden 22,5  $\mu$ l MasterMix mit 2,5  $\mu$ l Probe versetzt. Bei der Duplex-PCR wurden zweimal 5  $\mu$ l, bzw. 2x 2,5  $\mu$ l Probe eingesetzt (siehe Ergebnisteil). Die Platte wurde nach Pipettieren der Quantifizierungsstandards mit Deckelstreifen verschlossen.

Es wurde das Realtime-PCR Gerät iCycler CFX96 der Firma Biorad mit dem Programm TaqMan 1.2 verwendet. Das Temperaturprofil entsprach dem der MESA GREEN-PCR (s. Kap. 3.2.7.2).

Die PCRs wurde mit dem Programm Bio-Rad CFX Manager 2.1 ausgewertet.

### 3.2.8 Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines 2,5%igen Agarosegels wurden 2,5 g Agarosepulver in 100 ml 0,5x TBE Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf 50°C unter Einsatz eines Taschenformers in eine horizontale Agarosegelelektrophoresekammer gefüllt. Nach dem Aushärten wurde das Gel mit 0,5x TBE Puffer vollständig bedeckt und der Taschenformer entfernt.

Als Längenstandard wurden in die erste Tasche des Gels 5 µl Marker DNA Ladder Mix Massruler (Thermo Scientific, Waltham, USA) pipettiert. In die weiteren Taschen des Gels wurden die entsprechenden Proben aus den PCRs aufgetragen. Jeweils 5 µl PCR-Produkt wurden hierzu mit 1 µl 6xMass Ruler Loading Dye (Fermentas von Thermo Scientific, Waltham, USA) beschwert, und das Gemisch anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 50 mA. Je kürzer ein DNA-Stück war, desto schneller bewegte es sich durch die Poren des Gels im elektrischen Feld aufgrund des negativ-geladenen Phosphatrückgrads zur Anode. Nach der Auftrennung erfolgte die Anfärbung der bandierten DNA durch Schwenken des Gels für 15 min im 0,1 µg/ml konzentrierten Ethidiumbromid-Bad. Nach Entfärben der DNA-freien Bereiche durch Schwenken des Gels für 15 min in Wasser konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

### 3.2.9 *In vitro* Adhäsionsassay an Prüfkörper

Die Kunststoffprüfkörper P2, P7, P8/9, P9 und ST wurden für die *in vitro*-Versuche in Doppelbestimmung für zwei Stunden mit 250 µl Speichel (sterilfiltriert und 1:2 mit PBS verdünnt) bei 37 °C inkubiert, gefolgt von zwei Spülungen mit 0,9% (w/v) NaCl. Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren (1000 U/min bei 4°C, 10 min) aus den Übernachtskulturen geerntet, zweifach in NaCl gewaschen und in NaCl resuspendiert. Die optische Dichte wurde bei 600nm gemessen und auf 1 OD eingestellt. Anschließend wurden die Prüfkörper für entweder 8 h oder 24 h mit 350 µl Keimsuspension (s. a. Kap. 3.1.8) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Standardpastenprüfkörper (ST) zusätzlich nur mit 0,9% NaCl inkubiert.

### **3.2.10 *In situ* Adhäsionsassay an Prüfkörper**

Die Kunststoffprüfkörper P2, P7, P8/9, P9 und ST wurden von zwei Probanden über einen Zeitraum von 8h im Mund getragen. Hierbei kamen speziell für die Probanden in der Poliklinik für Zahnerhaltung, Endodontologie und Parodontologie der Heinrich-Heine-Universität hergestellte Zahnschienen zum Einsatz.

### **3.2.11 Isolierung genomischer DNA von den Prüfkörpern**

Die Isolierung der genomischen DNA von den Kunststoffprüfkörpern wurde vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Es wurde nach dem Protokoll des DNA Isolierungskits „QIAamp DNA Mini Kit“ von Qiagen gearbeitet. Pro Prüfkörper entstanden jeweils 100 µl DNA-Eluat.

### **3.2.12 Isolierung genomischer DNA aus Abstrichen**

Mit einem Wattetupfer wurden Abstriche von der Wangenschleimhaut der Probanden entnommen und bei -20°C gelagert. Bei Proband 1 wurde die Watte zur Resuspension mit 500 µl Lysepuffer versetzt und 60 min unter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 10 minütige Erhitzung auf 95°C (diese Methode wird im Folgenden als Hitzelyse bezeichnet). Zur DNA-Isolierung wurden 200 µl der Suspension mit dem EZ1-Biorobot von Qiagen aufgearbeitet und die DNA in 100 µl eluiert (diese Aufarbeitung wird im Folgenden als EZ1-Aufbereitung benannt). Die DNA des Abstrichs von Proband 2 wurde wie die DNA von den adhärenenten Keimen der im Mund getragenen Kunststoffe im BMFZ unter Verwendung des Qiagen-DNA Isolierungs-Kits manuell aufgereinigt. Es entstanden ebenfalls 100 µl DNA-Eluat pro Probe. Alle DNA-Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.2.13 Isolierung genomischer DNA aus Speichel**

Bei den späteren *in situ* Versuchen wurden Speichelproben der Probanden mit dem EZ1-BioRoboter aufgereinigt. Dazu wurden 200 µl Speichel verwendet, nach dem Bakterienprotokoll aufgereinigt und die DNA in 100 µl eluiert.

### **3.2.14 Probanden und Ethikvotum**

Zur *in situ* Testung der adhäsiven Eigenschaften der verschiedenen Kunststofffüllmaterialien erklärten sich zwei an der Herstellung beteiligte Probanden bereit, die Materialien für 8 Stunden im Mund zu tragen. Es handelte sich hierbei um eine männliche und eine weibliche Person. Es wurde für diese Untersuchungen ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät eingeholt (Studennummer 4145).

## 4. Ergebnisse

Die Anheftung oraler frühbesiedelnder Bakterien an und um dentale Füllungsmaterialien soll eine Rolle bei der Entstehung von Sekundärkaries spielen. Um die Bildung dieser am Füllungsrand auftretenden Karies zu reduzieren, wurden in der Vergangenheit Versuche unternommen, die Eigenschaften der Füllmaterialien so zu modifizieren, dass die Anheftung von Bakterien reduziert ist (siehe Einleitung). Die im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellten modifizierten Kunststoffe aus der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie der Heinrich-Heine-Universität sollten auf ihre anti-adhäsiven Wirkungen untersucht werden, indem die Quantität der auf ihnen adhärierenden frühbesiedelnden Bakterien mit der auf einem Standardkunststoff verglichen wurde. Um eine Quantifizierung einzelner Bakterienspezies durchführen zu können, wurden in einem ersten Schritt dieser Arbeit TaqMan-PCRs etabliert, mit denen ein quantitativer, speziesspezifischer Nachweis der frühbesiedelnden Actinomycetenspezies *A. naeslundii* und *A. viscosus* möglich war.

### 4.1 Bekannte qPCRs ermöglichen keinen speziesspezifischen Nachweis von *A. naeslundii* und *A. viscosus*

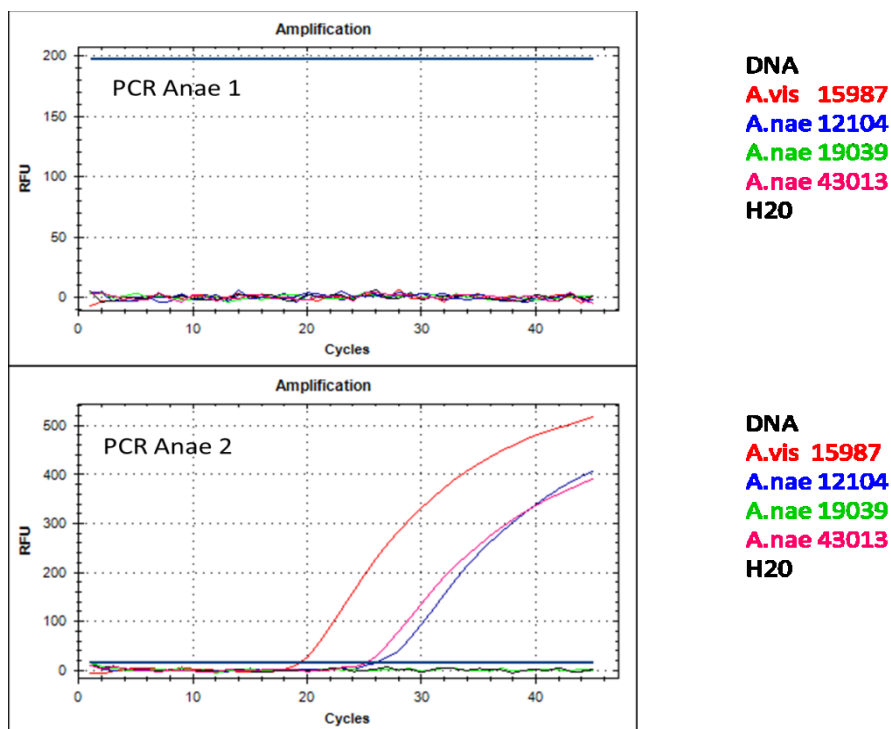
Um eine Quantifizierung der Actinomycetenspezies *A. viscosus* und *A. naeslundii* in Proben aus der menschlichen Mundhöhle vornehmen zu können, wurde in einem ersten Schritt nach für diese Spezies bereits etablierten Realtime-PCRs (qPCRs) in der Literatur gesucht.

In einer Publikation von Suzuki et al. aus dem Jahr 2004, bei der durch subtraktive Hybridisierung speziesspezifische DNA-Abschnitte identifiziert worden waren, wurden speziesspezifische Sequenzen für Forward-(F) und Reverse-(R) Primer sowie einer Sonde (S) zum Nachweis von *A. naeslundii* angegeben, die im Folgenden in der TaqMan-PCR Anae1 (Primer und Sonden Anae F1/R1/S1) getestet wurden (Sequenzen siehe Tabelle 1). Eine Berechnung der Amplikongröße war leider nicht möglich, da keine Angabe der Zielgene vorhanden war und sich auch keine Gene in BLAST-Analysen identifizieren ließen [9].

Eine weitere Publikation von Price et al. aus dem Jahr 2007 gab Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von *A. naeslundii* an, bei der als Zielregion der intergenische Bereich zwischen den 16S und 23S rRNA-Genen (die ISR-Region) angegeben wurde.

Sie wird im Folgenden als TaqMan-PCR Anae2 benannt, mit den Primern Anae F2/R2 und der Sonde Anae S2 [40].

Unter Einsatz von 5 ng genomischer DNA der Actinomyceten-Stämme *A. naeslundii* ATCC 12104 (=DSM 43013), *A. naeslundii* ATCC 19039 und *A. viscosus* ATCC 15987 erwiesen sich die genannten Primer und Sonden jedoch als nicht speziesspezifisch in der Anae2-PCR oder erkannten die zu identifizierende DNA nicht (Anae1-PCR) (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Testung der TaqMan-PCRs Anae1 und Anae2**

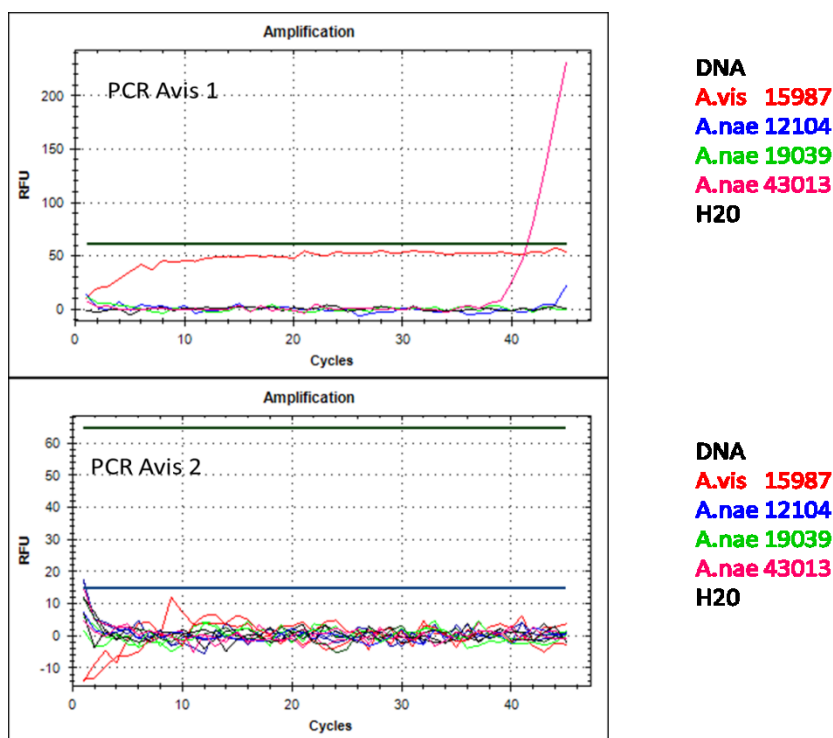
Genomische DNA der *A. naeslundii*-Stämme ATCC 12104 (blau)= DSM 43013 (pink) und ATCC 19039 (grün) sowie des *A. viscosus*-Stammes ATCC 15987 (rot) wurde in die TaqMan PCRs Anae1 und Anae2 eingesetzt. Es wurde jeweils 5ng genomische DNA verwendet. Eine Wasserprobe wurde als Negativkontrolle mitgeführt (schwarz).

Wie in Abbildung 3 zu sehen, zeigte sich beim Einsatz der genomischen DNA der *A. naeslundii*-Stämme, dass die Anae1-TaqMan PCR nicht in der Lage war, auch nur eine der *A. naeslundii*-DNAs zu detektieren. Unter Verwendung der TaqMan-PCR Anae2 wurden die *A. naeslundii*-Proben von ATCC 12104/ DSM 43013 zwar detektiert, die DNA von *A. naeslundii* 19039 jedoch nicht. Die DNA von *A. viscosus* ATCC 15987 wurde rund 100fach besser amplifiziert (7 Zyklen mit jeweiliger Verdopplung des amplifizierten Bereiches =  $7^2 = 128X$ ), sodass aufgrund der fehlenden Spezifität und Sensitivität auf die weitere Verwendung dieser Primer- und Sondenpaare zum Nachweis von *A. naeslundii* verzichtet wurde.



Für den Nachweis von *A. viscosus* wurden im Rahmen dieser Arbeit Primer und Sonden unter Verwendung des ABI-Programms Primer Express konfiguriert und getestet. Die Nukleotidabfolgen der als speziesspezifisch ausgewählten Gen-Regionen von *A. viscosus* wurden in einem Alignment mit den entsprechenden Genregionen anderer Bakterien dargestellt (Abb. 5). Es wurde eine Region des 16S-rRNA Gens als Amplifikationsmatrize analysiert. Die entworfenen Forward- und Reverse-Primer und die Sonde bekamen die Namen Avis F1/R1/S1 und wurden als TaqMan-PCR Avis1 im Vergleich zu der bei Suzuki et al. publizierten TaqMan-PCR (Avis2) [9] getestet (Sequenzen siehe Tabelle 1). Auch dort gab es, wie schon für die von Suzuki angegebene Anae 1-PCR, keine Angabe des Zielgens und es ließ sich kein Gen mittels BLAST-Analysen identifizieren.

Unter Einsatz von 5 ng genomischer DNA der Actinomyceten-Stämme *A. naeslundii* ATCC 12104 (= *A. naeslundii* DSM 43013), *A. naeslundii* ATCC 19039 und *A. viscosus* ATCC 15987, erwiesen sich die genannten Primer und Sonden jedoch als nicht speziesspezifisch (Avis1-PCR) oder erkannten die zu identifizierende DNA nicht (Avis2-PCR) (Abb. 4).



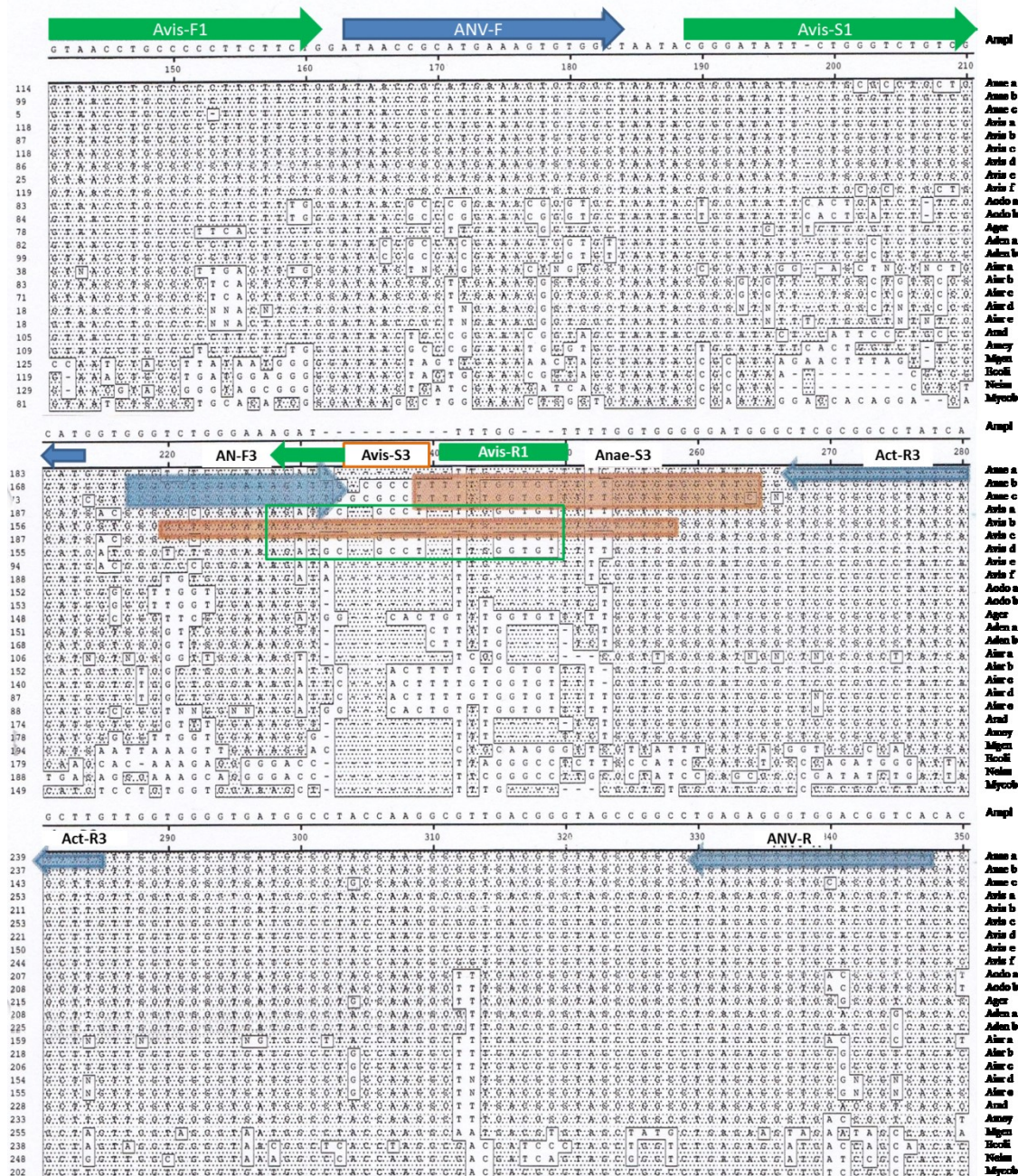
**Abb. 4: Test der TaqMan PCRs Avis 1 und Avis 2**

Genomische DNA der *A. naeslundii*-Stämme ATCC 12104 (blau) = DSM 43013 (pink) und ATCC 19039 (grün), sowie des *A. viscosus*-Stammes ATCC 15987 (rot) wurde in die TaqMan PCRs Avis 1 und Avis 2 eingesetzt. Es wurden 5 ng genomische DNA verwendet. Eine Wasserprobe wurde als Negativkontrolle mitgeführt (schwarz).

