

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Sektion Parodontologie

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Beikler

**Genetische Polymorphismen in *Porphyromonas gingivalis* und
deren Auswirkung auf dessen Virulenz**

Dissertation

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

vorgelegt von

Christina Kuhn

(2018)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Beikler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Frank Schwarz

„Wer nicht weiß wohin er hin will, darf sich nicht wundern wenn er ganz
wo anders ankommt.“ (Mark Twain)

Meinen Eltern,
in Dankbarkeit
für die langjährige, vielseitige Unterstützung.

ZUSAMMENFASSUNG

„Genetische Polymorphismen in *Porphyromonas gingivalis* und deren Auswirkung auf dessen Virulenz“

Christina Kuhn

Fragestellung und Ziel: Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob die Virulenz sowie die Invasionsfähigkeit von *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) mit Deletionspolymorphismen in den Genen PG0185 (*ragA*), PG0186 (*ragB*) und PG0982 korreliert und das Risiko an einer Parodontitis (PA) zu erkranken bei Vorliegen dieser Varianten erhöht ist.

Methodik: Es wurden 28 Patientenproben von klinisch an Parodontitis erkrankten Patienten aus einer longitudinalen *multiple-risk-Studie* (*MURIS*) der Universität Münster, sowie 34 Patientenproben von klinisch gesunden Probanden der Westdeutschen Kieferklinik untersucht. Alle diese Patienten wiesen *P.g.* auf. Die 28 Patienten der *MURIS*-Studie wurden anhand der Dauerhaftigkeit des Auftretens von *P.g.* in 2 Gruppen eingeordnet. Gr. 1 wurde von 6 Patienten gebildet, bei denen *P.g.* im Laufe der Behandlung verschwand. Gr. 2 wurde von 22 Patienten gebildet, bei denen *P.g.* bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach 2 Jahren kontinuierlich vorhanden war. Alle Proben wurden mittels PCR und rt-PCR auf ein Vorhandensein von PG0185, PG0186 und PG0982 untersucht. Zusätzlich wurden bei den Patienten der *MURIS*-Studie bei jeder Untersuchung die BOP- und PPD-Werte bestimmt um Aussagen zur Therapieeffektivität zu treffen. Zur Beurteilung des Therapieerfolges wurden die Untersuchungszeitpunkte 1 (Ausgangswert, V1) und 4 (nach 2 Jahren, V4) verglichen. Außerdem wurden 3 *P.g.*-Isolate der *MURIS*-Patienten, welche unterschiedliche Kombinationen der Virulenzfaktoren trugen, hinsichtlich Ihrer Invasionsfähigkeit in humane Gingivazellen getestet.

Ergebnisse: Die untersuchten Virulenzfaktoren (VF) traten in Gr. 1 und der gesunden Vergleichsgruppe seltener (16,7% bzw. 41,2%) auf als in Gr. 2 (59,1%). In Gr. 1 wurde nur der Virulenzfaktor PG0982 (16,7%) nachgewiesen. In der gesunden Vergleichsgruppe wurde PG0982 am häufigsten (26,5%) nachgewiesen. Eine Eliminierung von *P.g.* fand in 21,4% der untersuchten Fälle statt. *P.g.* wurde nie eliminiert wenn PG0186 oder eine Kombination mit diesem vorlag. War PG0982 vorhanden, war die Wahrscheinlichkeit einer Eliminierung um 90% geringer (OR=0,1). Eine Eliminierung fand am häufigsten statt (35,7%), wenn keiner der Virulenzfaktoren im Genom vorlag. Es konnte keine signifikante Änderung der BOP-Werte in Gr. 1 und 2 festgestellt werden. Die PPD änderte sich nur bei Vorhandensein des VF PG0982 signifikant ($p=0,041$).

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,002$) zwischen dem Auftreten einer PA und dem Vorhandensein des Virulenzfaktors PG0186 festgestellt werden, jedoch konnte durch diesen VF kein signifikanter Einfluss auf die Eliminierung von *P.g.* festgestellt werden.

Es zeigte sich keine erhöhte Invasivität der *P.g.*-Stämme, welche die untersuchten Virulenzfaktoren trugen.

Schlussfolgerung: Die Virulenzfaktoren PG0185 und PG0186 traten häufiger in der Gruppe der klinisch Erkrankten auf. PG0982 wurde in der Gruppe der gesunden Patienten häufiger (26,5%) nachgewiesen. PG0186 (*ragB*) ist signifikant mit dem Auftreten einer PA assoziiert. PG0185 und PG0982 zeigen keinen signifikanten Zusammenhang zum Auftreten einer Parodontitis. PG0186 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Eliminierung von *P.g.*

Das Auftreten der untersuchten Virulenzfaktoren korrelierte nicht mit einer erhöhten Invasivität in humane Gingivazellen.

ABSTRACT

„Genetic polymorphisms in *Porphyromonas gingivalis* and their effect on its virulence“

Christina Kuhn

Background and aim: This study aimed to investigate if the virulence and invasion ability of *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) correlates with deletion polymorphisms in the genes PG0185 (*ragA*), PG0186 (*ragB*) and PG0982 and if this correlates with a higher risk to come down with parodontitis (PA).

Material and methods: We examined 28 samples of patients who clinically came down with parodontitis and participated in a multiple-risk-study (*MURIS*) in Münster, as well as 34 samples of clinically healthy patients out of a collective of the Westdeutsche Kieferklinik. All of the patients featured *P.g.*. The patients of the *MURIS* were separated into two groups. Group 1, 6 patients, showed *P.g.* at the beginning of the study but it disappeared during the examination due to the therapy. Group 2, 22 patients, featured *P.g.* continuously from the beginning until the end of the study after 2 years. All samples were examined with PCR and rt-PCR whether PG0185, PG0186 and PG0982 exist. In addition BOP and PPD were measured in all *MURIS* sample. We compared the first and the last screening visits (V1, V4) to evaluate the success of the therapy. Furthermore 3 *P.g.*-isolates from the *MURIS*, which showed different combination of the examined virulence factors (VF), were tested concerning their invasion ability into human gingiva cells.

Result: The examined VFs occurred less frequently in group 1 and the healthy comparison group (16,7% resp. 41,2%) than in group 2 (59,1%). In group 1 only PG0982 (16,7%) could be verified. The group of the clinically healthy patients showed PG0982 most frequently (26,5%). *P.g.* was eliminated in 21,4%. *P.g.* never was eliminated when PG0186, a combination of PG0186 and PG0185 or a combination of all 3 VFs existed. When PG0982 was detected the chance to eliminate *P.g.* was 90% reduced (OR=0,1). An elimination of *P.g.* occurred most frequently (35,7%) when none of the VFs occurred in the genome. We could not detect a significant change in BOP in group 1 and 2. PPD only changed significantly ($p=0,041$) when PG0982 existed (-0,66mm). A significant relation ($p=0,002$) could be shown between the incidence of a PA and the existence of PG0186 but there was no significant influence to the elimination of *P.g.* due to this VF. A higher invasion ability of the *P.g.*-strains that contained the examined VFs could not be proved.

Conclusion: The VFs PG0185 and PG0186 occurred more often in the group of ill patients. PG0982 was detected more often in the group of clinically healthy patients. PG0186 (*ragB*) is associated significantly with the occurrence of parodontitis. PG0185 and PG0982 are not significantly associated with the occurrence of parodontitis.