Wie in Abb. 4 deutlich wird, waren beide TaqMan PCRs Avis1 und Avis2 nicht geeignet, um die eingesetzte *A. viscosus*-DNA zu amplifizieren; es zeigte sich jedoch eine schwache Kreuzreaktivität der *A. naeslundii*-DNA (Stamm DSM 43013) in der Avis1-PCR (s.a. Kap. 5.4.1).

## **4.2 Die neu designte Anae3-Taqman PCR eignet sich zum speziesspezifischen Nachweis von *A.naeslundii***

Nachdem aus der Literaturlage keine Primer und Sonden für den speziesspezifischen Nachweis von *A. naeslundii* und *A. viscosus* zu entnehmen waren, wurden nun unter Verwendung des Softwareprogramms Primer Express 2 weitere TaqMan-PCRs für den Nachweis dieser beiden Spezies designt. Nach ausgiebigen BLAST-Analysen zur Auffindung speziesspezifischer Genregionen in der 16S rDNA zeigten sich die Forward Primer ANVF und ANF3, die Reverse Primer ActR3 und ANVR sowie die beiden Sonden Anae S3 und Avis S3 *in silico* geeignet, um die beiden Actinomyceten-Spezies zu detektieren (siehe Abb. 5). Die gewählten Sequenzen wurden mittels BLAST-Analyse zur Auffindung homologer Sequenzen in Datenbanken benutzt und anschließend alle Sequenzen in einem Alignment dargestellt, in dem die Nukleotidabfolge der Ziel-Genregion der verschiedenen Bakterienspezies vergleichend betrachtet werden konnten. Wie das Alignment in Abb. 5 verdeutlicht, sollten die Primer **ANVF** und **ANVR** sowohl die 16S rDNA von *A. naeslundii* als auch *A. viscosus* detektieren, **ANF3** spezifisch für *A. naeslundii* sein und ActR3 genus-spezifisch an die 16S rDNA aller Actinomyceten binden (Sequenzen siehe Tabelle 1).

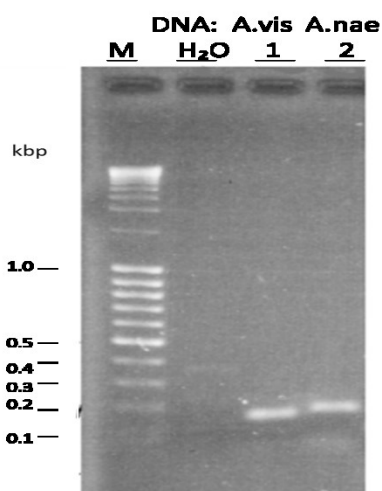


**Abb. 5: Position der neu konfigurierten Primer- und Sondenbindungsstellen im 16S rDNA-Bereich verschiedener Actinomyceten.**

Graue Bereiche: übereinstimmende Nukleotide/ weiße Kästen: Punktmutationen. Rechts: getestete Bakterienstämme (Accession Nummern in Klammern): Anae=*A. naeslundii* (a=AJ635359, b=AB062278, c=M33911), Avis=*A. viscosus* (a=AF543286, b=X82453, c=AF543286, d=FJ823139, e=GU561308, f=AB621359), Aodo=*A. odontolyticus* (a=AJ234040, b=X80504), Ager=*A. gerencseriae* (X80414), Aden=*A. denticolens* (a=X80412, b=DQ985457), Aisr=*A. israelii* (a=X53228, b=AF479270, c=X82450, d=M33912, e=M33913), Arad=*A. radingae* (AJ251986), Amey=*A. meyeri* (X82451), Mgen=*Mycoplasmag genitalium* (16S), Ecol= *E. coli* (X80725), Neiss=*Neisseria gonorrhoeae* (X07714), Mycob=*Mycobacterium gordonae* (X52923). Positionen der Primer (blau) und Sonden (orange) sind markiert (Liste der aligneten Sequenzen in Tabelle 1).

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich wird, weisen die für *A. viscosus* und *A. naeslundii* spezifischen Primer eine konservierte Nukleotidabfolge auf, die für die anderen Spezies deutlich divergent ist. Die Primer ANVF und ANVR, die für die beiden Actinomyceten *A. naeslundii* und *A. viscosus* gleichermaßen spezifisch sein sollten, zeigten in allen *in silico* untersuchten *A. naeslundii*- und *A. viscosus*-Stämmen dieselben Nukleotidabfolgen, die sich jedoch so in keiner der anderen getesteten Bakterienstämme zeigte. Der Primer Act-R3 konnte in einer Region positioniert werden, die in allen Actinomyceten konserviert ist, zu den entsprechenden Regionen von *E. coli* oder Mycoplasmen aber divergent ist. Bei den Sonden Avis S3 und Anae S3 und dem Primer ANF3 hingegen wurde über einen Datenbank-gestützten Homologievergleich mittels BLAST-Analyse sichergestellt, dass die gewählte Region der 16S rDNA nur mit der Sequenz der jeweiligen Spezies, nämlich *A. viscosus* oder *A. naeslundii*, übereinstimmte.

Aus diesen *in silico* Analysen ließ sich schlussfolgern, dass diese Primer und Sonden speziesspezifisch sein sollten, was im weiteren Verlauf der experimentellen Arbeiten durch Einsatz der verschiedenen Spezies-DNAs in die entsprechenden TaqMan-PCRs zu überprüfen war. So wurden die Primer ANVF/ANVR in einer konventionellen PCR eingesetzt, die an DNA von *A. naeslundii* (ATCC 12104) und *A. viscosus* (ATCC 15987) jeweils zur Generierung eines 183 bp großen Amplikons führen sollten. Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch analysiert (siehe Abbildung 6).

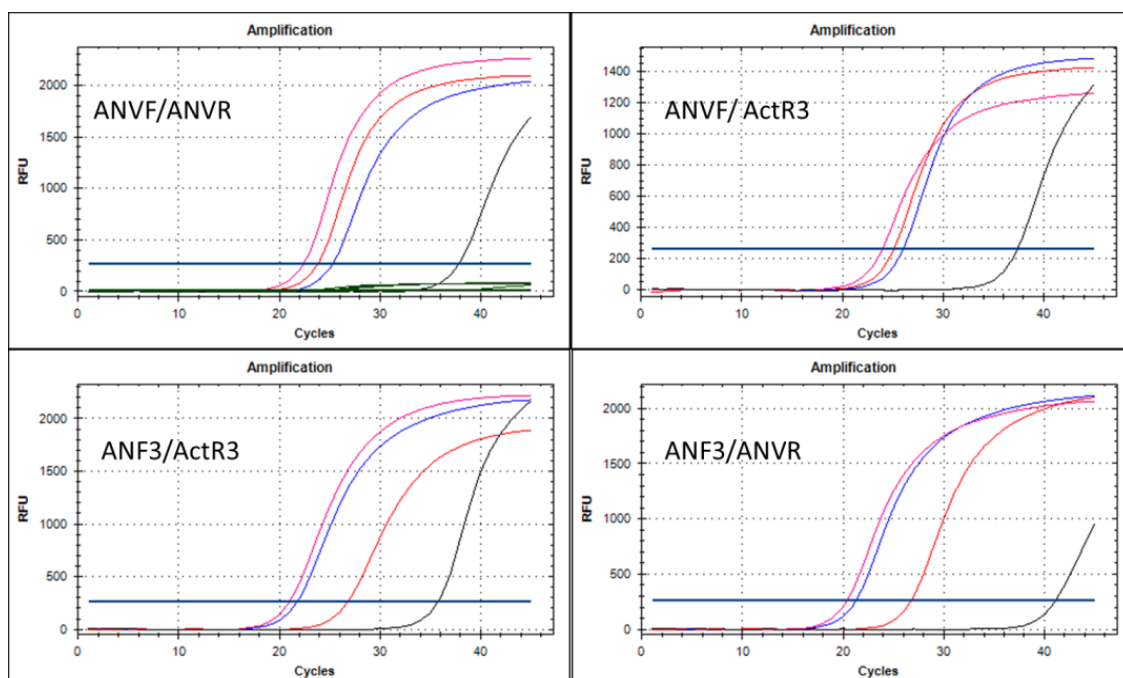


**Abb. 6: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte einer konventionellen PCR mit dem Primerpaar ANVF/ANVR.**

Genomische DNA von *A. viscosus* (ATCC 15987; Spur 1) und *A. naeslundii* (ATCC 12104; Spur 2) wurde in einer konventionellen PCR mit dem Primerpaar ANVF/ANVR eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine Wasserprobe (H<sub>2</sub>O) mitgeführt. Als Längenstandard (M) wurde der Marker „Massruler DNA Ladder Mix“ verwendet, dessen Bandengrößen links in kbp angegeben sind. Es wurde 2,5%iges Agarosegel verwendet.

Wie in Abbildung 6, Spur 1 und 2 zu sehen ist, wurden mit dem Primerpaar ANVF/ANVR erwartungsgemäß sowohl *A. naeslundii*- als auch *A. viscosus*-DNA amplifiziert, da diese Primer in für beide Spezies konservierten Bereichen positioniert worden waren. Es entstanden PCR-Produkte mit der erwarteten Länge von ca. 180 bp. Die beiden PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt und in den pGemT-Vektor kloniert, um später als Quantifizierungsstandard dienen zu können.

Im folgenden Schritt wurde dieses Primerpaar, ANVF/ANVR neben den weiteren Primerpaarkombinationen ANVF/ActR3, ANF3/ActR3 und ANF3/ANVR, in einer Realtime-PCR unter Verwendung des Fluorophors MESA GREEN getestet. Als DNA-Proben wurden zwei Isolate eines Stammes von *A. naeslundii* (ATCC 12104 =DSM 43013) und ein Stamm von *A. viscosus* (ATCC 15987) eingesetzt. Aufgrund der Sequenzhomologien (siehe Abb.5) war wie bei dem Primerpaar ANVF/ANVR auch bei dem Primerpaar ANVF/ActR3 eine Spezifität für beide Actinomycetenspezies, *A. naeslundii* und *A. viscosus*, zu erwarten. Bei den Primerpaaren ANF3/ActR3 und ANF3/ANVR wurde jedoch nur eine Speziespezifität für *A. naeslundii* erwartet (siehe Abbildung 7).



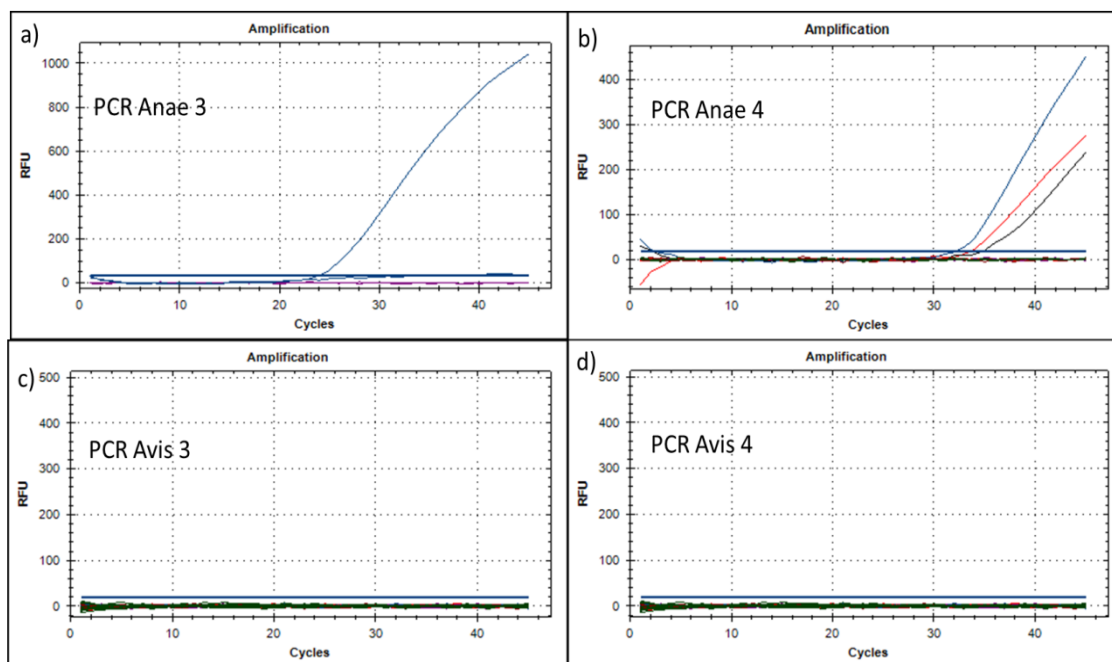
**Abb. 7: Test der Primerpaare ANVF/ANVR, ANVF/ActR3, ANF3/ActR3 und ANF3/ANVR in MESA GREEN-PCRs.**

5 ng der genomischen DNA des *A. naeslundii*-Stammes ATCC 12104 (blau) = DSM 43013 (pink), des *A. viscosus*-Stammes ATCC 15987 (rot), sowie H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle (schwarz) wurden in den PCRs eingesetzt.

Wie in Abbildung 7 erkennbar, wurden durch die beiden Primerpaare ANVF/ANVR und ANVF/ActR3 sowohl *A. naeslundii*- als auch *A. viscosus*-DNA amplifiziert, wie es dem Alignment nach (Abb.5) zu erwarten war. Die CT-Werte zeigten in beiden qPCRs, dass der Nachweis des *A. naeslundii*-Stamms DSM 43013 am ehesten positiv wurde, gefolgt von *A. viscosus* (+1 Zyklus) und *A. naeslundii* (ATCC 12104) (+1-2 Zyklen), was sich durch geringe Konzentrationsunterschiede der genomischen DNAs erklären ließ.

Es bestätigte sich anhand der kleineren CT-Werte, dass die Primerpaare ANF3/ActR3 und ANF3/ANVR, die für den speziesspezifischen Nachweis von *A. naeslundii* entwickelt wurden, die beiden *A. naeslundii*-DNAs effizienter amplifizierten als die Primerpaare ANVF/ANVR und ANVF/ActR3, jedoch zeigte sich in beiden Reaktionen auch eine Amplifikation der *A. viscosus*-DNA, die 5-6 Zyklen später positiv wurde. Dies entsprach einer Kreuzreaktivität von ca. 1%. Die Negativkontrolle wurde in allen qPCR-Ansätzen erst deutlich nach dem 30. Zyklus positiv, was sich durch die Detektion von Primerdimeren in der sondenfreien Reaktion erklären ließ. Da alle bisherigen Ergebnisse ohne den Einsatz einer Sonde erzielt wurden, sollte in sondenbasierenden TaqMan PCR getestet werden, ob man durch eine von zwei neu designten Sonden, Anae S3 und Avis S3, eine Speziesspezifität für *A. naeslundii* und *A. viscosus* erreichen konnte.

Hierzu wurde die *A. naeslundii*-spezifische Sonde Anae S3 in PCRs mit den Primerpaaren ANF3/ANVR (TaqMan-PCR Anae 3) und ANVF/ActR3 (TaqMan-PCR Anae 4) eingesetzt. Die *A. viscosus*-spezifische Sonde Avis S3 wurde mit den Primern ANVF/ActR3 (TaqMan-PCR Avis 3) und ANVF/ANVR (TaqMan-PCR Avis 4) verwendet. Es wurde in allen TaqMan-PCRs jeweils DNA der Stämme *A. naeslundii* ATCC 12104 und *A. viscosus* ATCC 15987 getestet (siehe Abb.8).

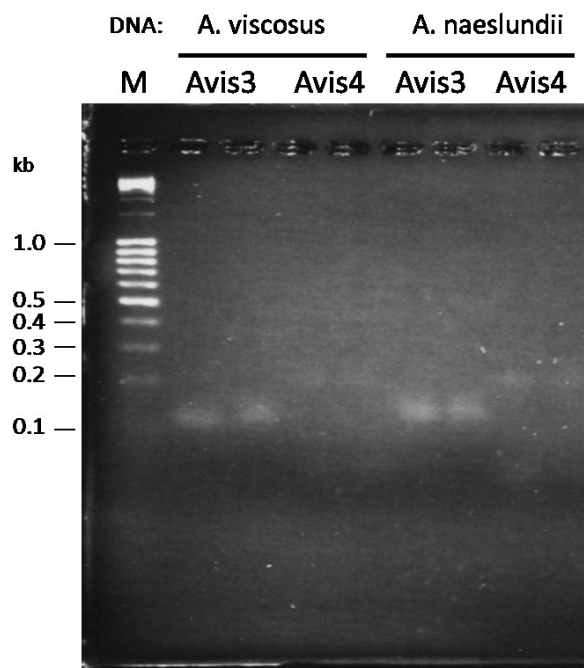


**Abb. 8: Test der TaqMan PCRs Anae 3 (a) und Anae 4 (b), sowie Avis 3 (c) und Avis 4 (d)**

5 ng der genomischen DNA des *A. naeslundii*-Stammes ATCC 12104 (blau) und des *A. viscosus*-Stammes ATCC 15987 (rot) wurden in den verschiedenen TaqMan PCRs amplifiziert. Eine Wasserprobe wurde als Negativkontrolle mitgeführt (schwarz).

Wie in Abb. 8.a) deutlich an dem niedrigen CT-Wert zu sehen ist, zeigte die TaqMan-PCR Anae 3 das beste Ergebnis zum Nachweis von *A. naeslundii*. Durch den Einsatz der Sonde wurde einzig die eingesetzte *A. naeslundii*-DNA erkannt. Es trat keine Kreuzreaktivität mit *A. viscosus*-DNA auf. Im weiteren Verlauf wurde diese TaqMan-PCR zum Nachweis von *A. naeslundii* verwendet.

Die Abbildung 8.b) verdeutlicht, dass die Anae 4-PCR nicht für den speziesspezifischen Nachweis von *A. naeslundii* geeignet war. Hier wurde die gleiche Menge an *A. naeslundii*-DNA erst um den 30. Zyklus positiv amplifiziert und es zeigte sich zudem eine Kreuzreaktivität mit *A. viscosus*-DNA, die nur ca. zwei Zyklen später positiv wurde. Beim Einsatz der Sonde Avis S3 in den PCRs Avis 3 und Avis 4 entstand in beiden TaqMan PCRs kein Fluoreszenzsignal (Abb. 8.c) und 8.d)). Zur Kontrolle, ob ein PCR-Produkt entstanden war und nur die Sonde nicht binden konnte, wurde der PCR-Ansatz des Realtime-Laufes auf ein Gel aufgetragen (siehe Abbildung 9).



**Abb. 9: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus den TaqMan-PCRs Avis 3 und Avis 4.**

Die PCR-Produkte aus den TaqMan-PCRs Avis 3 und Avis 4, jeweils mit den DNAs von *A. viscosus* ATCC 15987 und *A. naeslundii* DSM 12104, wurden auf einem 2,5% Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Längenstandard (M): Massruher DNA Ladder Mix.

Auf dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel zeigte sich, dass in allen PCRs ein PCR-Produkt entstanden war. Durch das Primerpaar ANVF/ActR3 war wie zu erwarten ein 120 bp Amplikon, durch das Primerpaar ANVF/ANVR ein 180 bp Amplikon generiert worden. Da in keiner der beiden TaqMan-PCRs Avis 3 und Avis 4 jedoch eine Fluoreszenzfreisetzung bei Einsatz der *A. viscosus*-DNA gemessen wurde, war zu folgern, dass die eingesetzte Sonde Avis S3 nicht an das *A. viscosus*-PCR-Produkt binden konnte und damit nicht geeignet für den Nachweis des von uns gewählten *A. viscosus*-Stammes war (s.a. Kap. 5.4.1). Es wurde deshalb nach neuen Genen für den speziesspezifischen Nachweis von *A. viscosus* gesucht.

Da der Primer ANF3 auch in dem durch die Primer ANVF/ANVR flankierten Bereich bindet (s. Abb. 5), konnten die ANVF/ANVR-Amplikon-tragenden Plasmide auch für die Quantifizierung der Anae 3-PCR Produkte genutzt werden.