The occurrence of the examined VFs does not correlate with a higher invasion ability in human gingiva cells.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A. a.	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Abb.	Abbildung
AB	Antibiotikum
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BOP	bleeding on probing, Blutungsindex
bp	Basenpaar
CFU	Colony-forming unit
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.c.	<i>Eikenella corrodens</i>
FKS	fetales Kälberserum
IL-1β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-12	Interleukin 12
INF – γ	Interferon γ
KAL	klinischer Attachment-Loss
LPS	Lipopolysaccharide
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mm	Millimeter

MMP	Metallomatrixproteinase
MW	arithmetischer Mittelwert
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
OR	Odds Ratio
ORF	open reading frame
p.	page, Seite
PA	Parodontitis
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase- Kettenreaktion)
<i>P.g.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PGE2	Prostaglandin E2
<i>P.i.</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PPD	pocket probing depth, Taschensondierungstiefen
p-Wert	Signifikanzwert
rpm	rounds per minute
S.	Seite
s	Sekunden
<i>T.d.</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T.f.</i>	<i>Tannerella forsythensis</i>
TIMP	tissue inhibitor of MMP
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TSB	Tryptic soy broth
TST	Taschensondierungstiefen
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
V1	Sceningvisit 1

V4

Sceningvisit 4

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Parodontitis	1
1.1.1 Klassifikation der Parodontitis	1
1.1.2 Epidemiologie	5
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese	6
1.1.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	8
1.1.5 Therapie	13
1.2 Fragestellung und Zielsetzung	14
2. Material und Methode	16
2.1 Studiendesign	16
2.2 Probanden	16
2.2.1 Einschlusskriterien	16
2.2.2 Ausschlusskriterien	17
2.3 Mikro- und molekularbiologische Methoden	18
2.3.1 Anzucht der Keime	18
2.3.2 DNA Isolation	19
2.3.3 Primer Auswahl	19
2.3.4 Speziestest	20
2.3.5 PCR	21
2.3.6 Gel-Elektrophorese	22
2.3.7 Quantitative realtime- PCR	23
2.4 Invasionsversuch	25
2.4.1 Austestung Antibiotika	25
2.4.2 Anzucht der Gingivazellen	26
2.4.3 Invasionsversuch von P.g. mit und ohne Zugabe von Antibiotika	28
2.4.4 Bakterienkontrolle	30

2.5 Datenverarbeitung und statistische Analyse	30
3 Ergebnisse	31
3.1 Demographie	31
3.2 Deskriptive Statistik	32
3.2.1 Ausgangsbefunde der klinisch erkrankten Patienten	32
3.2.2 Ausgangsbefunde der klinisch gesunden Patienten	34
3.2.3 Verteilung der Virulenzfaktoren im Vergleich der beiden Gruppen	35
3.3 Therapieverlauf	36
3.3.1 Therapieverlauf anhand von BOP	36
3.3.2 Therapieverlauf anhand von PPD	37
3.4 Eliminierung von <i>P.g.</i> im Verlauf der Behandlung	37
3.4.1 Eliminierung von <i>P.g.</i> von V1 zu V4	40
3.5 Auftreten einer PA in Abhängigkeit vom Vorhandensein der Virulenzfaktoren	41
3.6 Risikoeinschätzung	43
3.7 Invasionsversuch	44
3.7.1 Auswertung Antibiotikaaustestung	44
3.7.2 Auswertung Invasionsversuch mit und ohne Antibiotikum	45
4 Diskussion	48
4.1 Fragestellung	48
4.2 Material und Methode	48
4.2.1 Studiendesign	48
4.2.2 Probanden	48
4.2.3 Erhebung klinischer Parameter	50
4.2.4 Erhebung mikrobiologischer Parameter	50
4.3 Ergebnisse	53
5 Schlussfolgerung	57
6 Literaturverzeichnis	58

Datentabellen

Danksagung

1. Einleitung

1.1 Parodontitis

Parodontitis ist eine multifaktoriell bedingte, komplexe Erkrankung des Zahnhalteapparates, welche durch verschiedene Faktoren ausgelöst und begünstigt wird. Sie entwickelt sich in der Regel aus einer Gingivitis und resultiert in einem Abbau des knöchernen Zahnhalteapparates. Unbehandelt führt sie zu Zahnlockerung und im fortschreitenden Stadium zum Zahnverlust.

1.1.1 Klassifikation der Parodontitis

Im Jahre 1999 wurde nach dem *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* eine Klassifikation der Parodontitiden eingeführt, die auf klinischen, radiographischen, anamnestischen und mikrobiologischen Parametern basiert (Armitage, 1999) (siehe Abb. 1, S. 1 & 2)

- I. Gingival Diseases
 - A. Dental plaque-induced gingival diseases*
 1. Gingivitis associated with dental plaque only
 - a. without other local contributing factors
 - b. with local contributing factors (See VIII A)
 2. Gingival diseases modified by systemic factors
 - a. associated with the endocrine system
 - 1) puberty-associated gingivitis
 - 2) menstrual cycle-associated gingivitis
 - 3) pregnancy-associated
 - a) gingivitis
 - b) pyogenic granuloma
 - 4) diabetes mellitus-associated gingivitis
 - b. associated with blood dyscrasias
 - 1) leukemia-associated gingivitis
 - 2) other
 3. Gingival diseases modified by medications
 - a. drug-influenced gingival diseases
 - 1) drug-influenced gingival enlargements
 - 2) drug-influenced gingivitis
 - a) oral contraceptive-associated gingivitis
 - b) other
 4. Gingival diseases modified by malnutrition
 - a. ascorbic acid-deficiency gingivitis
 - b. other
 - B. Non-plaque-induced gingival lesions
 1. Gingival diseases of specific bacterial origin
 - a. *Neisseria gonorrhoea*-associated lesions
 - b. *Treponema pallidum*-associated lesions
 - c. streptococcal species-associated lesions
 - d. other
 2. Gingival diseases of viral origin
 - a. herpesvirus infections
 - 1) primary herpetic gingivostomatitis
 - 2) recurrent oral herpes
 - 3) varicella-zoster infections
 - b. other
3. Gingival diseases of fungal origin
 - a. *Candida*-species infections
 - 1) generalized gingival candidosis
 - b. linear gingival erythema
 - c. histoplasmosis
 - d. other
4. Gingival lesions of genetic origin
 - a. hereditary gingival fibromatosis
 - b. other
5. Gingival manifestations of systemic conditions
 - a. mucocutaneous disorders
 - 1) lichen planus
 - 2) pemphigoid
 - 3) pemphigus vulgaris
 - 4) erythema multiforme
 - 5) lupus erythematosus
 - 6) drug-induced
 - 7) other
 - b. allergic reactions
 - 1) dental restorative materials
 - a) mercury
 - b) nickel
 - c) acrylic
 - d) other
 - 2) reactions attributable to
 - a) toothpastes/dentifrices
 - b) mouthrinses/mouthwashes
 - c) chewing gum additives
 - d) foods and additives
 - 3) other
6. Traumatic lesions (factitious, iatrogenic, accidental)
 - a. chemical injury
 - b. physical injury
 - c. thermal injury
7. Foreign body reactions
8. Not otherwise specified (NOS)

-
- II. Chronic Periodontitis†
 - A. Localized
 - B. Generalized
 - III. Aggressive Periodontitis†
 - A. Localized
 - B. Generalized
 - IV. Periodontitis as a Manifestation of Systemic Diseases
 - A. Associated with hematological disorders
 - 1. Acquired neutropenia
 - 2. Leukemias
 - 3. Other
 - B. Associated with genetic disorders
 - 1. Familial and cyclic neutropenia
 - 2. Down syndrome
 - 3. Leukocyte adhesion deficiency syndromes
 - 4. Papillon-Lefèvre syndrome
 - 5. Chediak-Higashi syndrome
 - 6. Histiocytosis syndromes
 - 7. Glycogen storage disease
 - 8. Infantile genetic agranulocytosis
 - 9. Cohen syndrome
 - 10. Ehlers-Danlos syndrome (Types IV and VIII)
 - 11. Hypophosphatasia
 - 12. Other
 - C. Not otherwise specified (NOS)
 - V. Necrotizing Periodontal Diseases
 - A. Necrotizing ulcerative gingivitis (NUG)
 - B. Necrotizing ulcerative periodontitis (NUP)
 - VI. Abscesses of the Periodontium
 - A. Gingival abscess
 - B. Periodontal abscess
 - C. Pericoronal abscess
 - VII. Periodontitis Associated With Endodontic Lesions
 - A. Combined periodontic-endodontic lesions
 - VIII. Developmental or Acquired Deformities and Conditions
 - A. Localized tooth-related factors that modify or predispose to plaque-induced gingival diseases/periodontitis
 - 1. Tooth anatomic factors
 - 2. Dental restorations/appliances
 - 3. Root fractures
 - 4. Cervical root resorption and cemental tears
 - B. Mucogingival deformities and conditions around teeth
 - 1. Gingival/soft tissue recession
 - a. facial or lingual surfaces
 - b. interproximal (papillary)
 - 2. Lack of keratinized gingiva
 - 3. Decreased vestibular depth
 - 4. Aberrant frenum/muscle position
 - 5. Gingival excess
 - a. pseudopocket
 - b. inconsistent gingival margin
 - c. excessive gingival display
 - d. gingival enlargement (See I.A.3. and I.B.4.)
 - 6. Abnormal color
 - C. Mucogingival deformities and conditions on edentulous ridges
 - 1. Vertical and/or horizontal ridge deficiency
 - 2. Lack of gingiva/keratinized tissue
 - 3. Gingival/soft tissue enlargement
 - 4. Aberrant frenum/muscle position
 - 5. Decreased vestibular depth
 - 6. Abnormal color
 - D. Occlusal trauma
 - 1. Primary occlusal trauma
 - 2. Secondary occlusal trauma
-

Abb. 1: Klassifikation der parodontalen Erkrankungen und Konditionen (nach (Armitage, 1999))

* kann an einem Parodontium ohne Attachmentverlust oder an einem Parodontium mit nicht voranschreitendem Attachmentverlust vorkommen.

Es werden 8 Hauptgruppen unterschieden (Abb. 1, S. 1 & 2):

- I. gingivale Erkrankungen
- II. chronische Parodontitis
- III. aggressive Parodontitis
- IV. Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen
- V. nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- VI. Abszesse des Parodonts
- VII. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen
- VIII. entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände

Die gingivalen Erkrankungen werden in Plaque-induzierte und nicht-Plaque-induzierte Gingivopathien unterteilt. Bei den Plaque-induzierten Gingivopathien unterscheidet man zusätzlich rein-Plaque-induzierte Gingivopathien von solchen,

die systemisch verstärkt werden, entweder durch endokrine Faktoren wie Pubertät, Menstruation oder Diabetes mellitus, oder im Zusammenhang mit hämatologischen Störungen, wie Leukämie, stehen. Außerdem können Plaque-induzierte Gingivopathien durch Medikamente verstärkt oder durch Fehl- und Mangelernährung beeinflusst werden.

Die nicht-plaque-induzierten Gingivopathien werden unterteilt in Erkrankungen, die mit spezifischen bakteriellen Infektionen, Viruserkrankungen oder Pilzinfektionen assoziiert sind. Auch sind Gingivopathien genetischen Ursprungs in dieser Klassifikation berücksichtigt. Einen großen Teil der nicht-Plaque-induzierten Gingivopathien nehmen die Manifestationen systemischer Erkrankungen ein. Daneben existieren Gingivopathien durch traumatische Läsionen, Fremdkörperreaktionen und anderweitig nicht spezifizierte Einflussfaktoren.

Die Parodontitis wird in eine chronische und eine aggressive Form unterteilt.

Die chronische Parodontitis macht ca. 90% der Parodontitiden aus (Wolf, Rateitschak, & Rateitschak, 2004) und ist gekennzeichnet durch eine entzündliche, durch bakterielle Beläge verursachte, Erkrankung aller Anteile des Parodonts, d.h. der Gingiva, des Desmodonts, des Wurzelzements und des Alveolarknochens, mit fortschreitendem Verlust an Stützgewebe (Hellwig, Klimek, & Attin, 2010, p. 502). Sie tritt hauptsächlich bei Erwachsenen ab dem 30. Lebensjahr auf, kann aber auch bei Kindern und Jugendlichen beobachtet werden. Sie wird in eine lokalisierte und eine generalisierte Form unterteilt. Die lokalisierte Form betrifft weniger als 30%, die generalisierte Form betrifft mehr als 30% aller Zahnseiten. Außerdem wird zwischen einer leichten (1-2 mm klinischer Attachment-Loss (KAL)), mittleren (3-4 mm KAL) und schweren (≥ 5 mm KAL) Form der chronischen Parodontitis unterschieden.

Die Krankheit zeigt eine langsame und mäßige Progression und verläuft mit schubweiser Destruktion des Zahnhalteapparates (Hellwig et al., 2010, p. 503). Klinische Zeichen sind gingivale Entzündungen, Plaqueansammlungen, parodontale Taschen mit subgingivalen Konkrementen und ein zumeist horizontaler Knochenverlust der mit lokalisierten vertikalen Einbrüchen vergesellschaftet sein kann. Mikrobiologisch zeigt sich eine variable Keimflora (Rateitschak, Rateitschak, & Wolf, 2004, p. 96).

Die aggressive Parodontitis hingegen macht nur 5-10% der Parodontopathien aus (Rateitschak et al., 2004, p. 95) und ist durch eine schwere parodontale Zerstörung mit raschem Attachmentverlust gekennzeichnet. Sie wird ebenfalls in eine generalisierte und eine lokalisierte Form unterteilt. Auch hier gilt eine Beteiligung von weniger als 30% der Zahnflächen als lokalisierte Form, wohingegen mehr als 30% als generalisierte Form eingestuft werden. Die generalisierte Form tritt häufig vor dem 35. Lebensjahr auf und kann aus einer aggressiven lokalisierten Form entstehen. Es sind mindestens 3 Approximalräume vom Attachmentverlust betroffen die nicht an den ersten Molaren oder den Inzisivi liegen. Im Gegensatz dazu beschränkt sich die lokalisierte aggressive Parodontitis vornehmlich auf die mittleren Inzisivi und den ersten Molaren. Sie tritt während der Pubertät zwischen dem 10. und 13. Lebensjahr auf (Hellwig et al., 2010, p. 504).

Generell kann bei der aggressiven Parodontitis eine familiäre Häufung beobachtet werden, was die Vermutung erlaubt, dass es genetische Prädispositionen gibt (Hellwig et al., 2010, p. 504f). Bei der mikrobiologischen Untersuchung zeigt sich eine variable Mikroflora, die vor allem aber durch *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) und *Porphyromonas gingivalis* (P.g) bestimmt ist. Außerdem zeigen sich häufig abnormale Phagozytenfunktionen sowie eine erhöhte Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2) und Interleukin 1 β (IL-1 β) durch hyperresponsive Makrophagen (Armitage, 2004).

Die weitere Einteilung nach Armitage (1999) beinhaltet die Unterteilung der Parodontopathien als Manifestation systemischer Erkrankungen, wie Bluterkrankungen oder genetische Erkrankungen, nekrotisierende Parodontalerkrankungen, Abszesse des Parodonts, Parodontitis im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen sowie entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände, die zum Beispiel auf Restaurationen oder die Zahnanatomie zurückzuführen sind.

2015 teilte die *American Academy of Periodontology* mit, dass im Jahr 2017 mit einer Nachbesserung dieser Einteilung begonnen wird, die sich im wesentlichen

mit einer zusätzlichen Unterscheidung bezüglich des Attachmentlevels, der Unterscheidung zwischen aggressiver versus chronischer Parodontitis sowie lokalisierter versus generalisierter Parodontitis befassen wird.

1.1.2 Epidemiologie

Parodontitis ist eine Erkrankung die in allen Altersgruppen vorzufinden ist, deren Prävalenz und Schweregrad jedoch mit dem Alter zunimmt.