### 4.3 Das F1A-Gen und das *nanH*-Gen erscheinen für den speziesspezifischen Nachweis von *A. viscosus* geeignet

Für den speziesspezifischen Nachweis von *A. viscosus* waren die bisher getesteten Primer und Sonden nicht geeignet, sodass nach neuen Genen, die speziesspezifische Bereiche für den Nachweis von *A. viscosus* besitzen, gesucht wurde. Dies wurde dadurch erschwert, dass das Genom von *A. viscosus* noch nicht sequenziert worden war und insgesamt nur wenige Sequenzeinträge über weitere Gene von *A. viscosus* in Datenbanken enthalten waren.

Die Auswahl fiel auf zwei Gene im Genom von *A. viscosus*: das F1A-Gen, das für die F1 alpha-Untereinheit der bakteriellen ATP-Synthase kodiert, und das *nanH*-Gen, das für das Enzym Sialidase oder auch Neuraminidase kodiert (Sequenzen der designten Primer und Sonden siehe Tabelle 1). Unter Verwendung des Softwareprogramms Primer Express wurden neue TaqMan PCRs designt, die nach BLAST-Analysen der vorgeschlagenen Primer und Sonden gegen die Sequenzen der ncbi-Datenbank (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) als speziesspezifisch anzusehen waren. Es wurden für beide Gene Alignments erstellt, in denen die Genregion der Primer- und Sondenbindungsstellen mit der Sequenz verwandter (homologer) anderer Bakterien verglichen wurde (siehe Abbildungen 10 und 11).

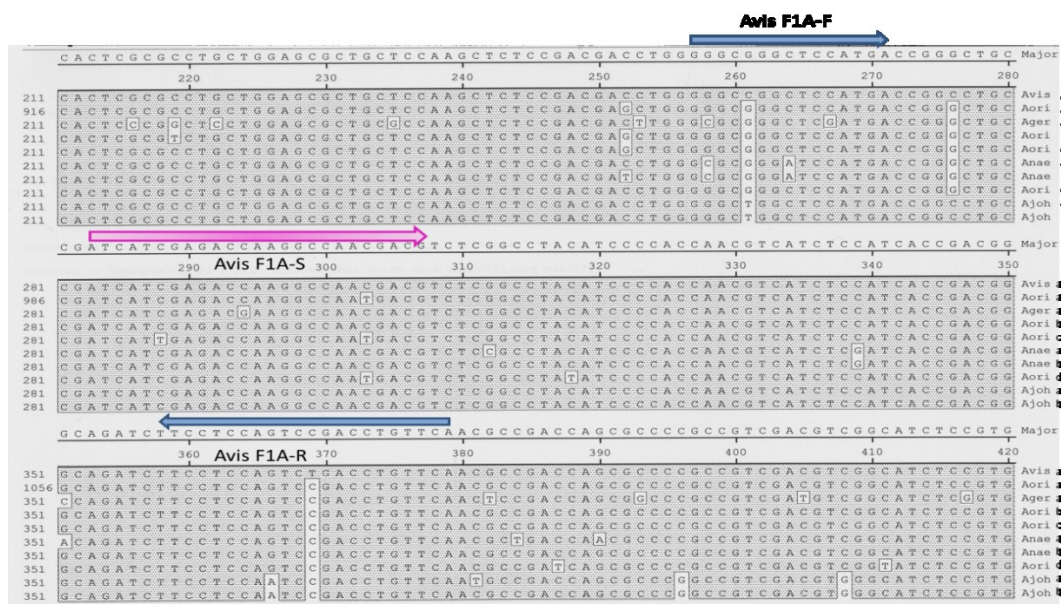
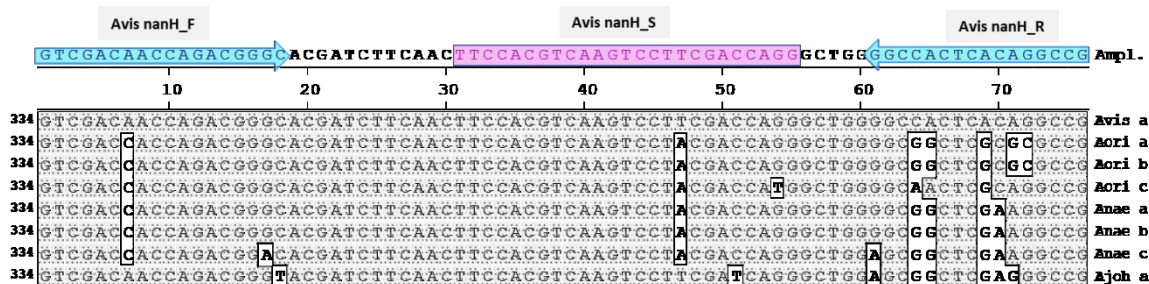


Abb. 10: Alignment der Primer- und Sondensequenzen Avis (F1A).

Graue Bereiche: übereinstimmende Nukleotide/ weiße Kästen: Punktmutationen zur Consensussequenz. Rechts: getestete Bakterienstämme mit Accession-Nummer in Klammern: Avis a= *A. viscosus* (eu620893) / Aori = *A. oris* (a=ab573870, b=eu620894, c=eu620892, d=eu620887)/ Ager a= *A. gerencseriae* (eu647585)/ Ajoh= *A. johnsonii* (a=eu620891, b=eu620885), Anae= *A. naeslundii* (a=eu620890, b=eu620889), Ampl=Amplikon. Die gewählten Primer (blau) und die Sonde (rosa) sind markiert.

Wie in Abbildung 10 erkennbar ist, wurden die F1A-Sequenzbereiche, die mittels der neuen Primer und der Sonde erkannt werden sollten, mit den entsprechenden Bereichen anderer Bakterien verglichen, die in einer BLAST-Recherche die höchste Homologie im Amplifikationsbereich aufwiesen, darunter die Actinomycetenspezies *A. naeslundii*, *A. oris*, *A. gerencseriae* und *A. johnsonii*. Man erkennt, dass der Reverse Primer AvisF1A\_R nur mit der *A. viscosus*-Sequenz zu 100% übereinstimmt, zu den Sequenzen der anderen Spezies jedoch divergent ist, sodass zu diesem Zeitpunkt dieser Primer als speziesspezifisch anzusehen war. Auch beim Forward Primer AvisF1A\_F zeigt sich nur bei *A. viscosus* eine 100% Übereinstimmung der Sequenz. Die Sondensequenz erwies sich als nicht spezifisch für *A. viscosus*, da auch *A. oris*, *A. johnsonii* und *A. naeslundii*-Stämme diese Sequenz aufwiesen. Da die flankierenden Primersequenzen jedoch nur bei *A. viscosus* vorkamen, war davon auszugehen, dass nur *A. viscosus*-spezifische Amplikons entstehen, die mit der Sonde detektiert werden können.

Das zweite ausgewählte Gen, *nanH*, für das mehrere *A. viscosus*- als auch Actinomyceten-Sequenzen in Datenbanken zu finden waren, zeigte *A. viscosus*-spezifische Bereiche, die auch mittels des Softwareprogrammes Primer Express für die Positionierung von TaqMan-tauglichen Primern und Sonden zu verwenden waren (siehe Abbildung 11).



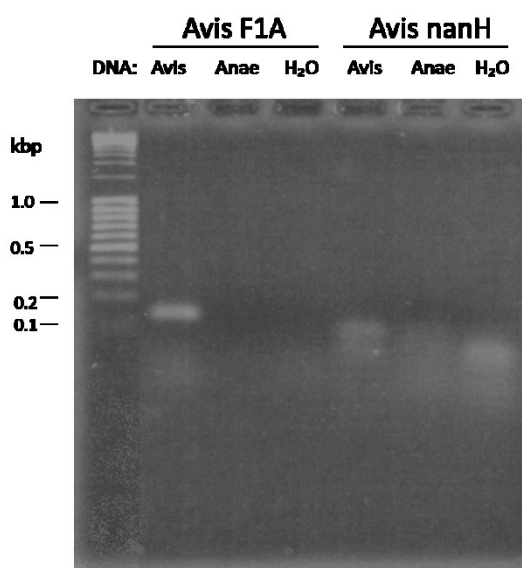
**Abb. 11: Alignment der Primer- und Sondensequenzen von Avis (*nanH*) verschiedener Actinomyceten.**

Graue Bereiche: übereinstimmende Nukleotide/ weiße Kästen: Punktmutationen zur Consensussequenz. Rechts: getestete Bakterienstämme mit Accession-Nummer in Klammern: Avis a=*A. viscosus* (eu805603)/ Aori= *A. oris* (a=eu805702, b=eu805701, c=eu805692)/ Anae= *A. naeslundii* (a=eu805632, b=eu805631, c=eu805601)/ Ajoh a= *A. johnsonii* (eu805600), Ampl=Amplikon. Die gewählten Primer (blau) und die Sonde (rosa) sind markiert.

Wie Abbildung 11 verdeutlicht, konnten Primer und Sonde in einem 76 bp Bereich des *A. viscosus-nanH*-Gens positioniert werden, der Mutationen im Gen der anderen Actinomyceten aufwies, darunter *A. oris*, *A. naeslundii* und *A. johnsonii*. Vor allem beim Reverse Primer zeigte sich eine starke Abweichung der Sequenz von *A. viscosus* zu den anderen Spezies. Forward Primer und Sonde wiesen auch mindestens eine Punktmutation zu der *A. viscosus*-spezifischen

Sequenz auf, sodass davon auszugehen war, dass durch diese Primer/Sondenkombination keine andere Spezies außer *A. viscosus* detektiert werden kann. Aufgrund des Vergleichs beider Alignments war anzunehmen, dass im Gegensatz zur F1A-qPCR die *nanH*-qPCR die speziesspezifischere sein würde, da sie sich sowohl in den Primerbindungsstellen, als auch in der Sondensequenz deutlicher von den anderen Actinomycetenspezies unterschied. Um diese Annahme zu be- oder entkräften, wurden beide qPCRs vergleichend getestet.

In einer konventionellen PCR wurden zunächst die neuen Primerpaare ohne Sonde unter Einsatz von *A. viscosus*- und *A. naeslundii*-DNA getestet. Es wurden Bandengrößen von 123 bp bei der F1A-PCR und 76 bp bei der *nanH*-PCR erwartet (siehe Abbildung 12).

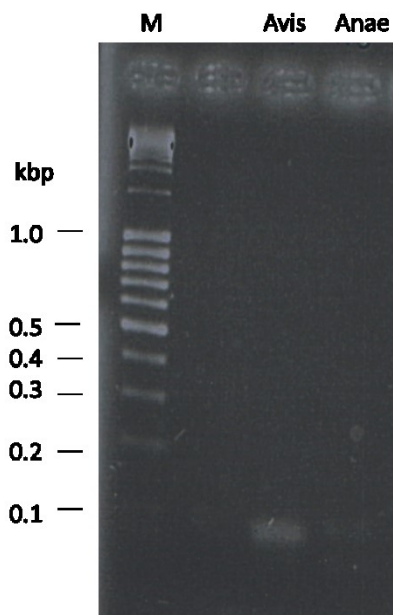


**Abb. 12: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der konventionellen PCR mit den Primern Avis F1A F/R und Avis nanH F/R.**

Genomische DNA von *A. viscosus* (ATCC 15987) und *A. naeslundii* (ATCC 12104) wurde eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden Wasserproben ( $H_2O$ ) mitgeführt. Als Längenstandard (M) wurde der Marker „Massruler DNA Ladder Mix“ verwendet, dessen Markerbandengrößen links in kbp angegeben sind. Es wurde 2,5%iges Agarosegel hergestellt.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, zeigte sich eine spezifische Amplifikation des F1A-Gens von *A. viscosus*, wohingegen keine Amplifikation von *A. naeslundii*-DNA erfolgte. Die auf das Gel aufgetragenen PCR-Produkte zeigten die zu erwartenden Bandengrößen bei Einsatz von *A. viscosus*-DNA (76 bp bei der *nanH*-PCR und 123 bp bei der F1A-PCR). Das Ergebnis für die Avis *nanH*-Primer war nicht eindeutig interpretierbar, da eine schwache Bande ebenfalls bei Einsatz von *A. naeslundii*-DNA zu beobachten war und es augenscheinlich zu einer Verunreinigung der Wasserprobe gekommen war (rechte Spur). Da das PCR-Produkt aufgrund seiner geringen

Größe fast auf der Höhe von Primerdimeren bandierte, war eine Kontamination nicht schlüssig bewiesen. Aus diesem Grund wurden die Produkte aus der *Avis-nanH*-PCR an *A. viscosus*- und *A. naeslundii*-DNA auf einem höherprozentigen Agarosegel aufgetrennt. Es sollte ein 76 bp großes Amplikon bei Einsatz der *A. viscosus*-DNA sichtbar werden (siehe Abbildung 13).



**Abb. 13: Gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts der *Avis nanH* F/R-PCR auf einem 3 % Agarosegel.**

Die Produkte aus der *Avis-nanH*-PCR an *A. viscosus*- (ATCC 15987) und *A. naeslundii*-DNA (ATCC 12104) wurden erneut auf einem Agarosegel aufgetrennt. Es wurde eine Bande bei 76 bp allein in der Spur mit *A. viscosus*-DNA versetzten Probe erwartet. Als Längenstandard (M) wurde der Marker „Massruler DNA Ladder Mix“ verwendet.

Man erkannte nun die Amplifikation der *A. viscosus*-DNA wesentlich besser (Abb. 13, Spur *Avis*). Die Bandengröße lag wie erwartet bei 76 bp. In der Probe mit *A. naeslundii*-DNA war hingegen nahezu kein Produkt erkennbar. So wurden für beide Primerpaare die passenden Sonden bestellt und die beiden PCR-Produkte, die durch Amplifikation von *A. viscosus*-DNA entstanden waren, aufgereinigt und für den späteren Einsatz als Quantifizierungsstandards in pGemT-Vektoren kloniert (siehe Kap. 3.2.1-3).

#### 4.4 Die Avis-Duplex-PCR zeigt eine höhere Sensitivität als die Monoplex-PCR

Da zum Nachweis von *A. viscosus* zwei verschiedene PCRs etabliert worden waren, deren Sonden mit verschiedenen Fluorophoren markiert vorlagen, wurde zuerst getestet, ob die beiden PCRs als Monoplex- oder als Duplex-PCR (mit beiden Primerpaaren und Sonden) bessere Ergebnisse in Form von niedrigeren CT-Werten bei der Amplifikation der Quantifizierungsstandards (= pGemT-klonierte PCR-Produkte) in serieller Verdünnung von  $10^5$  bis  $10^1$  zeigten. Hierzu wurden die CT-Werte der Monoplex- und Duplex-PCRs verglichen. In den Duplex-PCRs wurden zum einen zweimal die halben Konzentrationen von Primern (je 0,15  $\mu\text{M}$ ) und Sonden (je 0,1  $\mu\text{M}$ ) im Mastermix verwendet, zum anderen wurden zweimal die für Monoplex-PCRs gängigen Konzentrationen von Primern (je 0,3  $\mu\text{M}$ ) und Sonden (je 0,2  $\mu\text{M}$ ) vergleichend getestet (siehe Abbildung 14).

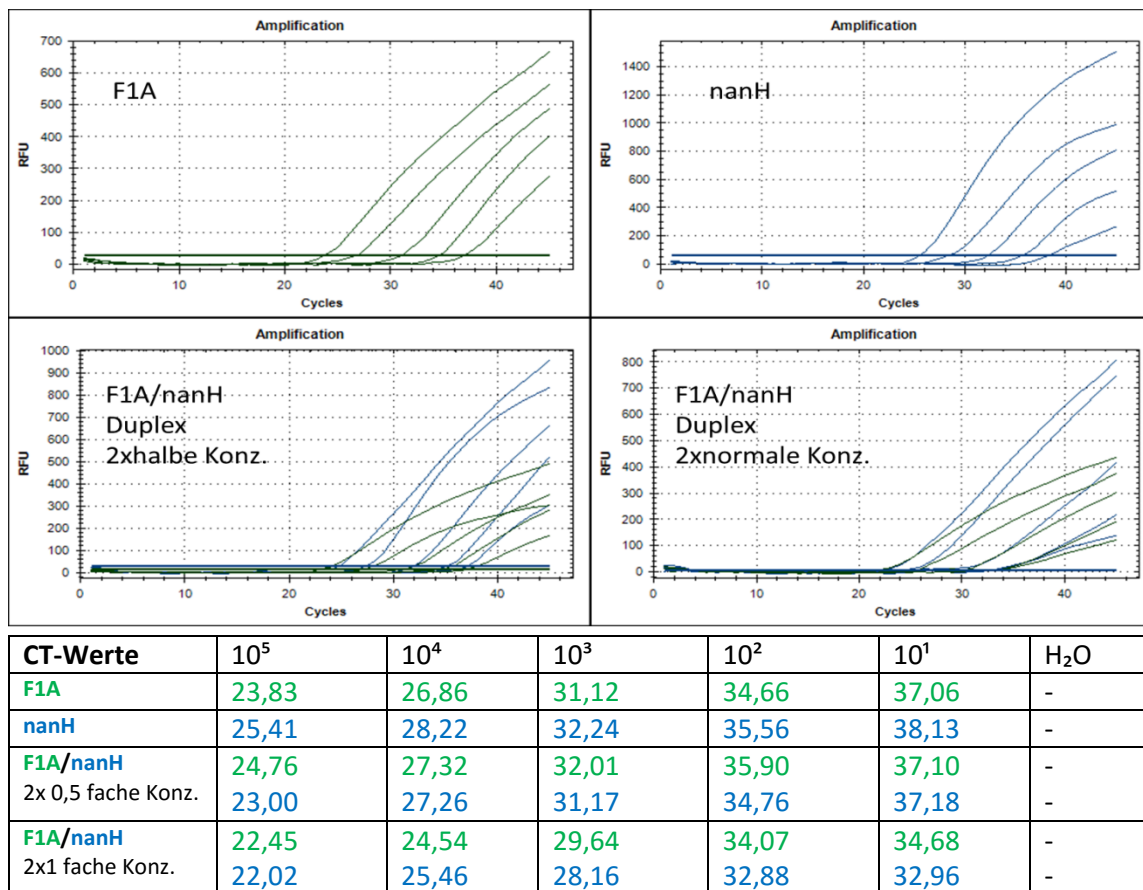


Abb. 14: Vergleich der CT-Werte der Monoplex und Duplex-PCRs von Avis F1A und Avis *nanH*.

Die Amplifikationskurven der beiden Monoplex-PCRs sind in der oberen Reihe dargestellt. Avis F1A ist mit dem Fluorophor HEX markiert (grün), Avis *nanH* mit dem Fluorophor FAM (blau). Die beiden unteren Abbildungen zeigen die Duplex-PCRs von Avis F1A/*nanH* mit halber Konzentration an Primern (je 0,15  $\mu\text{M}$ ) und Sonden (je 0,1  $\mu\text{M}$ ) (links), sowie normaler Konzentration an Primern (je 0,3  $\mu\text{M}$ ) und Sonden (je 0,2  $\mu\text{M}$ ) (rechts). Darunter sind tabellarisch die CT-Werte der amplifizierten Standards in Konzentrationen von  $10^5$ - $10^1$  und eine Wasserprobe als Negativkontrolle dargestellt.

Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, wurden zunächst die CT-Werte der Monoplex-PCRs betrachtet. Es zeigte sich, dass die F1A-PCR im Durchschnitt 1-2 Zyklen eher positiv wurde als die *nanH*-PCR. Bei Betrachtung der Duplex-PCRs im Vergleich zur Monoplex-PCR zeigte sich jedoch, dass sich die CT-Werte in der Avis F1A\_PCR bei halbfach konzentrierten Primern und Sonden minimal erhöhten, die CT-Werte in der Avis *nanH*-PCR sich hingegen um ein bis zwei Zyklen erniedrigten, was einer verbesserten Amplifikation von *A. viscosus* in der halbfach konzentrierten Duplex PCR entsprach.