Die 5. Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) zeigt, dass die Parodontalerkrankungen im Vergleich zur 4. Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS IV) von 2006 rückläufig sind, nachdem sie einen deutlichen Zuwachs zwischen den Erhebungen der 3. und 4. DMS aufwiesen.

So nahm die Zahl der jüngeren Erwachsenen (35 - 44-Jährige), die keine oder eine milde Form der Parodontitis aufwiesen, deutlich von 29,0% auf 48,4% zu (Abb. 2, S. 6). Wohingegen die Zahl der an moderater Parodontitis (Taschensondierungstiefen (TST bzw. PPD) von 3-5 mm) erkrankter jüngerer Erwachsener seit 2006 von 53,6% auf 43,4 % abnahm. Ebenso ging die Zahl der an schwerer Parodontitis (TST \geq 6 mm) erkrankter jüngerer Erwachsener um mehr als die Hälfte von 17,4% auf 8,2% zurück.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Gruppe der jüngeren Senioren (65-74-Jährige, Abb. 3, S. 6). Hier zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Rückgang beim Auftreten der schweren Parodontitis (DMS IV: 44,1%; DMS V: 19,8%). Auch das Auftreten einer moderaten Parodontitis ist in dieser Altersgruppe rückläufig (DMS IV: 47,9%; DMS V: 44,8%). Dennoch weisen mehr als die Hälfte (ca. 65%) der jüngeren Senioren eine parodontale Erkrankung auf.

Bei der Gruppe der älteren Senioren (75-100-Jährige) weisen 9 von 10 Patienten eine moderate bis schwere Form der Parodontitis auf.

Im Gesamtbild ergibt sich zwar ein Rückgang der Parodontitiserkrankungen allerdings steigt der Behandlungsbedarf auf Grund der demografischen Entwicklung prognostisch an.

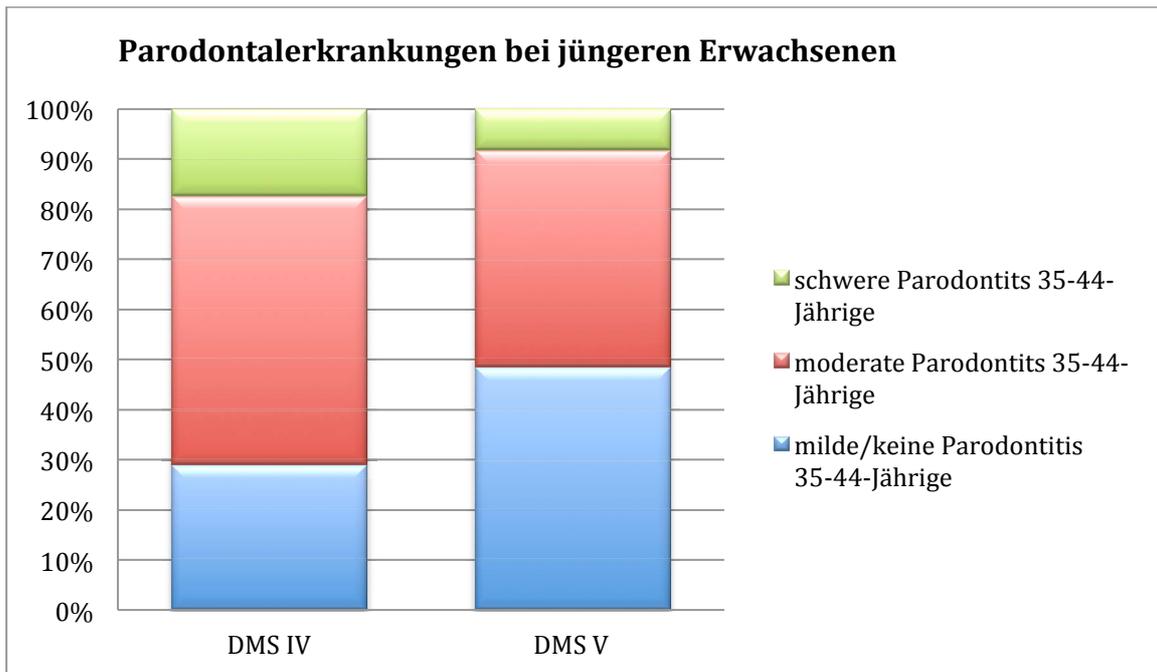


Abb. 2: Parodontale Erkrankungen bei jüngeren Erwachsenen

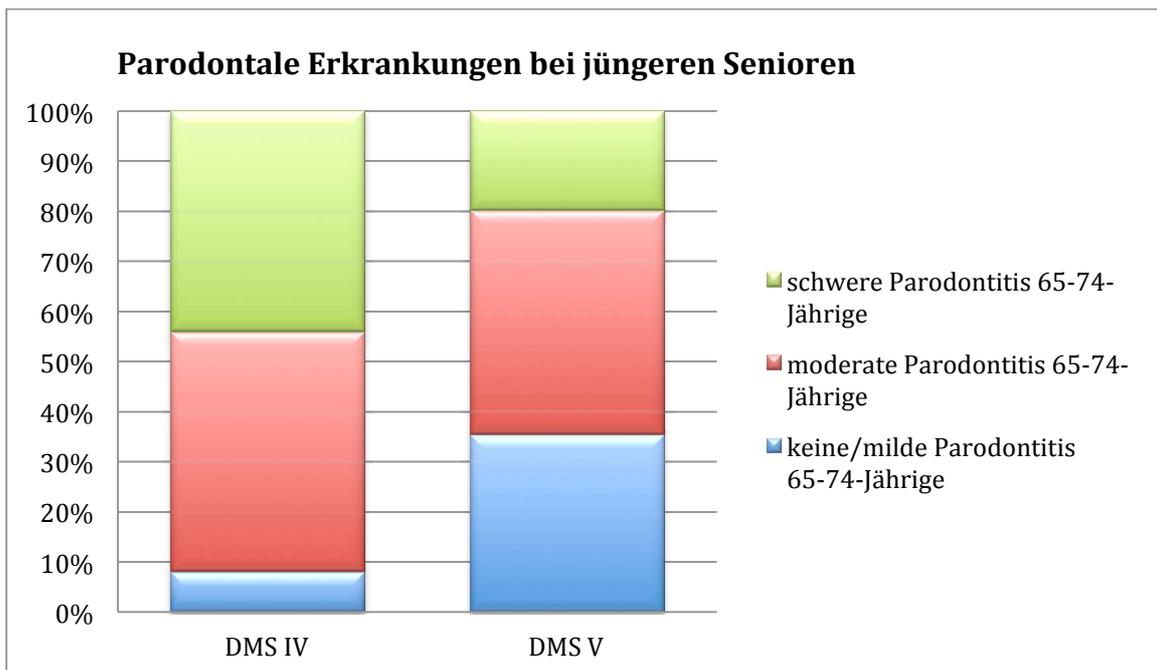


Abb. 3: Parodontale Erkrankungen bei jüngeren Senioren

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Entscheidend für die Entwicklung einer Parodontitis sind die qualitative und quantitative Zusammensetzung der dentalen Plaque (van Winkelhoff, Loos, van der Reijden, & van der Velden, 2002), die individuelle Immunantwort des Wirtes

(Michalowicz et al., 2000), Risikofaktoren wie Rauchen, Stress oder Diabetes mellitus (Van Dyke & Sheiresh, 2005) sowie das soziale Umfeld (Erziehung, Familie), welches zur individuellen Mundhygiene beiträgt (Rateitschak et al., 2004). Im gesunden Organismus besteht ein Gleichgewicht zwischen der Immunantwort des Wirtes und den Mikroorganismen die die Mundhöhle besiedeln. Von den über 19.000 in der Mundhöhle vermuteten Phylotypen (Keijser et al., 2008) tragen nur vergleichsweise wenige zu der Entstehung einer Parodontitis bei (Clark & Loe, 1993). Zu diesen gehören *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a), *Prevotella intermedia* (P.i), *Tannerella forsythensis* (T.f), *Eikenella corrodens* (E.c), *Treponema denticola* (T.d) und *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) (Haffajee & Socransky, 1994; Socransky, Haffajee, Cugini, Smith, & Kent, 1998; van Winkelhoff et al., 2002). Das Vorhandensein dieser Keime bedingt jedoch nicht zwangsläufig die Entstehung einer Parodontitis, denn bei 20-40% der parodontal gesunden Patienten können diese Keime ebenfalls nachgewiesen werden (Ximenez-Fyvie, Haffajee, & Socransky, 2000). Sie gelten als Risikofaktoren für die spätere Entstehung einer Parodontitis.