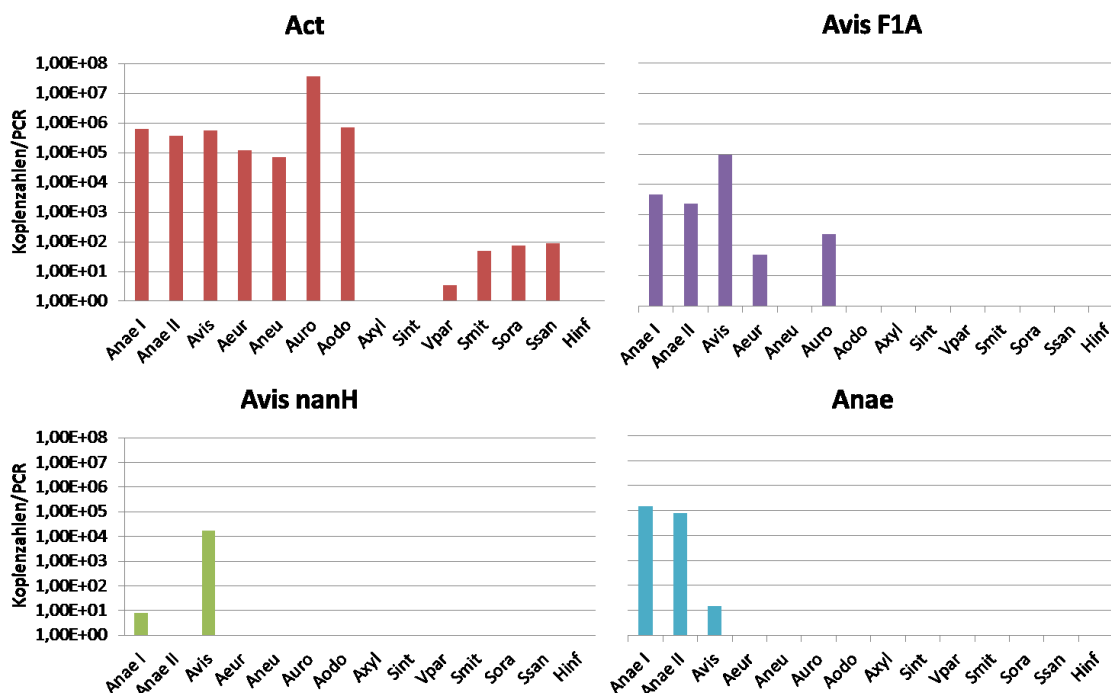
In der einfach konzentrierten Duplex-PCR, in der die gleichen Konzentrationen an beiden Primern und Sonden verwendet wurden wie in der Monoplex-PCR, zeigten sich sowohl bei Avis F1A als auch Avis *nanH* bessere, das heißt niedrigere CT-Werte als bei den Monoplex-PCRs. Die Standards von Avis wurden in der Avis F1A-Reaktion ca. zwei bis drei Zyklen eher positiv, in der Avis *nanH*-Reaktion sogar drei bis vier Zyklen eher. Hieraus ergab sich, dass bei Einsatz der Duplex-PCR für den Nachweis von *A. viscosus* die Konzentration jedes Primers 0,3  $\mu\text{M}$  und die jeder Sonde 0,2  $\mu\text{M}$  betragen sollte.

#### **4.5 Das *nanH*-Gen eignet sich zum speziesspezifischen Nachweis von *A. viscosus* DSM 43327**

Zum Test der Speziesspezifität und Kreuzreaktivität wurden nun neben den bereits verwendeten *A. viscosus*- und *A. naeslundii*-Stämmen auch genomische DNAs von weiteren oralen Bakterien in die TaqMan-PCRs eingesetzt. Hierbei handelte es sich um Streptokokkenspezies (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis* und *S. parasanguinis*), die den dentalen Biofilm ebenfalls frühbesiedeln, als auch weitere in der Mundhöhle, im Hals-Rachen-Bereich oder an Schleimhäuten lebende Bakterienspezies (siehe Tabelle 2 und Abb. 15). Zum besseren Vergleich der Ergebnisse wurden auch in diesem Versuch alle genomischen DNAs auf eine Konzentration von 1 ng/ $\mu\text{l}$  eingestellt.

Um eine Aussage über die Gesamt-Actinomycetenkeimlast zu erhalten, wurde neben den neu etablierten PCRs, die spezifisch für *A. naeslundii* und *A. viscosus* sein sollten, auch eine weitere, bereits bestehende PCR für den Nachweis der Gattung *Actinomyces* spp. mitgeführt [45] (Sequenzen siehe Tabelle 1), die durch die simultane Amplifikation der klonierten PCR-Produkte in den bekannten Konzentrationen  $10^5$ ,  $10^3$  und  $10^2$  quantifiziert werden konnte. Diese TaqMan-PCR wurde im Folgenden als Act-PCR bezeichnet.

Die drei PCRs wurden nun unter Verwendung der oben genannten DNAs auf Spezifität und Kreuzreaktivität getestet (siehe Abbildung 15).



**Abb. 15: Test der Speziespezifität der neu entwickelten TaqMan PCRs für *A. naeslundii* (Anae) und für *A. viscosus* (Avis F1A und Avis nanH), sowie der Gattungsspezifischen Actinomyceten-PCR (Act).**

Es wurden genomische DNAs, jeweils 5 ng/PCR, der folgenden Spezies eingesetzt (Abkürzungen siehe Tabelle 2): Anae (Stämme Anae I= ATCC 19039, Anae II= ATCC 12104), Avis, Aeur, Aneu, Auro, Aodo, Axl, Sint, Vpar, Smit, Sora, Ssan und Hinf.

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, wurden die Kopienzahlen der eingesetzten genomischen DNAs in den PCR-Läufen mittels simultaner Amplifikation der jeweiligen Quantifizierungsstandards ermittelt. In der Gattungsspezifischen Act-PCR wurden alle verwendeten Actinomyceten-DNAs erkannt, sodass sichergestellt war, dass es sich bei den gewählten DNAs wirklich um Actinomyceten-DNAs handelte. Die DNAs von anderen oralen Bakterien, die nicht zu den Actinomyceten zählten, wurden, bis auf die Streptokokken-Spezies *S. oralis*, *S. mitis* und *S. sanguinis*, sowie *Veillonella parvula*, wie gewünscht nicht in der Act-PCR amplifiziert. Allerdings wurden von den Streptokokken nur rund 200 Kopien und von *Veillonella parvula* nur circa 5 Kopien falsch positiv nachgewiesen, was einer Kreuzreaktivität oder Kontamination der DNA-Proben von weniger als 0,1% entsprach.

In der Anae-PCR wurden, wie zu erwarten, die *A. naeslundii*-DNAs am besten detektiert. Eine leichte Kreuzreaktivität zeigte sich mit der *A. viscosus*-DNA, die allerdings unter 0,01% lag und

somit vernachlässigbar war. In den weiteren PCR-Läufen trat keine Kreuzreaktivität mehr auf, so dass eher von einer Kontamination der DNA-Probe auszugehen war.

In der F1A-PCR zeigte sich, dass die *A. viscosus*-DNA am besten erkannt wurde. Jedoch bestand eine Kreuzreaktivität mit allen drei *A. naeslundii*-DNAs, die circa 1 bis 2 Zehnerpotenzen später erkannt wurden, der *A. urogenitalis*-DNA (2-3 Zehnerpotenzen später) und der *A. europaeus*-DNA (3-4 Zehnerpotenzen später). Die *nanH*-PCR zeigte im Vergleich das deutlich bessere Ergebnis zum speziesspezifischen Nachweis von *A. viscosus*. Die *A. viscosus*-DNA wurde erkannt, lediglich eine leichte Kreuzreaktivität mit einem der drei *A. naeslundii*-Stämme war ersichtlich (<0.1%). Da sich dies in späteren PCR-Läufen ebenfalls nicht mehr zeigte, war hier keine Kreuzreaktivität, sondern eine Kontamination mit *A. naeslundii*-Fremd-DNA als Ursache für den *A. naeslundii*-Nachweis in der *Avis-nanH* PCR wahrscheinlicher.

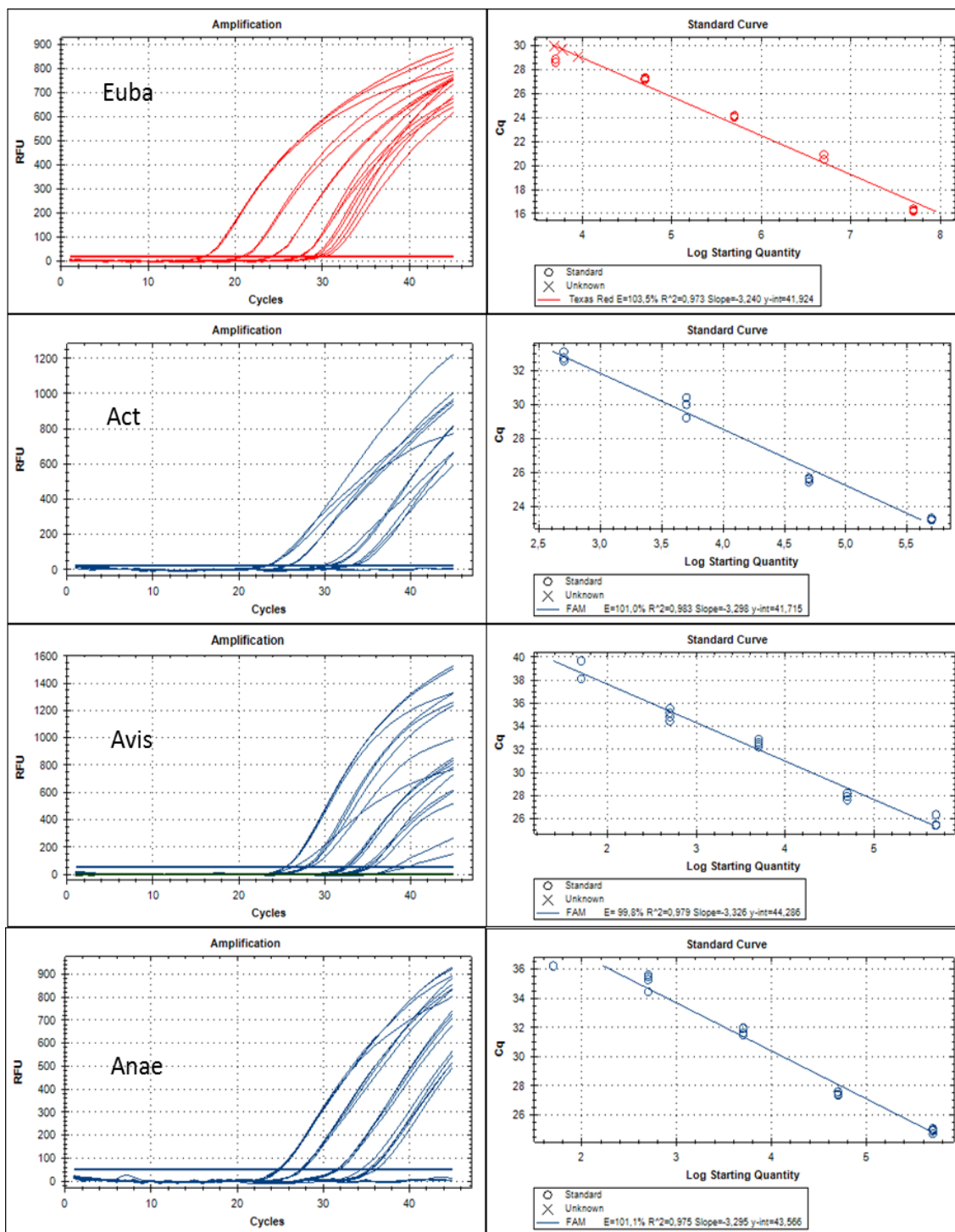
Aufgrund der vermutet höheren Kreuzreaktivität der *Avis* F1A-PCR wurde in den weiteren Versuchen nur noch die *Avis nanH*-PCR zum speziesspezifischen Nachweis von *A. viscosus* verwendet.

## 4.6 Linearität

Um eine spätere Quantifizierung mittels TaqMan-PCRs durchführen zu können, wurde zuerst die Linearität der TaqMan PCRs ermittelt. Hierzu wurden seriell verdünnte, in ihrer Konzentration bekannte Quantifizierungsstandards, die aus den jeweiligen Insert-tragenden Plasmiden bestanden (s. Kap. 3.2.6), in die TaqMan-PCRs eingesetzt (siehe Abbildung 16). Die relative Fluoreszenzänderung musste über vier Verdünnungsstufen linear verlaufen, damit man später in den qPCR-Läufen mit simultaner Amplifikation drei verschiedenkonzentrierter Quantifizierungsstandards die Konzentration unbekannter Proben sicher ermitteln konnte. Dabei sollten die Standards möglichst die Werte der unbekannt Probe einrahmen.

Um in den späteren Proben auch einen Anhaltspunkt über die Gesamtkeimlast aller Prokaryonten zu erhalten, wurde im Folgenden die bereits etablierte und im Institut entwickelte Eubakterien-PCR (Euba) mitgeführt (Sequenzen siehe Tabelle 1).





**Abb. 16: Linearität der TaqMan-PCRs Euba, Act, Avis und Anae.**

Die Quantifizierungsstandards wurden in Konzentrationen  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  und  $10^1$  Kopien /  $\mu\text{l}$  in die vier TaqMan-PCRs Euba, Act, Avis und Anae eingesetzt. Die rechten Abbildungen zeigen jeweils die resultierenden Standard-Ausgleichsgeraden mit den Werten für Effizienz E (zwischen 99,8 und 103,5%) und Bestimmtheit  $R^2$  (zwischen 0,973 und 0,983). Die linken Abbildungen zeigen die Amplifikationskurven in Vierfachbestimmung.

Wie in Abbildung 16 ersichtlich, wurden die Quantifizierungsstandards in Quantitäten von  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  und  $5 \times 10^1$  Kopien in den verschiedenen PCRs zur Ermittlung der Linearität in Vierfachbestimmungen amplifiziert. Die Effizienz E lag zwischen 99,8 % (Avis-PCR) und 103,5 % (in der Euba-PCR) und die Bestimmtheit  $R^2$  zwischen 0,973 (Euba-PCR) und 0,983 (in der Act-PCR), also nahe an den erwarteten und anzustrebenden Werten von  $E=100\%$  und  $R^2=0,999$ , da TaqMan PCRs allgemein als gut eingestuft wurden, wenn E mehr als 90% aufwies, und  $R^2 > 0,980$  [50].

Insgesamt war somit die Euba-PCR als weniger gut anzusehen, was mit darin begründet war, dass residuale Mengen an Fremd-DNA in den Mastermixen zu einem Hintergrund von 10-100 Kopien/PCR führten. Sie wurde aber weiterhin mitgeführt, da die Bakterienlast der Proben meist deutlich höher lag als 100 Kopien und deshalb zur groben Bestimmung der Gesamtkeimlast herangezogen werden konnte. Die neu etablierten TaqMan-PCRs zeigten nahezu die anzustrebenden Werte. Um die Qualität jedes PCR-Laufes sicherzustellen, wurden der E- und  $R^2$ -Wert für jede PCR bei jedem PCR-Lauf neu berechnet. Hierbei zeigte sich, dass sich bei längerer Verwendung der gleichen Standardprobe mit der Zeit eine Verschlechterung der Linearität zeigte (siehe auch Kap. 4.7).

#### **4.7 Die Qualität der Standards wird durch die Lagerungsbedingungen beeinflusst**

Die zur Quantifizierung hergestellten Standards in Konzentrationen zwischen  $10^7$  Kopien/ $\mu\text{l}$  und  $10^1$  Kopien/ $\mu\text{l}$  wurden anfänglich bis zur weiteren Verwendung bei  $+4^\circ\text{C}$  gelagert. Es konnte hierbei jedoch beobachtet werden, dass zum einen mit der Zeit die Effizienz und Bestimmtheit schlechter wurden und zum anderen auch die CT-Werte der Standards in den PCR-Läufen größer wurden. Aus diesem Grund wurde als nächstes ausgetestet, unter welchen Lagerungsbedingungen die Standards die längste Haltbarkeit aufwiesen. Hierfür wurden jeweils zwei 100  $\mu\text{l}$ -Portionen von neu (aus der  $10^9$ -Stocklösung) verdünnten Standards der Konzentrationen  $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  hergestellt und eine Portion bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren, die andere bei  $+4^\circ\text{C}$  gelagert. Anschließend wurden die CT-Werte der Standards in den jeweiligen PCRs am gleichen Tag der Herstellung mit denen verglichen, die nach 12 Tagen gemessen wurden (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Differenz der CT-Werte der vier PCR's Euba, Act, Avis und Anae bei Lagerung bei -20°C bzw. bei +4°C nach 12 Tagen im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0**

	CT(Tag12)- CT (Tag0) bei -20°C	CT (Tag 12)- CT (Tag0) bei +4°C		CT(Tag 12)- CT (Tag0) bei -20°C	CT (Tag 12)- CT (Tag0) bei +4°C
<b>Euba</b>			<b>Act</b>		
10 <sup>5</sup>	-0,05	0,06	10 <sup>5</sup>	5,39	15,03
10 <sup>3</sup>	0,58	0,87	10 <sup>3</sup>	5,41	> 45
10 <sup>2</sup>	0,47	1,37	10 <sup>2</sup>	5,07	1,94
<b>Avis</b>			<b>Anae</b>		
10 <sup>5</sup>	0,93	2,49	10 <sup>5</sup>	0,22	0,44
10 <sup>3</sup>	0,94	2,13	10 <sup>3</sup>	0,39	0,25
10 <sup>2</sup>	0,41	1,23	10 <sup>2</sup>	0,74	0,28

Wie in Tabelle 4 zu sehen ist, zeigte sich im Vergleich zum Ausgangstag, und zwar unabhängig von der Lagerungsart, dass die Standards (sehr wahrscheinlich aufgrund der Degeneration der Plasmid-DNA) nach 12 Tagen schlechter amplifiziert wurden. Im Vergleich der beiden Lagerungsarten untereinander fiel jedoch auf, dass die bei -20°C gelagerten Standards in der Regel eine niedrigere Differenz der CT-Werte aufwiesen (mit Ausnahme der Act 10<sup>2</sup>-, Anae 10<sup>3</sup>- und 10<sup>2</sup>- Verdünnung). Die Standards der gattungsspezifischen Actinomyceten-PCR zeigten bei Lagerung im Kühlschrank die schlechtesten Ergebnisse, da nach 12 Tagen in der 10<sup>3</sup>-Verdünnung keine amplifizierbaren Genregionen mehr nachweisbar waren, und die 10<sup>5</sup>- und 10<sup>2</sup>-Verdünnungen einen im Vergleich zu den anderen PCR's sehr hohen CT-Wert aufwiesen. Aus diesem Grund wurden alle Standards, wenn sie länger als eine Woche nicht genutzt worden waren, vom 10<sup>9</sup>-Standard neu verdünnt und vor Einsatz in einen PCR-Lauf mit unbekanntem Proben in einer separaten PCR auf ihre Linearität und das Erreichen der festgeschriebenen CT-Werte getestet, bevor sie zur Quantifizierung herangezogen wurden. Die hierbei zu erzielenden CT-Werte der Standards sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: festgelegte CT-Werte der Standards.**

	Standard 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
<b>Euba-PCR</b>	14-16	20-22	27-29	-
<b>Act-PCR</b>	-	21-23	27-29	31-33
<b>Avis-PCR</b>	-	22-24	28-30	32-34
<b>Anae-PCR</b>	-	21-23	27-29	31-33

## 4.8 Charakterisierung der adhäsiven Eigenschaften unterschiedlicher Kunststoffprüfkörper

Zum Test ihrer anti-adhäsiven Eigenschaften wurden verschiedene modifizierte Zahnfüllkunststoffe im Vergleich zu einem Standardkunststoff im ersten Versuch *in vitro* mit einer Bakteriensuspension aus fünf Keimen (*A. naeslundii* DSM 17233, *A. viscosus* DSMZ 43329, *S. oralis* DSMZ 20627, *S. mitis* DMSZ 12643 und *S. sanguis* DMSZ 20068 zu je 0,2 OD) für 8 bzw. 24 Stunden inkubiert (s. Kap. 3.1.8, 3.2.9 und [18]).