Grundlage für eine Parodontitis ist eine Plaque-assoziierte Gingivitis (Clark & Loe, 1993). Die Plaque-bedingte Entzündung des Parodonts vollzieht sich dann in 4 Phasen (Page & Schroeder, 1976):

- initiale Phase
- frühe Phase
- etablierte Phase
- fortgeschrittene Läsion

Die initiale Läsion entwickelt sich dabei innerhalb von 2-4 Tagen und stellt die klinische Manifestation einer akuten Gingivitis dar. Abhängig von der Virulenz der parodontopathogenen Keime in der supragingivalen Plaque setzen diese Entzündungsmediatoren und Enzyme frei (Darveau, Tanner, & Page, 1997) und es kommt zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion mit Erhöhung der Gefäßpermeabilität, einer ödematös-entzündlichen Schwellung der Gingiva, einem erhöhten Flüssigkeitsexsudat, einem Auftreten von Serumproteinen, speziell Fibrin, im Gingivaexsudat, einer Auflockerung des Saumepithels und einem Abbau des perivaskulären Kollagens. Diese Phase ist durch entsprechende Mundhygienemaßnahmen noch vollständig reversibel.

Die frühe Läsion entwickelt sich innerhalb der ersten 14 Tage. Hier finden sich unter anderem vermehrt Abwehrzellen im Infiltrat des gingivalen Bindegewebes, Kollagenverluste und eine beginnende Proliferation des Saumepithels in das lateral gelegene Bindegewebe.

Im weiteren Verlauf entwickelt sich eine etablierte Läsion, die durch eine Dominanz von B-Lymphozyten, das Auftreten von extravaskulären Immunglobulinen, die nahezu vollständige Auflösung des gingivalen Stützgewebes und eine apikal gerichtete Proliferation des Saumepithels gekennzeichnet ist. Diese Phase scheint bei optimaler Mundhygiene noch reversibel zu sein (Hellwig et al., 2010, p. 457).

Die Phase der Destruktion des Parodonts wird als fortgeschrittene Läsion bezeichnet. Hier kommt es nicht mehr zur *restitutio ad integrum*. Diese Phase ist vor allem durch Knochenabbau gekennzeichnet. Außerdem schreitet der Kollagenverlust voran und es kommt zum fibrösen Umbau der umgebenden Gingiva. Es bildet sich eine parodontale Tasche aus und es kommt zu ausgedehnten entzündlichen und immunologischen Gewebereaktionen.

Generell betrachtet bedingt die Abwehrreaktion des Wirtes eine Freisetzung von lytischen Metallomatrixproteinase (MMPs) und katabolen Entzündungsmediatoren wie IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ und PGE2 (Gemmell, Marshall, & Seymour, 1997; Kornman, Page, & Tonetti, 1997; Reynolds & Meikle, 1997). Diese führen unter anderem zu einer Erhöhung der Osteoklastenaktivität und damit Förderung des Knochenabbaus.

Der Knochenabbau wird also nicht allein durch parodontopathogene Keime und deren Virulenzfaktoren hervorgerufen, sondern ist ebenso auf die Immunantwort des Wirtes zurückzuführen.

1.1.4 *Porphyromonas gingivalis*

P.g. ist ein anaerobes, gram negatives Stäbchen-Bakterium, welches zusammen mit *Treponema denticola* und *Tannerella forsythensis* den „roten Komplex“ der parodontopathogenen Keime bildet.

Socransky et al. (1998) teilten die parodontopathogenen Keime je nach ihrer Pathogenität in unterschiedliche Komplexe ein. Als Frühbesiedler haben die Keime des „violetten Komplexes“ (*Veillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*)

ein relativ geringes parodontopathogenes Potential. Sie sind dennoch von hoher Wichtigkeit, da sie den Sulkus als erstes besiedeln und somit den initialen Biofilm bilden. Die Bakterien des „orangenen Komplexes“ bilden die Brücke zwischen den wenig pathogenen und hoch pathogenen Keimen. Zu diesem Komplex zählen unter anderem *Prevotella intermedia*, *Camphylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, und *Fusobacterium nucleatum*. Sie setzen Toxine und Enzyme frei, welche die Pathogenität dieser Keime im Vergleich zu denen des „violetten Komplexes“ erhöhen. Diese Keime sind verantwortlich für voranschreitenden Attachmentverlust und schaffen ein anaerobes Milieu, in dem sich die hochpathogenen Keime des „roten Komplexes“ vermehren können. Die Keime des „grünen Komplexes“ (*Eikenella corrodens*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und andere) sind fakultativ anaerob und gelten, bis auf *A.a.* als moderat pathogen. werden *Actinomyces*-Spezies dem blauen Komplex und *Streptococcus*arten dem gelben Komplex zugeordnet.

Der „rote Komplex“ weist die höchste Pathogenität der mit Parodontitis assoziierten Keime auf (Socransky et al., 1998).

P.g. ist einer der Leitkeime der Parodontitis und wird häufiger in parodontalen Taschen als an parodontal gesunden Stellen gefunden (Hellwig et al., 2010).

P.g. lässt sich bei bis zu 80% der parodontal erkrankten Patienten sowie bei 25% der klinisch nicht an Parodontitis erkrankten Patienten nachweisen (Griffen, Becker, Lyons, Moeschberger, & Leys, 1998). Außerdem ist er, genau wie die anderen parodontopathogenen Keime, nicht nur in parodontalen Taschen sondern auch in der supra- und subgingivalen Plaque, der Mundschleimhaut, den Tonsillen, der Zunge und dem Speichel nachweisbar (Beikler et al., 2004; Henderson, 2002). Außerdem findet sich *P.g.* in nekrotischen Wurzelkanälen und infizierten Pulpae (Gomes et al., 2005).

Besonders häufig tritt *P.g.* in fortgeschrittenen Läsionen der chronischen und aggressiven Parodontitis auf (siehe Abb. 4, S. 10)

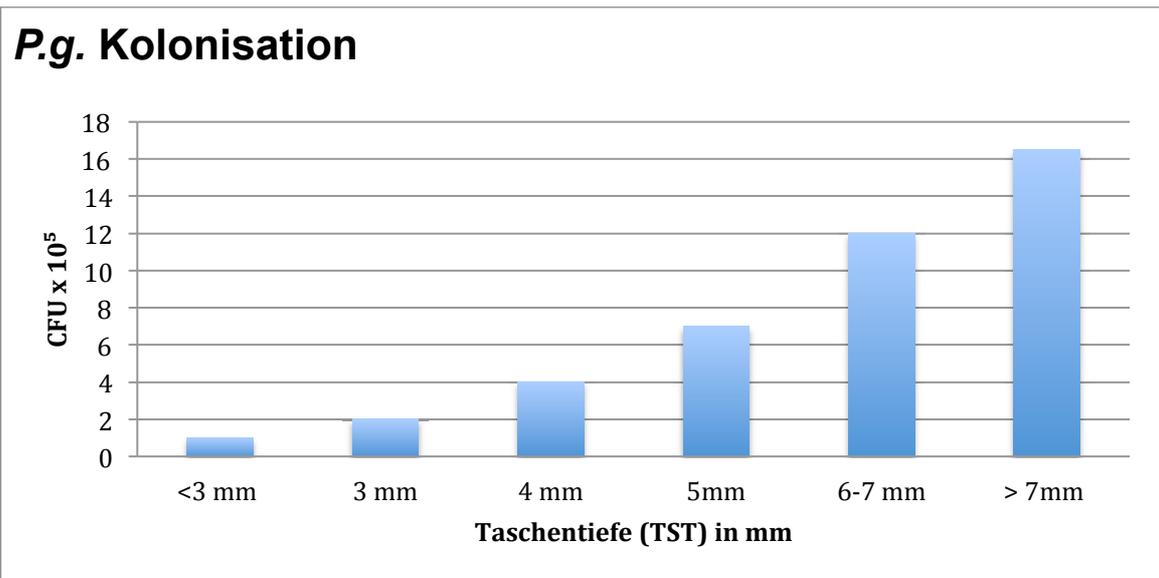


Abb. 4: P.g. Kolonisation in Abhängigkeit von der Taschentiefe (TST) in mm (modifiziert nach (Rateitschak et al., 2004, p. 36))