Die an die verschiedenen Prüfkörper adhätierenden Bakterien wurden anschließend lysiert und die genomische DNA im Folgenden in den neu etablierten PCRs amplifiziert, um den Anteil der adhärenen Actinomyceten zu quantifizieren. Um die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen, wurden alle Proben in Dreifachbestimmung in den TaqMan-PCRs getestet.

Anhand der nachgewiesenen Bakterienmengen wurde zum einen die Adhärenz an die Prüfpasten untereinander verglichen, zum anderen auch die Entwicklung der Adhärenz zwischen 8 und 24 Stunden auf den einzelnen Pasten beurteilt.

Da in den *in vitro* Versuchen ein anderer Typstamm von *A. viscosus* verwendet worden war (DSM 43329) als für die Etablierung der Avis-PCR (*A. viscosus* DSM 43327) und dieser Typstamm Sequenzunterschiede in den Primerbindungsstellen aufwies, musste ein Umrechnungsfaktor für die Quantifizierungsstandards berechnet werden, mit dessen Hilfe die Typstamm (DSM43329)-Amplifikation in der Avis-PCRs quantifiziert werden konnte. Es stellte sich kürzlich heraus, dass der *in vitro* verwendete *A. viscosus*-Stamm DSM 43329 bei DSMZ nun nicht mehr als *A. viscosus*, sondern als eine nicht näher differenzierte Actinomycetenspezies (*A. sp.*) geführt wird.

Es wurde im Folgenden mittels zwei neuen Primern (nanH-F2 und nanH-R2) ein größerer, die *nanH*-F/R-Bindungsstellen einschließender Bereich amplifiziert und kloniert (s.a. Kap. 5.4.1, Abb 21).

Um die Quantifizierung der *in vitro*-Experimente zu bereinigen, wurden diese neuen Plasmide als Quantifizierungsstandards verwendet, da diese, in die *nanH*-TaqMan PCR eingesetzt, aufgrund ihrer Fehlbasenpaarung in den Bindungsstellen der *nanH*-Primer F1/R1 genauso (un)effizient amplifiziert wurden, wie die genomische DNA des *A. sp.*-Stammes DSM 43329. Somit war es möglich, einen Umrechnungsfaktor zu erzielen, mit dem die Ergebnisse der ursprünglichen PCR-Läufe neu berechnet werden konnten.

Die vier Standards in den Konzentrationen  $2,5 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^2$  des Stammes DSM 43327 wurden für den Stamm DSM 43329 auf  $3,53 \times 10^8$ ,  $2,56 \times 10^7$ ,  $1,99 \times 10^6$  und  $1,39 \times 10^5$  angepasst. Durch diese Umrechnung konnte die etablierte Avis-TaqMan-PCR mit entsprechenden Quantifizierungsstandards auch für den nicht 100% sequenz-homologen Typstamm in den *in vitro* Versuchen weiterhin verwendet werden.

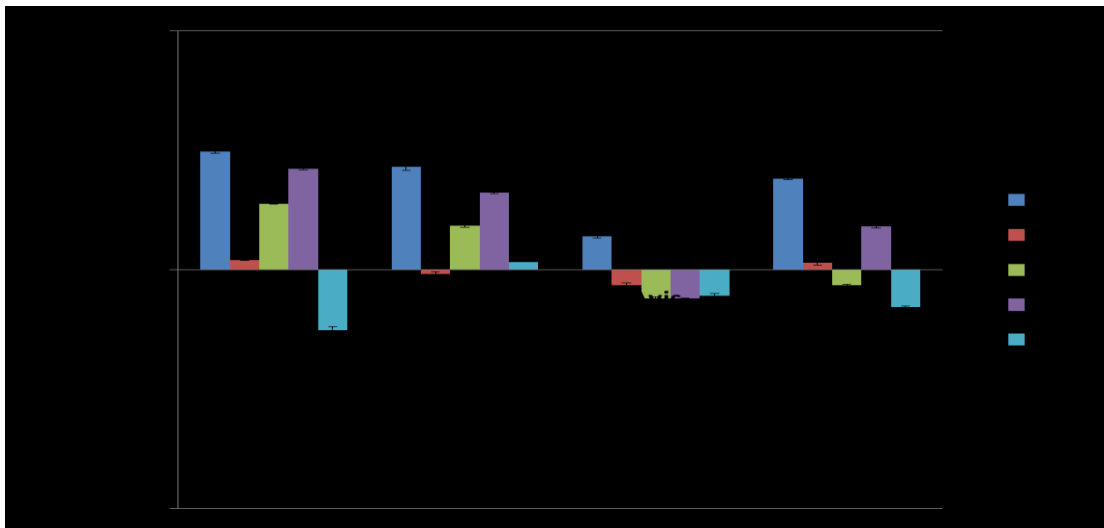
Nun wurden die adhäsiven Eigenschaften der Kunststoffprüfkörper mittels der vier zur Verfügung stehenden TaqMan-PCRs Euba, Act, Avis und Anae charakterisiert.

#### 4.8.1 Die Standardpaste zeigt im Vergleich zu den modifizierten Kunststoffen *in vitro* die stärkste Zunahme adhärenter Keime von 8 auf 24 Stunden

Die isolierte Gesamt-DNA der adhärenenten Keime wurde in die oben genannten TaqMan-PCRs eingesetzt, um die Adhärenz der verschiedenen Bakterienspezies an die modifizierten Kunststoffe und den Standardkunststoff quantifizieren und vergleichen zu können.

Um die Präzision der PCRs zu bestimmen, wurden alle PCRs dreifach durchgeführt.

Zuerst wurden die 8 Stunden-Werte als Referenzwert genommen und mit den 24 Stunden-Werten verglichen. So konnte die Stärke der Zunahme beziehungsweise Abnahme der Adhäsion an die Kunststoffprüfkörper ermittelt und verglichen werden (siehe Abbildung 17).



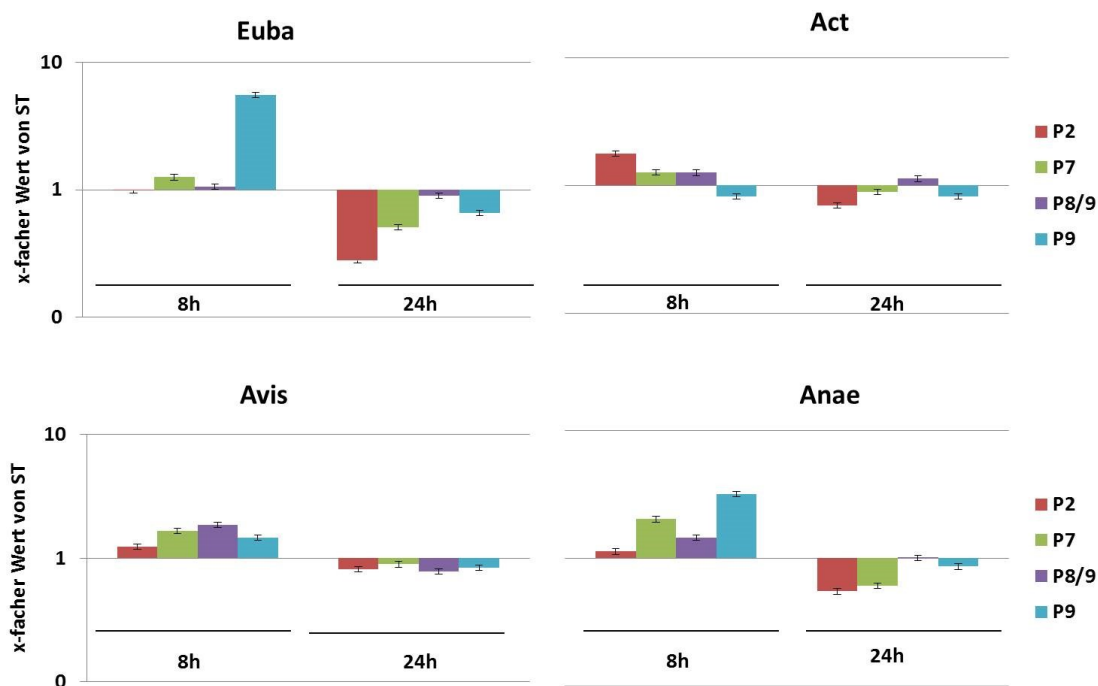
**Abb. 17: Verhältnis der Menge an adhärenenten Eubakterien, *Actinomyces* spp., *A. naeslundii* und *A. viscosus* von 24h zu 8h auf den verschiedenen Prüfpasten nach Inkubation mit dem 5-Keim-Gemisch**

Der 8h-Wert wurde als Referenzwert genommen, der 24h-Wert weicht nach oben (Adhäsion nimmt zu) oder unten ab (Adhäsion nimmt ab). Es sind für jede der vier PCRs (Euba, Act, Avis und Anae) die auf den Kunststoffprüfpasten nachgewiesenen Kopienzahlen dargestellt, wobei Standardkunststoff (ST) =blau, P2 = rot, P7= grün, P8/9= violett, P9 = hellblau abgebildet ist. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, steigt die Adhäsion aller Keime des Keimgemisches an die Standardpaste von 8 auf 24h in allen vier PCRs an, wobei die Zunahme der Adhärenz von *A. naeslundii* (Anae-PCR) höher ist als die von *A. viscosus* (Avis-PCR). Die höchste Zunahme adhärenter Keime zeigte im Vergleich aller Pasten immer die Standardpaste (ST). In allen PCRs, mit Ausnahme der Act-PCR, war eine Abnahme der Adhärenz an die bakterizide Paste 9 erkennbar, deren Ausmaß jedoch schwankte. In der Actinomyceten-PCR war eine geringe Zunahme der Adhärenz sichtbar, in der Eubakterien-PCR sank die Anheftung stark, was durch eine größere Gesamtanzahl an Streptokokkenspezies im Gemisch zu erklären war. Die Paste 8/9 zeigte (bis auf eine Ausnahme in der Avis-PCR) immer eine Zunahme der bakteriellen Beladung im Laufe der Zeit. An die anti-adhäsive Paste 7 nahm die Adhärenz der beiden *Actinomyces*-Spezies *A. naeslundii* und *A. viscosus* ab, in der Eubakterien- und Actinomyceten-PCR stieg sie jedoch relativ stark an. An die ebenfalls anti-adhäsive Paste 2 war jedoch nahezu keine Zunahme der bakteriellen Adhärenz von 8 auf 24 Stunden zu verzeichnen. Hier schwankten die Werte zwischen 8 und 24 Stunden insgesamt nur sehr gering. Es zeigte sich eine leichte Zunahme in der Euba- und der Anae-PCR. In der Act- und Avis-PCR sank die Adhärenz. So lässt sich zusammenfassen, dass alle modifizierten Kunststoffe eine verringerte Adhärenz von *A. viscosus* aufwiesen. An der Standardpaste erhöhte sich die Zahl dieser anheftenden Keime. Im Vergleich mit dem Standardkunststoff wiesen die beiden modifizierten anti-adhäsiven Kunststoffe P2 und P7 nach 24 Stunden eine geringere Adhärenz auf. Beim Vergleich der Keimbelastung zwischen 8 und 24 Stunden nur an der jeweiligen Paste P2 oder P7 war jedoch kein eindeutiges Ergebnis feststellbar, da die Werte insgesamt, trotz Dreifachbestimmung, stark schwankten.

Die beiden bakteriziden Kunststoffe P8/9 und P9 zeigten im Vergleich zur Standardpaste ebenfalls eine geringere Keimbelastung. Nach 24 Stunden wies die Paste P9, bis auf die Act-PCR, immer eine reduzierte Keimbelastung im Vergleich zum 8 Stunden-Wert auf. Auf Paste 8/9 hingegen waren nach 24 Stunden in der Regel mehr adhärenente Actinomyceten nachweisbar.

Um die Keimbelastung der modifizierten Kunststoffe im Vergleich zum Standardkunststoff besser beurteilen zu können, wurden die ermittelten Bakterienmengen auf dem Standardkunststoff nach 8h bzw. 24h als Referenzwert genommen und mit der Bakterienmenge auf den Prüfkörpern P2 bis P9 verglichen (s. Abb.18).



**Abb. 18: Vergleich der Adhäsion der Bakterien auf den verschiedenen Prüfpasten im Verhältnis zur Standardpaste nach 8h und 24h *in vitro*-Inkubation.**

Die in den TaqMan PCRs Euba, Act, Avis und Anae nachgewiesenen Kopien auf den Pasten P2 (rot), P9 (hellblau), P7(grün) und P8/9 (lila) sind im Verhältnis zu denen auf der Standardpaste ST als x-facher Wert angegeben.

Wie Abbildung 18 verdeutlicht, zeigten die modifizierten Kunststoffe nach 8h noch keine anti-adhäsiven Eigenschaften (mit Ausnahme der Paste P9 in der Act-PCR), sondern hatten stets eine höhere Keimbelastung als ST. Besonders Paste 9 erwies sich in der Euba- und der Anae-PCR nach 8h als besonders adhäsiv. Erst nach 24h Inkubationszeit ließ sich eine Reduktion der Bakterienbelastung an allen modifizierten Pasten, außer P 8/9 in der Act- und Anae-PCR, im Verhältnis zu ST erkennen, wobei Paste 2 dort die stärkste Abnahme der Adhäsion erkennen ließ.

Bei den *in vitro*-Versuchen hatte sich gezeigt, dass Paste 9 nach 24h eine besonders geringe Bakterienbelastung im Vergleich zum 8h-Wert aufwies und dass Paste P2 im Verhältnis zum Standardkunststoff die stärkste Abnahme der Adhärenz nach 24 Stunden zeigte. Des Weiteren erkannte man, dass im Vergleich mit modifizierten Zahnfüllkunststoffen der Standardkunststoff die höchste Keimbelastung aus einem Keimgemisch von fünf Bakterienspezies nach 24 Stunden aufwies. Im Folgenden sollten die Kunststoffe *in situ* getestet werden, um zu sehen, ob sich in Gegenwart des oralen Mikrobioms ähnliche Ergebnisse beobachten lassen würden.

## **4.9 Das probandenspezifische Mikrobiom hat Einfluss auf die *in situ* Adhäsion an die Prüfkörper**

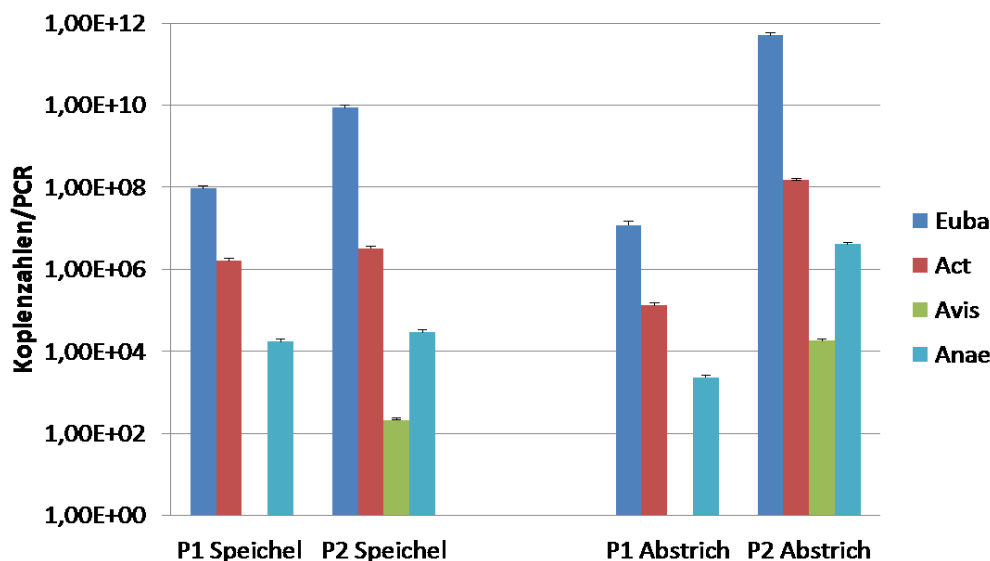
Zur *in situ* Testung der modifizierten Kunststoffe erklärten sich zwei Probanden bereit, eine speziell für sie hergestellte Platte, an der die Kunststoffprüfkörper befestigt waren, für die Dauer von 8 Stunden im Mund zu tragen. Die Prüfkörper wurden so befestigt, dass sie in beiden Probanden an den gleichen Stellen des Mundes zu liegen kamen. Es sollte untersucht werden, ob die Kunststoffe *in situ* die gleichen anti-adhäsiven Eigenschaften zeigen würden wie in den *in vitro*-Versuchen, und ob es probandenspezifische Unterschiede bei der Keimbelastung der Prüfkörper gibt. Zusätzlich wurden Speichelproben und Abstriche aus der Mundhöhle der Probanden entnommen, um Auskunft darüber zu erhalten, wie hoch die Keimbelastung der beiden Probanden im flüssigen Milieu, wie dem Speichel, im Vergleich zu einem durch den Abstrich gewonnenen Biofilm ist. Zur Quantifizierung der Spezies *A. viscosus* wurde die neu etablierte Avis-PCR genutzt und im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen keine Umrechnung der Standardkonzentrationen durchgeführt (s. a. Kap. 4.8 und 5.4.1).

### **4.9.1 Die Bakterienlast in Speichel und Abstrich variiert Probanden-spezifisch**

Zum Vergleich der Konzentration planktonischer (freischwimmender) Keime im Speichel und adhärenter Keime im Abstrich der Wangenschleimhaut wurden den beiden Probanden, wie unter Kap. 3.2.12 und 3.2.13 beschrieben, Proben entnommen und in die TaqMan-PCRs eingesetzt. Durch den Abstrich der Schleimhaut wurden so beiden Probanden natürliche muköse Biofilme entnommen, die im Folgenden auf die Keimmengen untersucht wurden. So sollte ermittelt werden, ob es probandenspezifische Unterschiede in der bakteriellen Quantität und Zusammensetzung der Proben gibt.

Abbildung 19 verdeutlicht die nachgewiesenen Mengen an (Eu-)Bakterien und Actinomyceten in den Speichelproben und Abstrichen beider Probanden.





**Abb. 19: Actinomycetenmengen in Speichel und Abstrich von Proband 1 und 2.**

DNA-Präparationen der Speichel- und Abstrichproben von Proband 1 und 2 wurden in die vier TaqMan-PCRs zum Nachweis der Gesamtbakterienlast (Euba; blau), des Actinomycetengehaltes (Act;rot), sowie des Gehaltes an *A. viscosus* (Avis; grün) und *A. naeslundii* (Anae; hellblau) eingesetzt.

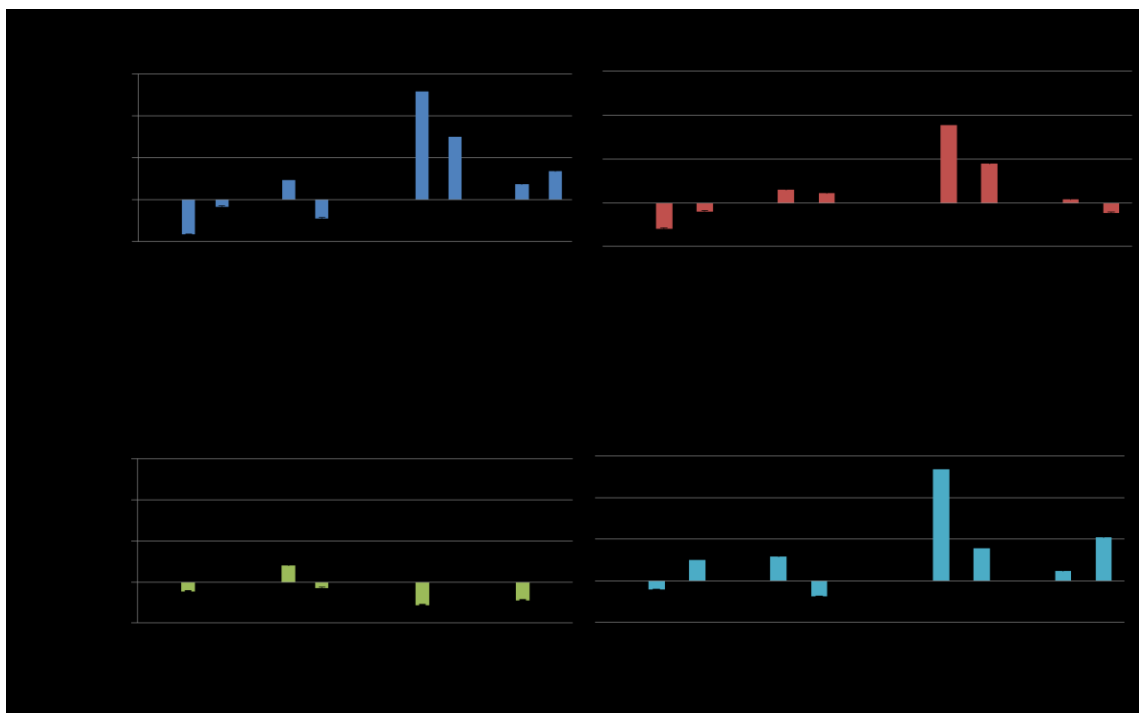
Im Vergleich beider Probanden zeigte sich, dass Proband 2 sowohl im Speichel als auch im Abstrich für jede nachgewiesene Bakteriengruppe bzw. –spezies eine höhere Keimzahl aufwies. Dieser Unterschied zeigte sich vor allem bei der Gesamtmenge an Bakterien (Euba), wo bei Proband 2 im Speichel ca. zwei Zehnerpotenzen und im Abstrich ca. vier Zehnerpotenzen mehr Keime detektiert wurden als bei Proband 1. Im Speichel schwankten die Kopienzahlen bei den *Actinomyces* spp. nur geringfügig. Proband 2 wies sowohl im Speichel als auch im Abstrich *A. viscosus* auf, wohingegen bei Proband 1 dieser Keim in beiden Proben nicht nachweisbar war. Die Mengen an Actinomyceten und *A. naeslundii* unterschieden sich in den mukösen Biofilmen beider Probanden deutlich. Hier wies Proband 2 eine deutlich höhere Menge an Actinomyceten im Allgemeinen, als auch *A. naeslundii* und *A. viscosus* im Speziellen auf. Hier fanden sich im Abstrich 100fach mehr Bakterien als im Speichel.

Nachdem nun erste Ergebnisse über Probanden-spezifische Unterschiede in der Bakterienquantität in Speichel und Abstrich vorlagen, wurden im Folgenden die für 8 Stunden im Mund getragenen Kunststoffprüfkörper auf ihre Bakterienbeladung untersucht.

#### 4.9.2 Die Bakterienadhärenz an die modifizierten Kunststoffe im Vergleich zur Standardpaste zeigt Probanden-abhängige Unterschiede

Die von den Probanden im Mund getragenen Kunststoffprüfkörper wurden wie unter Kap. 3.2.11 beschrieben präpariert und die aufgereinigte genomische DNA in die etablierten TaqMan-PCRs eingesetzt.

Zuerst wurde die Bakterienadhärenz der modifizierten Kunststoffe in Bezug auf den Standardkunststoff bei den beiden Probanden untersucht. Dazu wurde die ermittelte Bakterienmenge (gemessen als Kopien des Zielgens) auf dem Standardkunststoff ST nach 8h als Referenz genommen (100%) und mit der Bakterienmenge auf den modifizierten Prüfkörpern verglichen. Es zeigte sich so, ob sich auf den Prüfkörpern mehr oder weniger Bakterien befanden als auf dem Standardkunststoff. So sollte ermittelt werden, ob sich ähnlich wie bei den *in vitro*-Versuchen, auch im Mund die anti-adhäsive Wirkung der modifizierten Kunststoffe nachweisen ließ (s. Abbildung 20).



**Abb. 20: Vergleich der Adhäsion der Bakterien auf den verschiedenen Prüfpasten im Verhältnis zur Standardpaste (ST=1) nach 8h *in situ*-Inkubation in der oralen Kavität der Probanden 1 und 2.**

Die in den TaqMan PCRs nachgewiesenen Kopien an Bakterien (Euba=blau), Actinomyceten (Act=rot), *A. viscosus* (Avis=grün) und *A. naeslundii* (Anae= hellblau) auf den Pasten P2, P9, P7 und P8/9 sind im Verhältnis zu denen auf der Standardpaste ST als x-facher Wert angegeben.

Wie in Abbildung 20 zu erkennen, wurde bei den zwei Probanden die Adhäsion der Eubakterien insgesamt, sowie der *Actinomyces* spp. auf den Prüfkunststoffen im Vergleich zu der Beladung des Standardkunststoffes betrachtet. Es zeigte sich, dass bei Proband 1 in allen TaqMan-PCRs eine reduzierte Adhäsion an P2 zu erkennen war, an P7 immer eine erhöhte Adhäsion. Paste 8/9 und P9 zeigten bis auf jeweils eine Ausnahme (P8/9 in der Act-PCR und P9 in der Anae-PCR) eine vermehrte Adhäsion.

Bei Proband 2 hingegen war an den Pasten P2 und P9 immer eine starke Zunahme der Adhärenz im Vergleich zu ST zu sehen, mit Ausnahme der Avis-PCR. An Paste 7 war stets eine leicht erhöhte Adhärenz erkennbar (Ausnahme Avis-PCR), an P8/9 waren meist mehr Keime nachweisbar als auf ST.

Insgesamt zeigte sich, dass die Ergebnisse beider Probanden in den meisten Fällen divergent waren und bis auf Paste 2 bei Proband 1 keine eindeutige Wirkung der Pasten erkennbar war. Bei Proband 2 waren, wie auch schon bei den Speichelproben und Abstrichen erkennbar, deutlich mehr Keime nachweisbar als bei Proband 1. Im Vergleich zu den *in vitro*-Tests, in denen an P9 nach 24 Stunden im Verhältnis zu 8 Stunden immer eine reduzierte Bakterienlast vorzufinden war, zeigte sich dieses Ergebnis in den *in situ*- Versuchen nach 8-stündiger Inkubation (noch) nicht. Nach 24 Stunden erwies sich Paste P2 bei den *in-vitro* Versuchen als weniger adhäsiv im Vergleich zu ST. In situ war dieses Ergebnis bei Proband 1 nach 8 Stunden ebenfalls erkennbar.

#### **4.9.3 Die EZ1-Aufreinigung verändert die Bakterienlast der Proben**

Da bei Proband 1 an einigen Prüfkörpern *A. viscosus* nachgewiesen werden konnte, in Speichel und Abstrich jedoch nicht, wurde vermutet, dass die verschiedenen Aufbereitungsverfahren der Proben, nämlich die Verwendung des Qiagen-Kits für die Kunststoffprüfkörper-Proben (s. Kap. 3.2.11) und des EZ1-Roboters für die Speichelproben von Proband 1 und Abstriche, dafür verantwortlich gewesen sein könnten (s. Kap. 3.2.13). Es wurden daher weitere Tests mit Abstrichen von Proband 1 durchgeführt, in denen die nachgewiesenen Bakterienzahlen nach zwei unterschiedlichen Aufbereitungsarten verglichen wurden. Um einen Hinweis darüber zu erhalten, ob sich die DNA-Ausbeute der Abstriche durch die Aufreinigung im EZ1-Roboter ändert, wurde die Bakterienlast des Abstrichs von Proband 1 vor und nach EZ1-Aufbereitung verglichen (s. a. Kap. 3.2.12). Ergebnisse siehe Tabelle 6.

**Tabelle 6: Einfluss der EZ1-Aufreinigung auf die Ausbeute an DNA und somit Bakteriengenomnachweise**

Nachweis	Kopien/Abstrich (Hitzelyse)	Kopien/Abstrich (Hitzelyse + EZ1)
Euba	1,64E+9	1,17E+7 (0,7%)
Act.spp	2,39E+6	1,16E+5 (4,8%)
Avis	1,22E+4	0,00E+0 (0,0%)
Anae	6,44E+4	8,76E+2 (1,4%)

Wie Tabelle 6 anschaulich verdeutlicht, war nach EZ1-Aufreinigung im Vergleich zur alleinigen Hitzelyse weniger Bakterien-DNA vom Abstrich isoliert worden, wobei der Unterschied zwei bis vier Zehnerpotenzen ausmachte. Dies führte aufgrund der geringeren Keimzahl von *A. viscosus* im Abstrich dazu, dass die Konzentration der DNA dieser Spezies zu gering für einen PCR-Nachweis wurde. Dies erklärt die Ergebnisse der *in situ* Testung, in denen im Speichel von Proband 1 nach EZ1-Aufbereitung kein *A. viscosus* nachweisbar war, auf den oral von Proband 1 getragenen Prüfkörpern, die vom BMFZ mittels Qiagen-Kit aufbereitet wurden, jedoch sehr wohl.

## 5. Diskussion

### 5.1 Die TaqMan-PCR zur Quantifizierung von Mikroorganismen

Der Nachweis von Mikroorganismen lässt sich durch eine Reihe verschiedener Methoden durchführen. Neben dem mikroskopischen Bakteriennachweis wird vor allem die kulturelle Anzucht seit langer Zeit als Goldstandard angesehen [58]. Der Nachteil der Kultivierung besteht jedoch in ihrem hohen methodischen und zeitlichen Aufwand. Zudem sind einige Mikroorganismen kulturell nur schwer oder nicht anzüchtbar, weshalb in den vergangenen Jahren andere Testsysteme entwickelt wurden. Hierzu ist auch die Polymerase-Kettenreaktion zu zählen, bei der eine erregerspezifische Nukleinsäuresequenz amplifiziert und nachgewiesen wird [58]. Die Real-time-PCR (und hierunter speziell die TaqMan-PCR) gelten als moderne Methoden zur Vervielfältigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren [38]. Vorteil dieser Methode ist ein schneller, spezifischer Nachweis, auch von nicht kultivierbaren Erregern [40,54,58].

In mehreren Publikationen der letzten Jahre wurde die Real-time-PCR zum Nachweis oraler Mikroorganismen eingesetzt [9,11,13,14,39]. Alvarez et al. nutzten im Jahr 2013 die Realtime-PCR in Kombination mit Propidiummonoazid (PMA), um die Sterblichkeit verschiedener oraler Mikroorganismen in einem Biofilm *in vitro* zu analysieren, wobei der Vorteil dieser Methode in der Detektierbarkeit von toten bzw. nicht proliferierenden Erregern lag [39]. Zu bedenken ist, dass in unserer Versuchsreihe neben vitalen auch tote Mikroorganismen detektiert wurden und in die Quantifizierung mit einfließen. Ob diese jedoch noch eine aktive Rolle in den Stoffwechselfvorgängen anderer Organismen im Biofilm spielen und somit ggf. an der Entstehung von Sekundärkaries Anteil haben, bleibt offen.

Periasamy et al. analysierten im Jahr 2009 Biofilme *in vitro*, um mittels Realtime-PCR die Interaktionen zwischen verschiedenen Bakterienspezies während der Biofilmbildung genauer beschreiben zu können [11]. Auch die Vernetzung zwischen verschiedenen Bakterienspezies und zwischen Bakterien und dem Zahndentin wurde in mehreren Publikationen anhand der PCR genauer untersucht. Hallberg et al. analysierten im Jahr 1998 [13] sowie Li et al in 1999 [14] die Fimbrien-Untereinheiten von *A. viscosus* und *A. naeslundii*, um so die Formation von Biofilmen genauer nachvollziehen zu können [13,14].

Da bereits Publikationen zum Nachweis der von uns nachzuweisenden *Actinomyces* spp. *A. naeslundii* und *A. viscosus* vorlagen, wurden diese im Rahmen der Forschungsarbeiten

herangezogen und auf ihre Tauglichkeit geprüft [9,40]. Wie im Ergebnisteil dargelegt, eigneten sich diese TaqMan PCRs jedoch nicht zum Nachweis der beiden *Actinomyces* Spezies. Im Rahmen der experimentellen Arbeiten dieser Dissertation mussten daher neue TaqMan-PCRs designiert und etabliert werden, die z.T. andere Gene als Amplifikationsmatrix nutzten und so einen speziesspezifischen Nachweis zuließen.

## **5.2 Bewertung der gewählten Gene zum speziesspezifischen Nachweis von *A. naeslundii* und *A. viscosus***

Nach ausgiebigen BLAST-Analysen zur Auffindung speziesspezifischer Genregionen im Genom von *A. naeslundii* und in Datenbank-zugänglichen Sequenzen für *A. viscosus* wurde für *A. naeslundii* ein Bereich des 16S rRNA-Gens und für *A. viscosus* das *nanH*-Gen, sowie das F1A-Gen gewählt. Das 16S rRNA-Gen wurde schon häufig als Zielgen in Realtime-PCRs benutzt [9]. Die Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens gilt als universell einsetzbare Methode zur Identifikation von Bakterien [43,46] und ist in der Molekularbiologie seit 30 Jahren der Goldstandard unter den Identifikationsmethoden [46]. In der Evaluation verschiedener, selbst designierter Primer und Sonden stellte sich eine Region dieses Gen als geeignet für den speziesspezifischen Nachweis von *A. naeslundii* dar.

Die Spezies *A. naeslundii* wurde ursprünglich in drei Genotypen unterteilt (Genotyp 1, Genotyp 2 und WVA 963) [43]. Heute wird nur noch Genotyp 1 als *A. naeslundii* (sensu stricto) klassifiziert, zu dem auch der Typstamm ATCC 12104 zählt [56]. Genotyp 2 gilt heute als *A. oris* und Genotyp WVA 963 wird heute als *A. johnsonii* geführt [44]. Henssge et al. benannten im Jahr 2009 sechs „Housekeeping“ Gene von *A. naeslundii*, darunter auch das F1A-Gen (*atpA*-Gen), anhand derer zum einen die drei Genotypen am besten differenziert werden konnten, zum anderen aber auch eine Abgrenzung zur Spezies *A. viscosus* möglich war [43]. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Versuchsergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass die gewählte 16S rRNA-Genregion zum speziesspezifischen Nachweis von *A. naeslundii* sensu stricto geeignet ist. Dies war umso erfreulicher, da ribosomale RNAs meist in mehreren Kopien pro Genom vorkommen und somit eine Vervielfältigung des Amplifikationssignals pro Bakterienzelle bedingen.

Bei der Suche nach der Anzahl der Kopien des 16S rRNA-Gens im *A. naeslundii*-Genom stellte sich heraus, dass das 16S rRNA-Gen dreifach vorhanden ist [53]. Dies war für die Sensitivität

der TaqMan-PCR entscheidend, da pro Bakterienzelle, im Vergleich zu einem „Single-Copy-Gen“ wie dem *atpA* Gen, drei Zielregionen existieren.

Da sich in den eigenen Versuchsreihen herausgestellt hatte, dass ein sensitiver und spezifischer Nachweis von *A. viscosus* anhand des 16S rRNA-Gens nicht möglich war, wurde nach BLAST-Analysen die als speziesspezifisch geltende Sequenz des F1A-Gens (*atpA*-Gen) von *A. viscosus* herangezogen und für die Erstellung von Primern und Sonden gewählt. Das *atpA*-Gen kodiert für die F1-alpha-Untereinheit der ATP-Synthase [43]. Die ATP-Synthase ist ein Komplex aus Membranproteinen in der Plasmamembran von Bakterien, der zur Produktion von ATP dient [47], dem wichtigsten Energielieferanten des Stoffwechsels [7].

Trotz des erstellten Alignments, das die ausgewählte *atpA*-Genregion als speziesspezifisch für *A. viscosus* auswies, stellte sich im Versuchsverlauf heraus, dass die *atpA*-spezifischen Primer und die Sonde kreuzreaktiv mit anderen *Actinomyces* spp. zu sein scheinen (s. Kap. 4.5). So wurde die Entscheidung getroffen, anstatt des *atpA*-Gens die parallel etablierte *nanH*-Gen nachweisende TaqMan-PCR zum Nachweis von *A. viscosus* zu nutzen. Diese zeichnete sich in den BLAST-Analysen und auch in den Versuchen durch eine gute Sensitivität und Spezifität aus und wies in den PCR-Läufen eine gute Linearität auf. Das *nanH*-Gen kodiert für das Enzym Sialidase oder auch Neuraminidase, das in Viren, Bakterien und Wirbeltieren vorkommt und Neuraminsäureglykoside und neuraminhaltige Glykoproteine spaltet [7]. Für orale Bakterien ist die Aktivität dieses Enzyms für die Adhäsion und somit für die Biofilmbildung bedeutend [12,44]. Das *nanH*-Gen kommt nur einfach im Genom von Actinomycetenstämmen vor und gilt somit als „Single-Copy-Gen“ [12].

Aufgrund der Tatsache, dass das gewählte *nanH*-Gen nur einmal im Genom von *A. viscosus* vorhanden ist, entsprechen die in den Ergebnissen dargestellten Kopienzahlen/PCR auch den absoluten Genomäquivalenten an *A. viscosus* pro PCR. Bei der Spezies *A. naeslundii* hingegen, die das 16S rRNA-Gen dreifach aufweist, müssten die dargestellten Kopienzahlen/PCR zusätzlich noch durch drei dividiert werden, um die tatsächlichen Genomäquivalente/PCR zu berechnen und so eine direkte Vergleichbarkeit zur *A. viscosus*-PCR zu schaffen.

### 5.3 Vergleichbarkeit der PCR-Läufe

Um die Ergebnisse der verschiedenen PCR-Läufe vergleichen zu können, wurde versucht, für alle Experimente die gleichen Voraussetzungen zu schaffen. Vor den Versuchen mit den Kunststoffprüfkörpern *in vitro* und *in situ* wurden die Quantifizierungsstandards aller PCRs getestet und gegebenenfalls neu verdünnt, sodass die festgelegten CT-Werte pro Konzentration eingehalten wurden (s. Tab. 5). Bei kleineren Abweichungen wurde der Threshold der PCRs so verschoben, dass die CT-Werte innerhalb der festgelegten Grenzen lagen. Des Weiteren wurde bei den Experimenten darauf geachtet, dass die Effizienz  $E$  mehr als 90% aufwies und die Bestimmtheit  $R^2 > 0,980$  [50].

Nach Bustin et al. aus dem Jahr 2009 sollen immer gleiche Methodenparameter gewählt werden, da sonst verschiedene Ergebnisse erzielt werden, die sich nicht zum Vergleich eignen [48]. Es wurden somit in allen PCR-Läufen die gleichen Mengen an DNA-Probe eingesetzt, zur Mastermix-Herstellung wurden die gleichen Primer- und Sondenkonzentrationen, Puffer und Mastermixe verwendet, und die PCRs am selben PCR-Gerät mit dem stets gleichen Programm durchgeführt, um Schwankungen der Ergebnisse durch diese Parameter zu verhindern. Zu bedenken bleibt jedoch die unterschiedliche DNA-Präparation der adhärennten Bakterien von den Kunststoffprüfkörpern. Einerseits wurde für die *in situ*-Proben die DNA-Präparation mittels QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen durch das BMFZ und andererseits die DNA-Isolation aus Speichelproben und Abstrichen mittels EZ1-Roboter durchgeführt (s. auch Kap. 4.9.3). Aufgrund der unterschiedlichen Methoden sollten die Ergebnisse bezüglich der Bakterienbeladung von Prüfkörpern, Abstrich und Speichel nicht direkt miteinander verglichen werden, da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine DNA-Präparation über den EZ1-Roboter zu erheblichen DNA-Verlusten führt. Obwohl diese Gegebenheiten beachtet wurden, konnten nicht in allen Läufen exakt die gleichen CT-Werte erreicht werden und nicht immer lagen Bestimmtheit und Effizienz im optimalen Bereich. Somit sind kleine Differenzen in der Quantifizierung der Actinomyceten in den Proben zu erklären.