P.g. ist ein opportunistischer, kommensaler Mikroorganismus der Mundhöhle (Enersen, Olsen, Kvalheim, & Caugant, 2008; Lamont & Jenkinson, 1998; Yilmaz, 2008) von dem eine Vielzahl verschiedener Genotypen bekannt sind, die sich in der Ausbildung verschiedener Virulenzfaktoren unterscheiden (Brunner et al., 2010; Hajishengallis, 2009).

Virulenzfaktoren die dazu beitragen, dass *P.g.* eine variable Pathogenität aufweist sind unter anderem Fimbrien und andere äußere Membranproteine wie *ragA* und *ragB*, Trypsin-ähnliche Cysteinproteasen (sogenannte Gingipaine), Kollagenasen, Lipopolysaccharide (LPS) und Hämagglutine (Nagano et al., 2007; Rateitschak et al., 2004).

Sobald *P.g.* in die Mundhöhle gelangt ist, adhärert es dort mit Hilfe von Fimbrien. Fimbrien sind Ausstülpungen der Zellwand mit einer Länge von 0,3 – 3µm die in fast allen *P.g.*-Stämmen vorzufinden sind (Lamont & Jenkinson, 1998). Sie binden über Adhäsion-Proteine an homologe Rezeptoren von Speichelproteinen, extrazellulären Membranbestandteilen oder an anderen Bakterien wie *Streptococcus gordonii*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis* und *S. crista*, die wiederum über das Pellikel auf den Zahnoberflächen anhaften. Auch an später besiedelnde Bakterien wie *T. forsythensis*, *T. denticola* und *Fusobacterium nucleatum* kann *P.g.* über diese Fimbrien adhäreren (Lamont & Jenkinson, 1998).

Zudem besitzen Fimbrien eine hohe antigene Potenz und induzieren die

Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF – α und IL-6.

Ein weiterer Vorteil den *Porphyromonas gingivalis* nutzt ist die Fähigkeit zur Invasion in Epithelzellen (Colombo, da Silva, Haffajee, & Colombo, 2007; Lamont & Jenkinson, 1998). Hierfür binden die Fimbrien an Integrin- $\alpha 5\beta 1$ der Wirtszelle, was zu einer Umstrukturierung des Actin-Cytoskeletts führt und *P.g.* damit ein Eindringen in die Wirtszelle ermöglicht. Dadurch ist *P.g.* vor der unspezifischen Immunabwehr geschützt. Trotzdem könnte die Wirtszelle von zytotoxischen T-Zellen oder natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zerstört werden. Um dies zu vermeiden reguliert *P.g.* die IL-12 Produktion der Makrophagen die zur Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen führen würde (Hajishengallis, 2009). Zudem reguliert *P.g.* die Chemotaxis und nachfolgende Invasion von neutrophilen Granulozyten durch Hemmung der IL-8 Produktion der Saume epithelzellen, was dazu führt, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist die infizierten Zellen zu erkennen und abzutöten (Darveau et al., 1997). Zusätzlich fördert *P.g.* sein Überleben indirekt, indem es die Apoptose seiner Wirtszelle inhibiert (Nakhjiri et al., 2001).

Ein weiterer Adhäsions- und Virulenzfaktor sind Hämagglutinine, die die Anhaftung des Bakteriums an die Wirtszelle erleichtern und zu einer Verklumpung der Erythrozyten führen (Hämagglutination). Dies führt zur Acquisition des für *P.g.* lebenswichtigen Wachstumsfaktors Häm (Y. Shi et al., 1999). Das darin enthaltene Eisen (Hämin) ist ein obligater Wachstumsfaktor für nahezu alle Bakterien und wird aus Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom C der befallenen Wirtszelle und Erythrozyten gewonnen. Es führt auch zu optimalen Milieuverhältnissen, da durch die Bindung von Sauerstoff ein anaerobes Milieu aufrechterhalten wird. Eine vermehrte Gingivablutung im Rahmen einer Gingivitis beziehungsweise Parodontitis führt also zu einer erhöhten Häminkonzentration und fördert somit das Überleben von *P.g.* (Lewis, 2010).

Auf Grund seines asaccharolytischen Stoffwechsels nutzt *P.g.* Proteine zur Energiegewinnung. Diese werden durch Proteasen gespalten. Die protheolytische Aktivität wird zu 85% von Arginin- und Lysin-Gingipain ausgemacht (Potempa, Pike, & Travis, 1997), welche einen weiteren wichtigen Virulenzfaktor von *P.g.* darstellen, denn sie spalten nicht nur Proteine zur

Energiegewinnung sondern vermitteln auch die Adhäsion an Epithelzellen (Chen, Nakayama, Belliveau, & Duncan, 2001). Außerdem aktivieren sie das Kallikrein/Kinin-Systems, Metallomatrixproteinasen und bestimmte Cytokine, was zu einer Dysregulation der lokalen entzündlichen Reaktion führt (Potempa, Banbula, & Travis, 2000).

Hinzu kommt, dass *P.g.* eine Kapsel besitzt in welcher Lipopolysaccharide (LPS) enthalten sind. Dies sind Endotoxine, welche die Membran relativ undurchlässig (z.B. für Antibiotika) machen und Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen stimulieren, was zur Freisetzung spezifischer Cytokine, Proteine, Sauerstoffradikale und bioaktiver Lipide führt. Zudem wird das Komplementsystem aktiviert. Jede gram negative Bakterienspezies hat spezifische LPS, die zusätzlich zu den oben genannten Eigenschaften toxisch sind. Verantwortlich für deren Toxizität ist das Lipid A, welches in der äußeren Membran der Kapsel des Bakteriums verankert ist (Rateitschak et al., 2004). Außerdem regen die LPS Makrophagen direkt zur Produktion von Vorstufen der Metallomatrixproteinasen (Pro-MMP) an. MMPs sind substratspezifische Endopeptidasen, die durch Spaltung von Peptidbindungen in der Lage sind verschiedenen Strukturen wie Kollagen, Laminin und Fibronectin, aber auch extrazelluläre Matrix zu spalten. Zur parodontalen Zerstörung tragen MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 und MMP-13 bei. *P.g.* fördert die Freisetzung und Aktivierung bestimmter MMPs aus Fibroblasten, zudem inhibiert es den Gegenspieler TIMP-1 (tissue inhibitor of MMP), was dazu führt, dass humane Fibroblasten ihre Fähigkeit zum Kollagenabbau steigern (Zhou & Windsor, 2006).