Als Voraussetzung für einen zuverlässigen quantitativen Nachweis gelten Genauigkeit und eine hohe Wiederholbarkeit [49]. Um weiterhin die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen, wurden daher alle Proben dreifach in PCRs getestet. Dort wurde ebenfalls überprüft, ob sich Effizienz, Bestimmtheit und CT-Wert ähneln.



## 5.4 *in vitro* Versuche

Durch die *in vitro* Versuche sollte unter den festgeschriebenen Bedingungen die Entwicklung der Bakterienadhäsion an die modifizierten Kunststoffprüfkörper nach 8 und 24 Stunden untersucht werden. Durch die Benetzung der Pellikel-haltigen Prüfkörper mit einem Bakteriengemisch aus fünf oralen Frühbesiedlern sollte die Biofilmbildung initiiert werden. Diese von Rüttermann et al. bereits in zwei Publikationen [18,37] *in vitro* charakterisierten Kunststoffprüfkörper wurden mir für diese Versuchsreihe von der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie der Heinrich-Heine-Universität zur Verfügung gestellt.

Die Arbeitsgruppe von Rüttermann publizierte in 2011 und 2012 Ergebnisse ihrer Testung, die Oberflächenenergie von Kunststofffüllmaterialien durch Zugabe bestimmter Wirkstoffe zu reduzieren und den Wasserkontaktwinkel zu erhöhen, um so die Plaqueformation an diesen Füllmaterialien zu verringern [18,37]. Sie konnten zeigen, dass die anti-adhäsiv und bakterizid modifizierten Kunststoffe (Zusammensetzung s. Kap. 3.1.7) die gewünschten Eigenschaften aufwiesen. Nach Inkubation mit Suspensionen einzelner Bakterienspezies, darunter auch *A. naeslundii* und *A. viscosus*, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie die gesamte Bakterienmenge sowie die Menge an lebenden und toten Bakterien nach 8 und 24 Stunden bestimmt und mit den Quantitäten auf einem nicht veränderten Standardkunststoff verglichen. Es zeigte sich für alle fünf getesteten Bakterienspezies, dass die modifizierten Kunststoffe nach 8 und 24 Stunden weniger lebende Zellen aufwiesen als der Standardkunststoff. Die reduzierte Oberflächenenergie führte zu einer geringeren Bakterienanzahl auf den Prüfkörpern, der Wasserkontaktwinkel hingegen hatte keinen Einfluss auf die Bakterienadhäsion [18,37]. Um diese Kunststoffe nun auf die Adhäsion der beiden Frühbesiedler *A. naeslundii* und *A. viscosus* aus einem Bakteriengemisch zu untersuchen, wurden im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente die gleichen Methoden der Herstellung und Prüfkörperpräparation verwendet, die Rüttermann et al. publizierten [18,37]. Im Gegensatz zur Methode der Fluoreszenzmikroskopie bei Rüttermann et al., bei der zwischen der Gesamtmenge der Bakterien sowie zwischen lebenden und toten Bakterien unterschieden werden konnte, wurden in den jetzigen Experimenten TaqMan-PCRs zur Quantifizierung der einzelnen Bakterienspezies etabliert, bei denen die Gesamt-DNA von lebenden und toten Keimen nachgewiesen wurde. Ein Vergleich der Daten beider Versuchsreihen in Bezug auf die Menge nur lebender oder toter Bakterien war somit nicht möglich. Im Jahr 2005 beschrieben Rudi et al. die Methode des Gebrauchs von Ethidiummonoazid (EMA) in Kombination mit einer Real-Time-PCR, um eine Quantifizierung

lebender und toter Zellen in komplexen Proben durchführen zu können [67]. Dabei durchdrang EMA lediglich die nicht mehr intakte Zellwand oder Zellmembran toter Bakterien und interkalierte durch Lichtaktivierung in die DNA, sodass diese in der PCR nicht mehr amplifiziert werden konnte. Auch Alvarez et al. untersuchten 2013 Biofilme unter Einsatz von Real-Time-PCRs und Propidiummonoazid (PMA) auf die Menge von lebenden und toten Zellen [39].

Für die Quantifizierung der Bakterienadhäsion aus einem Bakteriengemisch wurden die Kunststoffe in den hiesigen Experimenten für die gleichen Zeiten inkubiert wie zuvor beschrieben [18]. Das hergestellte Bakteriengemisch, das aus gleichen Teilen fünf oraler Frühbesiedler (jeweils 0,2 OD) bestand, deckte das Spektrum der zuerst an die Zahnoberfläche bindenden Keime ab (s. Abb.1). Die Streptokokken und die Actinomyceten werden als die zwei dominierenden Genera in der frühen Plaquebildung angesehen [5]. Zu bedenken bleibt jedoch, dass der finale orale Biofilm ein Netzwerk aus über 630 verschiedenen Spezies darstellt, die miteinander in Wechselwirkung stehen [54]. Von daher war mit dem 5-Keimgemisch nur ein kleiner Teil der tatsächlich oral vorkommenden Keime abgedeckt und daher nur die Situation zu Beginn der Biofilmbildung dargestellt. Des Weiteren bleibt bei der Interpretation der Ergebnisse der *in vitro* Experimente zu bedenken, dass *in vivo* nicht alle Keime in gleicher Konzentration im Speichel vorhanden sind und folglich die Testung von Bakteriengemischen unterschiedlicher Zusammensetzung veränderte Ergebnisse liefern kann, was auch die Ergebnisse der Speichelproben und Abstriche der Probanden gezeigt haben.

In den *in vitro* Versuchen von Rathke et al. aus dem Jahr 2010, den Biofilm an Kunststofffüllmaterialien zu reduzieren, wurde durch Zugabe von Triclosan nach 12 Stunden ein antibakterieller Effekt, vor allem auf den Keim *S. mutans*, nachgewiesen und auch die Anzahl von *A. viscosus* reduzierte sich nach 24 Stunden signifikant. Es handelte sich in dieser Versuchsreihe jedoch nur um monobakterielle Suspensionen, die zur Inkubation des modifizierten Kunststoffes eingesetzt worden waren [27]. Durch Zusatz von Chlorhexidin in ein dentales Kunststofffüllmaterial konnte die Arbeitsgruppe von Leung et al. im Jahr 2005 eine langsamere Biofilmbildung *in vitro* induzieren [33]. *In vitro* Versuche von Beyth et al. im Jahr 2006 [34] und Bürgers et al. im Jahr 2009 [35] beschrieben den Versuch, Plaque und Sekundärkaries durch quartäres Ammonium und Silberpartikeladditive in Kunststoffen zu verhindern. Es zeigte sich, dass beide Materialien einen antibakteriellen Effekt auf die eingesetzten monobakteriellen Suspensionen von *S. mutans* zeigten. Das Ammonium enthaltende Material zeigte diese Wirkung für einen Monat. Die Silberpartikel reduzierten zusätzlich die Anzahl adhärenter Streptokokken [34,35]. Im Vergleich zu den im Rahmen dieser

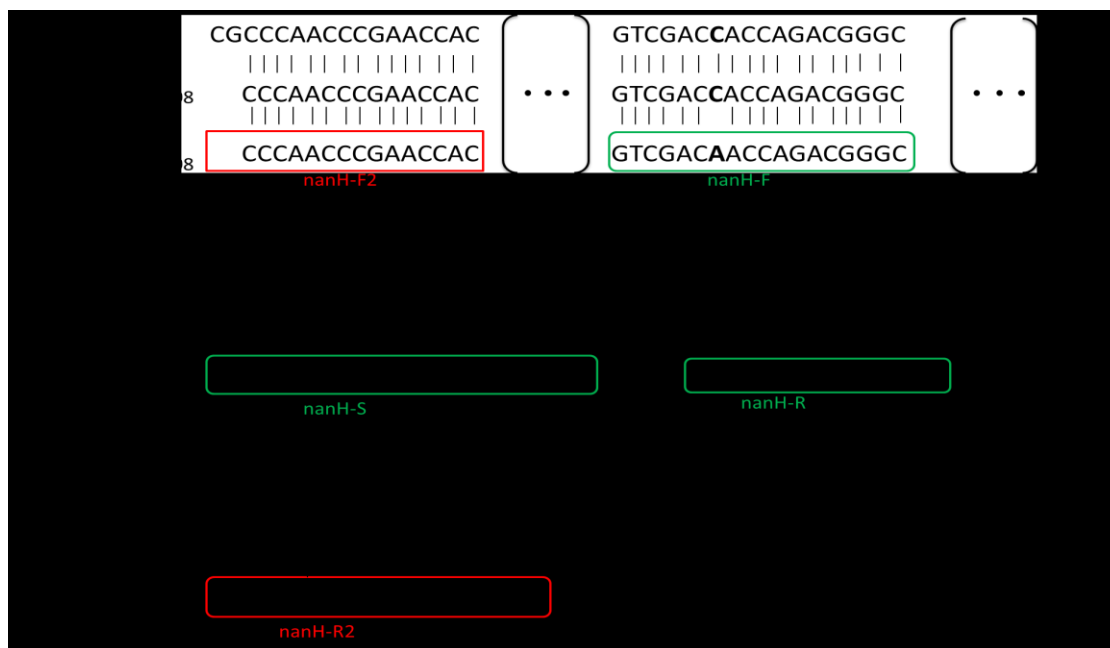
Arbeit getesteten Materialien, die mit einem Keimgemisch inkubiert wurden, wurde in diesen Versuchen nur *S. mutans* eingesetzt, der als Leitkeim und Hauptgrund der dentalen Karies angesehen wird [57] und nicht zu den Frühbesiedlern zu zählen ist. Bei den hier vorgestellten Experimenten wurde jedoch versucht, die initiale Biofilmbildung an modifizierte Kunststoffe zu inhibieren und so die Plaquebildung, die als Voraussetzung der Kariesentstehung gilt, zu unterdrücken. Die Ergebnisse der *in vitro* Adhäsionstests unter Einsatz des Gemisches aus fünf Frühbesiedlern zeigten, dass der Standardkunststoff immer eine stärkere Bakterienadhäsion aufwies als die modifizierten Kunststoffe. Kunststoff P9 zeigte hierbei die besten Ergebnisse in der Langzeitinkubation, da dort in allen PCRs eine Abnahme der Adhäsion zu erkennen war. Die bakterizide Modifikation im Biomaterial P9 stellt also *in vitro* einen ersten Erfolg dar, die Plaquebildung zu minimieren.

#### 5.4.1 Die Taxonomie von *A. viscosus*

Die fünf Bakterienstämme, die zur Erstellung des Bakteriengemisches verwendet wurden, wurden vom Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) erworben (s. Kap. 3.1.8). Rüttermann et al. erwarben dabei den *A. viscosus*-DSM-Stamm 43329, der für die *in vitro*-Versuche verwendet worden war und auch in anderen Publikationen bereits als *A. viscosus*-Stamm zum Einsatz kam [55]. Bei dem Versuch, diesen Stamm erneut bei DSMZ zu bestellen, fiel auf, dass nun unter dieser DSM-Nummer nicht mehr die Spezies *A. viscosus* zu erwerben ist, sondern eine nicht näher spezifizierte Bakteriengattung der Actinomyceten, nämlich *Actinomyces sp.*, angegeben ist.

Zur Etablierung der neuen TaqMan-PCRs wurde während der Versuchsphase der *A. viscosus*-Stamm ATCC 15987 verwendet, der unter der DSM-Nummer 43327 auch zum jetzigen Zeitpunkt als Typstamm von *A. viscosus* geführt wird, jedoch aus der oralen Kavität beim Hamster stammte. Da mit dieser PCR jedoch auch die jetzt als *Actinomyces sp.* benannte Spezies erkannt wurde, ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser Actinomycetenspezies um eine *A. viscosus*-verwandte Spezies beim Menschen handeln muss. Zum Zeitpunkt der Etablierung der Avis-PCR war davon auszugehen, dass der gewählte *A. viscosus*-Stamm ATCC 15987 ein repräsentativer Vertreter für diese Spezies sei. Erst in den letzten Monaten kamen durch weitere Rechercharbeiten Unstimmigkeiten bezüglich einer eindeutigen Taxonomie auf.

Die in der Literatur angegebene *A. viscosus*-spezifische TaqMan-PCR von Suzuki et al. [9] wurde im Rahmen dieser Arbeit mit *A. viscosus*-Stamm ATCC 15987 getestet und zeigte keine Speziespezifität für diese *A. viscosus* DNA (s. Kap. 4.1). Auf den Einsatz dieser PCR wurde daher im weiteren Verlauf verzichtet, da vermutet wurde, dass nicht alle Isolate von *A. viscosus* erkannt werden und sich die zu amplifizierende Genregion nicht ermitteln ließ. Suzuki et al. gaben in ihrer Publikation zur Etablierung dieser PCR den *A. viscosus*-Stamm ATCC 43146 an [9]. Bei der Recherche zur Taxonomie von *A. viscosus* fiel auf, dass zum einen der Stamm dieser Typnummer (ATCC 43146) laut Modesto et al. als *A. viscosus* [66], zum anderen jedoch, von Persson et al., auch als *A. naeslundii* (Typ I+II) gelistet wird [65]. Aufgrund dieser Unstimmigkeiten wurden weitere Quellen zur Klärung der Taxonomie herangezogen. Im Bergey's Manual of Systematic Bacteriology aus dem Jahr 2012 [56] wurde dargelegt, dass eine Verwandtschaft zwischen den Spezies *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. oris* und *A. johnsonii* besteht, die durch serologische Tests jedoch unterschieden werden können und nur schwache Kreuzreaktionen liefern. *A. viscosus* wird jetzt als Pathogen der Mundhöhle bei Hamstern, Ratten und anderen Nagern beschrieben, darunter auch der Typstamm ATCC 15987. Da die für *A. viscosus* etablierte PCR auch positive Ergebnisse für den jetzt nicht mehr als *A. viscosus* geltenden Stamm DSM 43329 lieferte, kann vermutet werden, dass es sich hierbei um eine der oben genannten Spezies handelt. Es wurde ebenfalls beschrieben, dass *A. oris* nun Stämme zugerechnet werden, die früher als *A. naeslundii* und *A. viscosus* identifiziert wurden [56]. *A. oris* wird seitdem als Bewohner der menschlichen Mundhöhle angesehen. Die eindeutige Zuordnung des in dieser Arbeit verwendeten *Actinomyces*-Stammes DSM 43329 zu einer anderen Spezies ist jedoch offiziell noch nicht geschehen. Sequenzierung und BLAST-Analyse eines 250bp Bereiches des *nanH* Gens von DSM 43329 zeigten die nahe Verwandtschaft zu *A. oris* und erklärten die verzögerte Amplifikation in der *Avis nanH*-PCR (s. Abb. 21).



**Abb. 21:** Vergleich der Nukleotidsequenz des *Actinomyces*-Stammes DSM 43329 mit *A. oris*-DNA und *A. viscosus* DSM 43327 im Bereich der gewählten Primer-/Sonden-Bindungsstellen.

Die Analyse des PCR-Produktes mit den flankierenden Primern nanH-F2/-R2 (rot), die den Bereich der alten Primer nanH-34F und nanH-109R (grün) einschließen, ermöglichte die Identifizierung der Primer und Sondenbindungsregionen der *Avis-nanH*-PCR im *Actinomyces* sp. DSM-Stamm 43329 im Vergleich zu *A. oris* und *A. viscosus* DSM 43327 (s. a. Kap. 5.4).

Es zeigte sich in der BLAST-Analyse, dass der *A. sp.*-Stamm DSM 43329 die höchste Homologie zu *A. oris* aufweist. Im Bereich der Bindungsstellen der von uns verwendeten Primer zeigten sich einige Fehlpaarungen (Punktmutationen), sodass diese DNA von den Primern der *nanH*-TaqMan-PCR etwas schlechter amplifiziert wurde. Da die klonierten Standards jedoch die exakte Sequenz der Primer aufwiesen, wurden die Standards hervorragend amplifiziert, die genomische DNA des *A. viscosus*-Stammes aufgrund der Punktmutationen jedoch verzögert, was zu einer zu niedrigen Berechnung der Kopienzahlen führte, die (wie im Ergebnisteil beschrieben) mittels Umrechnung zu korrigieren war (s. Kap 4.8).

Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt jedoch mehr als fraglich, welche *A. viscosus*-Varianten der Mensch in der oralen Kavität trägt: gar keine, *A. oris* oder *A. johnsonii*. So bleibt aufgrund der jetzigen Sequenzdatenlage zu befürchten, dass die *Avis-nanH*-TaqMan-PCR zwar zur Quantifizierung des verwendeten ATCC Stammes in den *in vitro*-Experimenten benutzt werden konnte, dass jedoch in biologischen Proben keine absolute Quantifizierung möglich ist (s.a. Kap. 5.5).

## 5.5 *in situ* Versuche

Zur *in situ* Testung der modifizierten Kunststoffe wurden als Pilotstudie zwei Probanden ausgewählt. Es handelte sich um eine weibliche und eine männliche Versuchsperson. Zum besseren Vergleich der Ergebnisse wurden die Kunststoffe an den gleichen Stellen im Mund der zwei Probanden befestigt. Die mikrobielle Normalflora der menschlichen Mundhöhle weist besonders zahlreich Streptokokken, Actinomyceten und Bacteroides auf [58]. Zusätzlich besteht die residente Mundflora des Erwachsenen aus apathogenen Neisserien sowie den anaeroben Fusobakterien und Laktobazillen [59].

Zu bedenken ist, dass die Normalflora der menschlichen Mundhöhle zwar ähnliche Genera aufweist, die exakte Zusammensetzung bei verschiedenen Individuen jedoch stark divergent ist. Durch inflammatorische Prozesse, wie Gingivitis oder Parodontitis, sind Änderungen des Keimspektrums beobachtet worden [1], darunter auch ein Anstieg der *Actinomyces spp.* [54]. Da bei beiden Probanden dieser Studie keine Informationen über einen möglichen Inflammationsgrad des Zahnfleisches vorlagen, muss dies als mögliche Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse mit einbezogen werden. Bei bisherigen *in vivo* Versuchen zeigte sich, dass der Biofilm in einem Individuum langfristig als beständig einzustufen ist, wobei auch dort kurzfristig die Bedingungen schwanken. Bei verschiedenen Individuen unterscheidet sich die Biofilmmzusammensetzung jedoch signifikant [60], was sowohl eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse als auch eine Interpretation über die Verwendbarkeit eines neuen Füllstoffes erschwert bzw. die Durchführung von Probanden-starken Studien erforderlich macht.

Wie schon bei der Diskussion der *in vitro*-Experimente erwähnt, bleibt auch bei den *in situ*-Versuchen die Frage offen, welche Stämme von *A. viscosus* tatsächlich in der menschlichen Mundhöhle anzutreffen sind. Nach wie vor wurden in den letzten Monaten Publikationen veröffentlicht, die sich mit *A. viscosus* als einem humanen kariogenen Keim beschäftigen und bei denen auch der Stamm ATCC 15987 zum Einsatz kam [64]. Bei der Literatursuche nach *A. viscosus*-Stämmen wird der Stamm ATCC 15987 jedoch zurzeit nur als parodontaler Keim bei Hamstern angesehen [56]. Der *A. viscosus*-Stamm DSM 43798 wird sowohl bei DSMZ, als auch in einer früheren Publikation von Teufel et al. [63] als Isolat aus der menschlichen Mundhöhle aufgeführt, es gibt jedoch bereits in einer Publikation den Hinweis, dass dieser Stamm jetzt als *A. oris* identifiziert wurde [44]. Der früher als *A. viscosus* erworbene und jetzt als *Actinomyces sp.* erhältliche Stamm DSM 43329 wird bei DSMZ als Isolat aus humaner dentaler Plaque geführt und auch in der Veröffentlichung von Schade aus dem Jahr 2005 als Bewohner der

Mundhöhle ausgewiesen [55]. Die Arbeiten im Institut ergaben, wie oben erwähnt, dass dieser Stamm die größte Homologie zu *A. oris* aufweist. So scheint nach neuester Taxonomie *A. oris* Besiedler der menschlichen Mundhöhle zu sein, und es bleibt fraglich, ob überhaupt ein Vertreter der Spezies *A. viscosus* beim Menschen vorkommt. So bleibt eine eindeutige taxonomische Zuordnung abzuwarten. Bis dahin sollten die erzielten Ergebnisse für den Keim *A. viscosus* als vorläufig betrachtet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls neu etablierte TaqMan-PCR für den Nachweis von *A. naeslundii* hingegen zeigte während der Versuchsphase immer gleichbleibend gute Ergebnisse, sodass kein Zweifel an der Tauglichkeit dieser qPCR zur nun erstmöglichen Quantifizierung der Spezies *A. naeslundii* besteht.