Auch äußere Membranproteine wie RagA und RagB sind wichtige Virulenzfaktoren von *P.g.*. Nagano et al. zeigten, dass die Gene PG0185 (*ragA*) und PG0186 (*ragB*) für die äußeren Membranproteine RagA und RagB codieren. Nagano et al. (2007) konnten zeigen, dass Mutanten, die keines dieser beiden Gene aufwiesen weniger schnell wachsen und somit weniger virulent sind als der Wildtyp (X. Shi et al., 2007). Dies führte zu der Vermutung, dass RagA und RagB einen Einfluss auf den Transport von Makromolekülen wie Peptiden haben, sodass Keime, denen diese Oberflächenmoleküle fehlen auf Grund der geringeren Substratzufuhr langsamer wachsen (Curtis, Slaney, Carman, & Johnson, 1991; Hall et al., 2005).

Alle diese Virulenzfaktoren führen zu einer hohen Pathogenität von *Porphyromonas gingivalis*, welche eine vermehrte Entzündungsreaktion, Blutungsneigung, Gingivaschwellung und Knochenabbau zur Folge hat.

1.1.5. Therapie

Nach heutigem Wissensstand ist eine vollständige Ausheilung einer Parodontitis im Sinne einer *restitutio ad integrum* nicht möglich. Das Ziel einer Parodontitistherapie ist daher eine Stagnation bzw. Verlangsamung des Knochenabbaus. Dies wird in der konventionellen Therapie durch ein mechanisches supra- und subgingivales debridement in einem an den Krankheitsverlauf angepassten Recallintervall und eine Mundhygieneinstruktion des Patienten gewährleistet.

Die Entfernung der harten und weichen Beläge führt zu einer quantitativen Reduktion und in geringem Maße positiven qualitativen Veränderung der subgingivalen parodontopathogenen Keime (Haffajee et al., 1997). Diese Veränderung ist jedoch nicht von Dauer. Die Zeitspanne bis zur Rekolonisation mit der gleichen Mikroflora wie vor der Initialbehandlung ist von der Schwere der Erkrankung sowie der nachfolgenden unterstützenden Parodontitistherapie abhängig. Mundhygieneinstruktion und Motivation des Patienten erwiesen sich als förderlich für die Schaffung plaquefreier Zonen bis maximal 3mm subgingival und damit einer Reduktion einer Gingivitis. Jedoch sind tiefere subgingivale Taschen für den Patienten nicht erreichbar und lediglich durch eine professionelle subgingivale Reinigung, die in einem an die Krankheitsschwere angepassten Zeitintervall stattfinden muss, zu therapieren (Petersilka, Ehmke, & Flemmig, 2002).

Unterstützend können desinfizierende Substanzen wie Chlorhexidindigluconat oder ätherische Öle benutzt werden (Beikler, Karch, & Flemmig, 2003; Darby, 2009).

Zusätzlich zu der mechanischen Reinigung ist es in schweren Fällen sinnvoll eine zusätzliche antibiotische Behandlung durchzuführen. Hierzu sollte vorher ein Keimtest gemacht werden, um ein Antibiotikum auswählen zu können, welches an das Keimspektrum angepasst ist und eine Gabe von Breitbandantibiotika weitgehen zu vermeiden. Auf Grund der oftmals nicht notwendigen, aber

dennoch erfolgten antibiotischen Behandlung konnte in den letzten Jahren eine Zunahme von multiresistenten Keimen beobachtet werden, die zunehmend zu einem Problem werden (Hawkey, 1998; Levin & Rozen, 2006). Auch im Rahmen der mit Parodontitis assoziierten Keime konnten in den letzten Jahren die ersten Resistenzen nachgewiesen werden (Ardila, Granada, & Guzman, 2010; Walker, 1996).

Abhängig von der Tiefe und Lokalisation der Zahnfleischtaschen bietet sich häufig auch eine chirurgisch resektive oder regenerative Therapie an, die die Reinigungsmöglichkeiten des Patienten und des Behandlers verbessert und somit zu einer Reduktion der Plaqueakkumulation führt. Trotzdem ist eine Eradikation der parodontopathogenen Keime nicht möglich (Teles, Haffajee, & Socransky, 2006). Deshalb sind eine kontinuierliche Nachsorge mit supra- und subgingivaler Reinigung, sowie eine gute Compliance des Patienten essentiell um eine Stagnation des Knochenabbaus zu erreichen und somit einen Zahnverlust zu vermeiden.

1.2 Fragestellung und Zielsetzung

Im Jahr 2011 untersuchten Dolgilevich et al. die genetischen Variationen zwischen einem invasiven und dem bis dato einzig nicht-invasiven *P.g.*-Stamm (AJW4) und fanden heraus, dass eine Korrelation zwischen der Invasionsfähigkeit und dem Vorhandensein der Virulenzfaktoren PG0186, PG0185 und PG0982 besteht (Dolgilevich, Rafferty, Luchinskaya, & Kozarov, 2011). Zusätzlich untersuchten sie 11 klinische Isolate auf das Vorhandensein dieser Sequenzen. Von diesen 11 Proben waren 10 Proben positiv.

Das Ziel dieser Studie ist es nun zu überprüfen, ob diese hypothetischen Virulenzfaktoren *in vivo* das Auftreten einer Parodontitis begünstigen und die Eradikation von *P.g.* oder den klinischen Therapieverlauf beeinflussen.

Hierzu werden 2 Patientengruppen aus vorhanden Proben einer Longitudinalstudie generiert. Die erste Gruppe wird von Patienten gebildet, bei welchen *P.g.* im Laufe der Parodontitistherapie eliminiert werden konnte. Die zweite Gruppe wird von Probanden gebildet, bei welchen der Keim nicht eliminiert werden konnte.

Zusätzlich wird eine Probandengruppe untersucht, die *P.g.* aufweist, klinisch jedoch nicht an einer Parodontitis erkrankt ist.

Bei allen Patientenproben wird molekularbiologisch untersucht, ob die Sequenzen, die für die Gene PG0185, PG0186 und PG0982 kodieren im Genom des jeweiligen *P.g.* enthalten sind oder nicht.

Diese Ergebnisse werden statistisch ausgewertet, um so eine Aussage treffen zu können, ob diese genetischen Variationen die Virulenz von *P.g.* beeinflussen.

Zusätzlich werden 3 Genotypen der Isolate dieser Longitudinalstudie auf ihr Invasionsverhalten hin untersucht. Einer der Keime trägt PG0185, PG0186 und PG0982, einer trägt nur den Faktor PG0982 und einer trägt keinen der 3 untersuchten Faktoren.

Der Arbeit wird folgende Hypothese zu Grunde gelegt:

die Virulenz von *Porphyromonas gingivalis* korreliert mit Polymorphismen in den Genen PG0185, PG0186 und PG0982, so dass diese

- das Risiko an einer Parodontitis zu erkranken erhöhen
- und/oder den Keim therapieresistenter machen.

2. Material und Methode

2.1 Studiendesign

Die folgende Arbeit basiert auf Proben, die in der Westdeutschen Kieferklinik im Rahmen der prospektiven Longitudinal-Studie *MURIS* („multiple-risk-Studie“) der Poliklinik für Parodontologie der Universität Münster von 2001-2005 gesammelt wurden. Diese Studie wurde von der Ethikkommission (Reg.Nr.:1VBei) genehmigt und lief über einen Zeitraum von 5 Jahren.

2.2 Probanden

In der *MURIS*-Studie wurden 165 an chronischer oder aggressiver Parodontitis erkrankte Patienten über einen Zeitraum von bis zu 4 Jahren untersucht und behandelt. Die Untersuchungszeitpunkte wurden mit V1 (1. Screeningvisit) bis Vx (letzter Screeningvisit) bezeichnet, fanden anfangs alle 3 Monate und nach einem Jahr alle 6 Monate statt.