Studien, die sich bisher mit dem Versuch der Reduktion des Biofilmes an Füllmaterialien befassten, wurden vornehmlich *in vitro* durchgeführt, sodass die Testung der Kunststoffe *in situ* an vorerst zwei Probanden als Anhaltspunkt für weitere Forschungsarbeiten mit größeren Probandengruppen dienen kann. Es finden sich in der Literatur einige Publikationen, die sich mit Biofilmen *in situ* beschäftigen, wobei diese sich selten auf Füllungskunststoffe beziehen, sondern auf Implantatoberflächen [61,68,69] oder die antibakteriellen Wirkungen von Zahnpastazusätzen oder Mundspüllösungen sowie der photodynamischen Therapie [62,70,71]. In einer Studie von Gosau et al. aus dem Jahr 2009 wurde bei vier Probanden an im Mund getragenen Implantatstückchen die Wirkung verschiedener desinfizierender Lösungen auf die Biofilmbildung untersucht. Es zeigte sich eine reduzierte Adhärenz an der Titanoberfläche nach Anwendung bestimmter desinfizierender Spüllösungen im Vergleich zur nicht behandelten Standardoberfläche [61]. Al-Ahmad et al. zeigten 2013, dass an hochpolierten Implantatoberflächen ein geringeres Risiko für Biofilmbildung und damit verbundener Periimplantitis bestand als an raueren Oberflächen [69]. Korsch et al. konnten 2014 zeigen, dass verbliebener Befestigungszement von Implantatkronen im Parodontalspalt als Anheftungsstelle für Mikroorganismen dient und somit die Gefahr für Zahnfleischblutungen und Periimplantitis erhöht war [68]. In der Studie von Wood et al. aus dem Jahre 1999 wurde der Effekt der photodynamischen Therapie auf einen sieben Tage alten, *in vivo* gebildeten Biofilm am Zahnschmelz getestet. Es stellte sich heraus, dass nach Lichtaktivierung weniger lebendige Zellen im Biofilm nachweisbar waren und dass insgesamt ein dünnerer Biofilm entstand [62]. Ajdaharian et al. zeigten 2014, dass nach dreiwöchiger Testphase ein neu entwickeltes Mundgel eine stärker reduzierte Biofilmbildung bei den Testpersonen erkennen ließ, als bei der Kontrollgruppe mit einem bereits etablierten Mundgel [70].

Letztlich ist also der Versuch, eine Reduktion des Biofilms in der Mundhöhle zu erzielen, ein Thema vieler Forschungsgruppen. Sowohl an Implantatoberflächen [61,68,69], am Zahnschmelz [62,70] oder an Füllmaterialien [18,27,33-35] wird durch Materialmodifizierungen oder Zusatz antibakterieller Substanzen versucht, die Biofilmbildung und die Bakterienadhärenz zu reduzieren, um so Krankheiten wie Periimplantitis, Parodontitis oder Karies zu verhindern.

Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunden sollte nun als nächster Schritt in der Testung der modifizierten Kunststoffe eine größere Probandengruppe rekrutiert werden, bei denen Mundhygieneindizes und Entzündungsgrad des Zahnfleisches bekannt und vergleichbar sind, um diese nochmals die Füllmaterialien im Mund tragen zu lassen. Die DNA-Aufbereitungsmethoden sollten dann identisch sein. Da bei den *in vitro* Versuchen zwischen 8- und 24-stündiger Inkubation eindeutige Unterschiede in der Besiedelung der Füllmaterialien mit Bakterien im Allgemeinen und Actinomyceten im Speziellen nachweisbar waren, sollten diese Zeitpunkte auch *in situ* analysiert werden, wobei die neu etablierte TaqMan-PCR zur Quantifizierung von *A. naeslundii* eingesetzt werden kann.



## 6. Schlussfolgerungen

Rüttermann et al. konnten zeigen, dass die Adhärenz homogener Bakteriensuspension an Kunststofffüllmaterialien durch Modifikation der Materialeigenschaften zu reduzieren ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte verifiziert werden, ob sich dieses antibakterielle Verhalten auch bei Adhäsion von Bakteriengemischen *in vitro* und *in situ* zeigt. Um diese Analyse zu ermöglichen, wurden neue TaqMan-PCRs für den speziesspezifischen Nachweis der frühbesiedelnden Actinomycetenspezies *A. naeslundii* und *A. viscosus* entwickelt und validiert.

Nach *in vitro* Inkubation der Prüfkörper mit einem Bakteriengemisch aus fünf frühbesiedelnden Keimen für 8 und 24 Stunden zeigte sich eindeutig die anti-adhäsive Wirksamkeit des Füllmaterials P9, das nach 24 Stunden, im Vergleich zum 8h-Wert, eine reduzierte Bakterienadhäsion aufwies, wohingegen der Standardkunststoff stets eine starke Zunahme der Bakterienanheftung zeigte. Kunststoff P2 zeigte im Vergleich zum Standardkunststoff die geringste Keimbelastung nach 24 Stunden. Der bakterizide Kunststoff P7 und der anti-adhäsive Kunststoff P8/9 zeigten in den *in vitro* Studien keine eindeutigen Ergebnisse.

Bei den *in situ* Versuchen zeigten sich größere Probanden-spezifische als Material-spezifische Unterschiede. Es zeigte sich bei jedem Probanden ein Kunststoff weniger adhäsiv, dieses Ergebnis war jedoch für den jeweiligen Kunststoff bei dem zweiten Probanden nicht reproduziert, wobei Probanden-spezifische Faktoren wie z.B. Mundhygiene hierbei eine Rolle gespielt haben könnten, da Proband 2 insgesamt eine erhöhte Bakterienlast im Abstrich aufwies.

Zur Bestätigung der anti-adhäsiven Wirksamkeit des Füllmaterials P9 sollte eine größere Probandengruppe für *in situ* Versuche rekrutiert werden, die die Füllmaterialien über eine längere Dauer (8h und 24h) im Mund trägt, wobei die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und etablierten TaqMan-PCRs zum Nachweis von *A. naeslundii* und (mit der dargestellten Einschränkung) *A. viscosus* erstmalig den quantitativen Nachweis dieser Frühbesiedler in polymikrobiellen Biofilmen ermöglichen.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1) Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr., Communication among oral bacteria., *Microbiol Mol Biol Rev.* **2002** Sep;66(3):486-505
- 2) Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS., Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance., *Nat Rev Microbiol.* **2010** Jul;8(7):471-80
- 3) Zijngje V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ., Oral biofilm architecture on natural teeth., *PLoS One.* **2010** Feb 24;5(2):e9321
- 4) Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG., Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm., *J Appl Microbiol.* **2004**;97(6):1311-8
- 5) Palmer RJ Jr, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE., Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque., *J Bacteriol.* **2003** Jun;185(11):3400-9
- 6) Huang R, Li M, Gregory RL., Bacterial interactions in dental biofilm., *Virulence.* **2011** Sep-Oct;2(5):435-44
- 7) Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch* 257. Auflage, Verlag Walter de Gruyter, 1993
- 8) Sanderink, R.B.A., et al., *Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie, Quintessenz* **2004**
- 9) Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, Yamashita Y, Kiyoura Y., Real-time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation. *J Clin Microbiol.* **2004** Aug;42(8):3827-30
- 10) Pereira JV, Leomil L, Rodrigues-Albuquerque F, Pereira JO, Astolfi-Filho S, Bacterial diversity in the saliva of patients with different oral hygiene indexes. *Braz Dent J.* **2012**;23(4):409-16
- 11) Periasamy S, Chalmers NI, Du-Thumm L, Kolenbrander PE., *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 requires *Actinomyces naeslundii* ATCC 43146 for growth on saliva in a three-species community that includes *Streptococcus oralis* 34. *Appl Environ Microbiol.* **2009** May;75(10):3250-7
- 12) Yeung MK., Molecular and genetic analyses of *Actinomyces* spp., *Crit Rev Oral Biol Med.* **1999**;10(2):120-38
- 13) Li T, Johansson I, Hay DI, Strömberg N., Strains of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces viscosus* exhibit structurally variant fimbrial subunit proteins and bind to different peptide motifs in salivary proteins., *Infect Immun.* **1999** May;67(5):2053-9
- 14) Hallberg K, Holm C, Ohman U, Strömberg N., *Actinomyces naeslundii* displays variant fimP and fimA fimbrial subunit genes corresponding to different types of acidic proline-rich protein and beta-linked galactosamine binding specificity., *Infect Immun.* **1998** Sep;66(9):4403-10
- 15) Liu B, Faller LL, Klitgord N, Mazumdar V, Ghodsi M, Sommer DD, Gibbons TR, Treangen TJ, Chang YC, Li S, Stine OC, Hasturk H, Kasif S, Segrè D, Pop M, Amar S., Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease., *PLoS One.* **2012**;7(6):e37919
- 16) Peyyala R, Kirakodu SS, Ebersole JL, Novak KF., Novel model for multispecies biofilms that uses rigid gas-permeable lenses., *Appl Environ Microbiol.* **2011** May;77(10):3413-21

- 17) Brambilla E, Ionescu A, Gagliani M, Cochis A, Arciola CR, Rimondini L., Biofilm formation on composite resins for dental restorations: an in situ study on the effect of chlorhexidine mouthrinses, *Int J Artif Organs*. **2012** Oct;35(10):792-9
- 18) Rüttermann S, Bergmann N, Beikler T, Raab WH, Janda R., Bacterial viability on surface-modified resin-based dental restorative materials., *Arch Oral Biol*. **2012** Nov;57(11):1512-21
- 19) Steinberg D, Eyal S., Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials., *J Dent*. **2002** Jan;30(1):47-51
- 20) Montanaro L, Campoccia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C, Arciola CR., Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomaterials*. **2004** Aug;25(18):4457-63
- 21) Mo SS, Bao W, Lai GY, Wang J, Li MY., The microfloral analysis of secondary caries biofilm around Class I and Class II composite and amalgam fillings., *BMC Infect Dis*. **2010** Aug 17;10:241
- 22) Kidd EA, Beighton D., Prediction of secondary caries around tooth-colored restorations: a clinical and microbiological study., *J Dent Res*. **1996** Dec;75(12):1942-6
- 23) Beyth N, Domb AJ, Weiss EI., An in vitro quantitative antibacterial analysis of amalgam and composite resins., *J Dent*. **2007** Mar;35(3):201-6
- 24) Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A, Haller B., Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro., *Caries Res*. **2002** Mar-Apr;36(2):101-7
- 25) Choi KK, Condon JR, Ferracane JL., The effects of adhesive thickness on polymerization contraction stress of composite., *J Dent Res*. **2000** Mar;79(3):812-7
- 26) Karanika-Kouma A, Dionysopoulos P, Koliniotou-Koubia E, Kolokotronis A., Antibacterial properties of dentin bonding systems, polyacid-modified composite resins and composite resins., *J Oral Rehabil*. **2001** Feb;28(2):157-60
- 27) Rathke A, Staude R, Muche R, Haller B, Antibacterial activity of a triclosan-containing resin composite matrix against three common oral bacteria., *J Mater Sci Mater Med*. **2010** Nov;21(11):2971-7
- 28) Davidovich E, Weiss E, Fuks AB, Beyth N., Surface antibacterial properties of glass ionomer cements used in atraumatic restorative treatment., *J Am Dent Assoc*. **2007** Oct;138(10):1347-52
- 29) Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR., Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach., *Dent Mater*. **2006** Jul;22(7):647-52
- 30) Palenik CJ, Behnen MJ, Setcos JC, Miller CH., Inhibition of microbial adherence and growth by various glass ionomers in vitro., *Dent Mater*. **1992** Jan;8(1):16-20
- 31) da Silva RC, Zuanon AC, Spolidorio DM, Campos JA., Antibacterial activity of four glass ionomer cements used in atraumatic restorative treatment., *J Mater Sci Mater Med*. **2007** Sep;18(9):1859-62
- 32) Lehmann K, Hellwig E, Wenz H, Zahnärztliche Propädeutik- Einführung in die Zahnheilkunde, Deutscher Zahnärzte Verlag Köln, 13. Aktualisierte Auflage, **2015**
- 33) Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young AM., Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials., *Biomaterials*. **2005** Dec;26(34):7145-53
- 34) Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI., Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*., *Biomaterials*. **2006** Jul;27(21):3995-4002

- 35) Bürgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G, Hahnel S., The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials., *Arch Oral Biol.* **2009** Jun;54(6):595-601
- 36) Carlén A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J., Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin., *Biomaterials.* **2001** Mar;22(5):481-7
- 37) Rüttermann S, Trellenkamp T, Bergmann N, Raab WH, Ritter H, Janda R., A new approach to influence contact angle and surface free energy of resin-based dental restorative materials., *Acta Biomater.* **2011** Mar;7(3):1160-5
- 38) Holzapfel, Wickert, Methoden und Anwendungsgebiete, Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR), *Biol.unserer Zeit* 2/2007 (37)
- 39) Alvarez G, González M, Isabal S, Blanc V, León R., Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide., *AMB Express.* **2013** Jan 4;3(1):1
- 40) Price RR, Viscount HB, Stanley MC, Leung KP. , Targeted profiling of oral bacteria in human saliva and in vitro biofilms with quantitative real-time PCR. *Biofouling.* **2007**;23(3-4):203-13
- 41) Bustin, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*,**2000**. 25(2): p. 169-93
- 42) Tang G, Yip HK, Luo G, Cheung BP, Shen S, Samaranayake LP.,Development of novel oligonucleotide probes for seven *Actinomyces* species and their utility in supragingival plaque analysis., *Oral Dis.* **2003** Jul;9(4):203-9
- 43) Henssge U, Do T, Radford DR, Gilbert SC, Clark D, Beighton D., Emended description of *Actinomyces naeslundii* and descriptions of *Actinomyces oris* sp. nov. and *Actinomyces johnsonii* sp. nov., previously identified as *Actinomyces naeslundii* genospecies 1, 2 and WVA 963., *Int J Syst Evol Microbiol.* **2009** Mar;59(Pt 3):509-16
- 44) Do T, Henssge U, Gilbert SC, Clark D, Beighton D., Evidence for recombination between a sialidase (nanH) of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces oris*, previously named '*Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2'.*FEMS Microbiol Lett.* **2008** Nov;288(2):156-62
- 45) Ellerbrock B, Untersuchung kariogener Mikroorganismen auf den freiliegenden Wurzeloberflächen bei Patienten mit chronischer Parodontitis, Düsseldorf **2010**
- 46) Keller P, Hombach M, Bloemberg G, 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektionen, *BIOspektrum* 7.10, 16.Jahrgang
- 47) Campbell N, Reece J, *Biologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 6.Auflage, 2003*
- 48) Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.*Clin Chem.* **2009** Apr;55(4):611-22.
- 49) Pfaffl M, Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung, *BIOspektrum* 1/04, 10. Jahrgang
- 50) Busch U., *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik, Grundlegende Methoden und Anwendungen, Springer Verlag 2010*
- 51) Thiemann F, Cullen P, Klein H, *Molekulare Diagnostik- Grundlage der Molekularbiologie, Genetik und Analytik, Wiley-VCH Verlag, 2. Auflage, 2015*
- 52) Gavrilenko A, Entwicklung einer real-time multiplex multitube RT-PCR zur Differentialdiagnostik der Klassischen Schweinepest, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen, 1. Auflage, **2006**

- 53) Jakubovics NS<sup>1</sup>, Gill SR, Iobst SE, Vickerman MM, Kolenbrander PE., Regulation of gene expression in a mixed-genus community: stabilized arginine biosynthesis in *Streptococcus gordonii* by coaggregation with *Actinomyces naeslundii*, *J Bacteriol.* **2008** May;190(10):3646-57
- 54) Dalwai F, Spratt DA, Pratten J., Use of quantitative PCR and culture methods to characterize ecological flux in bacterial biofilms, *J Clin Microbiol.* **2007** Sep;45(9):3072-6
- 55) Schade R, Entwicklung eines in vitro-Systems zur Prüfung der initialen Plaqueadhärenz an dentalen Biomaterialien, Jena **2005**
- 56) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 5, Second Edition, The Actinobacteria Part A*, Bergey's Manual Trust **2012**
- 57) Sharma A, Somani R., Dermatoglyphic interpretation of dental caries and its correlation to salivary bacteria interactions: an in vivo study, *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* **2009** Jan-Mar;27(1):17-21
- 58) Oethinger M, *Kurzlehrbuch Mikrobiologie und Immunologie*, Elsevier Urban& Fischer, 11.Auflage, **2004**
- 59) Groß U, *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Thieme Verlag, 3. Auflage, **2013**
- 60) Yip HK, Guo J, Wong WH., Protection offered by root-surface restorative materials against biofilm challenge., *J Dent Res.* **2007** May;86(5):431-5.
- 61) Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R, Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm., *Clin Oral Implants Res.* **2010** Aug;21(8):866-72
- 62) Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C., An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo., *J Photochem Photobiol B.* **1999** May;50(1):1-7
- 63) Teufel M<sup>1</sup>, Roggentin P, Schauer R., Properties of sialidase isolated from *Actinomyces viscosus* DSM 43798, *Biol Chem Hoppe Seyler.* **1989** May;370(5):435-43.
- 64) Samot J, Badet C., Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health, *Anaerobe.* **2013** Feb;19:34-8.
- 65) Persson R, Hitti J, Verhelst R, Vaneechoutte M, Persson R, Hirschi R, Weibel M, Rothen M, Temmerman M, Paul K, Eschenbach D, The vaginal microflora in relation to gingivitis, *BMC Infectious Diseases* 2009 **9**:6 doi:10.1186/1471-2334-9-6
- 66) Modesto A<sup>1</sup>, Lima KC, de Uzeda M., Effects of three different infant dentifrices on biofilms and oral microorganisms, *J Clin Pediatr Dent.* **2000** Spring;24(3):237-43.
- 67) Rudi K, Moen B, Drømtorp SM, Holck AL., Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples, *Appl Environ Microbiol.* **2005** Feb;71(2):1018-24
- 68) Korsch M, Walther W, Marten SM, Obst U, Microbial analysis of biofilms on cement surfaces: An investigation in cement-associated peri-implantitis, *J Appl Biomater Funct Mater.* **2014** Sep 5;12(2):e70-80.
- 69) Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Fackler A, Follo M, Hellwig E, Bächle M, Hannig C, Han JS, Wolkewitz M, Kohal R., In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials, *Arch Oral Biol.* **2013** Sep;58(9):1139-47.
- 70) Ajdaharian J, Dadkhah M, Sabokpey S, Biren-Fetz J, Chung NE, Wink C, Wilder-Smith P., Multimodality imaging of the effects of a novel dentifrice on oral biofilm, *Lasers Surg Med.* **2014** Sep;46(7):546-52.

- 71) Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Hungaro Duarte MA, de Andrade FB, Cavenago BC, Villas-Bôas MH, Ordinola-Zapata R, Amoroso-Silva P., Application of laser scanning microscopy for the analysis of oral biofilm dissolution by different endodontic irrigants, *Dent Res J (Isfahan)*. **2014** Jul;11(4):442-7.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.