Im Zuge dieser Studie wurden bei allen Patienten an allen vorhanden Zähnen die Blutung auf Sondierung (BOP) an jeweils 6 Stellen pro Zahn (mesiobukkal, bukkal, distobukkal, mesiooral, oral und distooral) dichotom bestimmt. Außerdem wurden die Taschensondierungstiefen (PPD in mm) ebenfalls an den oben genannten 6 Stellen pro Zahn gemessen. Bei jedem Termin wurden supra- und subgingivale Plaqueproben, Gingivalflüssigkeit, Speichelproben und Mukosaabstriche von Wangen, Tonsillen und Zunge entnommen. Es wurden Proben zur Kultivierung, Anzucht und Archivierung von Isolaten aus jeder *P.g.* positiven Probe erstellt.

2.2.1 Einschlusskriterien

Einschlusskriterien der *MURIS*-Studie waren:

- 6 – 80 Jahre
- Diagnose der aggressiven oder chronischen Parodontitis
- unbehandelte Parodontitis
- keine Infektionskrankheit
- kein erhöhtes Risiko an einer Endokarditis zu erkranken
- keine Antibiotikaeinnahme in den letzten 6 Monaten vor Studienbeginn

- keine regelmäßige Dialyse
- keine Medikamenteneinnahme, die Einfluss auf immunologische Parameter hat
- kein Zustand nach Organtransplantation
- keine vererbten oder erworbenen Blutkrankheiten
- keine Schwangerschaft und Stillzeit
- keine mentale oder physische Retardierung

Für die vorliegende Arbeit wurden 2 Patientengruppen aus dieser Studie generiert.

Einschlusskriterien der Gruppe 1 waren (n=6):

- Aufweisung des *P.g.* in V1
- Eradikation von *P.g.* am Ende des Untersuchungszeitraums
- Der Patient wurden über einen Zeitraum von mindestens 2 Jahren behandelt.

Einschlusskriterien der Gruppe 2 waren (n=22):

- Aufweisung des *P.g.* in V1
- Kontinuierliches Auftreten des *P.g.* an den folgenden Kontrollterminen.
- Der Patient wurden über einen Zeitraum von mindestens 2 Jahren behandelt.

Als Vergleichsgruppe wurden am UKD Probanden rekrutiert die *P.g.* positiv und parodontal gesund waren (n=34). Auch diese Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt (Studienr. 3786).

2.2.2 Ausschlusskriterien

Alle Patienten, die die Einschlusskriterien nicht erfüllten, wurden von der *MURIS*-Studie ausgeschlossen.

Ausschlusskriterien für die in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten Patientenproben waren des Weiteren:

- unregelmäßiges Auftreten des *P.g.*
- Probanden die weniger als 2 Jahre behandelt wurden.

2.3 Mikro- und molekularbiologische Methoden

2.3.1 Anzucht der Keime

Im Zuge der *MURIS*-Studie wurden den Patienten subgingivale Plaqueproben entnommen. Dazu wurden sterile Papierspitzen in die jeweils tiefste Tasche eines Sextanten eingelegt und 10 Sekunden dort belassen. Anschließend wurden sie in 25 %iger Ringer Lösung (8,6 g/l NaCl, 0,33 g/l CaCl x 2 H₂O, 0,3 g/l KCl) suspendiert und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf Blutplatten ausplattiert. Nach 1 Woche in der Anaerobierkammer wurden *P.g.*-Kolonien gepickt und weiter isoliert. Die gesammelten Isolate wurden in einer Stammsammlung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die vorliegende Arbeit wurden diese Isolate erneut angezüchtet.

Hierfür wurde ein Anaerobier-Blut-Agar nach dem Rezept des CDC (centre of disease control) (Rezeptur siehe Tabelle 1) hergestellt.

Tabelle 1: Rezeptur Anaerobier-Blut-Agar nach CDC

Zusammensetzung	g/L
Pepton aus Casein (Becton Dickinson, Art.-Nr. 4311921)	15,0
Pepton aus Sojamehl (Oxoid, Art.-Nr. LP 0044)	5,0
Hefeextrakt (Merck, Art.-Nr. 1.03753.0500)	5,0
Natriumchlorid (Sigma, Art.-Nr. S-9625)	5,0
L-Cystein-HCL (Fluka Analytica, Art.-Nr. 30129)	0,5
Agar-Agar (Merck, Art.-Nr.1.01614)	16,0
Hemin-Stammlösung *	10,0 ml
Vitamin K1-Stammlösung **	1,0 ml
Aqua dest.	950,0 ml
Defibriniertes Schafblut (WDT)	50,0 ml

*Rezept für die Hemin Stammlösung: 50 mg Hemin (Fluka, Art.-Nr. 51280) in 1 ml 1N NaOH lösen und 100 ml Aqua dest. hinzugeben

**Rezept für die Vitamin K1-Stammlösung: 100µl Vitamin K1 (Sigma, Art -Nr. V.3501) in 9,9 ml 96 %igem Alkohol lösen, Vitamin K1 und Alkohol bei 56 °C im Wasserbad erwärmen

Alle Bestandteile, außer Blut, wurden vermengt und der Agar anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 48 °C wurde das Blut hinzugegeben.

Um eine etwaige Kontamination auszuschließen wurde der Flaschenhals vor dem Gießen des Agars in Petrischalen abgeflammt und zusätzlich in der Sicherheitsbank (Microflow biological safety, Astec, Hampshire, UK) gearbeitet.

Vor Gebrauch wurden die Platten für 12 Stunden in der Anaerobierbank (Whitley A35 anaerobic workstation, Don Whitley Scientific, West Yorkshire, UK) reduziert. Daraufhin erfolgte die Anzucht der Keime.

Die im Stickstoff lagernden *P.g.*-Isolate wurden für 2 Minuten bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und anschließend gevortext (Vortex Genius 3, OKA Werke, Staufen, Deutschland). Daraufhin wurden 50 µl auf die Platten pipettiert und ein 3-Ösen Ausstrich gemacht. Die Agarplatten wurden bei 37 °C in der Anaerobierbank für 7 Tage inkubiert.

Zeigte sich nach 7 Tagen ein ausreichendes Keimwachstum auf den Agarplatten, wurde dieses mit 1 ml Ringerlösung (8,6 g/l NaCl, 0,33 g/l CaCl x 2H₂O, 0,3 g/l KCl) abgeschwemmt und mit einem sterilen Spatel (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Abschließend wurde das Gemisch mit einer Pipette aufgesogen und in ein Eppendorf Tube (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) pipettiert.

2.3.2 DNA Isolation

Für die Isolation der DNA aus den angezüchteten Bakterienisolaten wurde das innuPREP DNA Mini Kit (analytikjena AG, Jena, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Von den gesunden Kontrollpersonen wurde die DNA aus Plaueproben isoliert.

2.3.3 Primer Auswahl

Auf Grundlage vorangegangener Forschung (Dolgilevich et al., 2011) wurden 3 Gene ausgewählt: PG0185, PG0186 und PG0982.

Für die vorliegende Studie wurden die Primer bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) leicht verändert zu den Sequenzen von Dolgilevich et al. (Dolgilevich et al., 2011) synthetisiert (Sequenzen siehe Tab. 2, S. 20).

Um die optimalen PCR-Bedingungen dieser Primer herauszufinden wurden die Primerpaare mit 1,5 und 2,5 mM Magnesiumchlorid in einem Gradienten von 50-70 Grad Celsius (°C) getestet. Es ergaben sich optimale Annealing

Temperaturen von 58 °C für PG0185, 51 °C für PG0186 und 55 °C für PG0982, jeweils mit 1,5 mM MgCl₂.

Tabelle 2: Primertabelle

Primer	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon	PCR *
PG0185	5'-TTTGCCTGAACACAGAGTCG-3'	5'-GACTGCTTTTCCCACGAGAG-3'	369 bp	58 °C 35 Zyk.
PG0186	5'-GGAAGCTGCGTTGCAGAATCAAG-3'	5'-GCATCTGCTGCACCAATCAAAGG-3'	433 bp	51 °C 40 Zyk.
PG0982	5'-GACGGTAAATTCGCCCATGCG-3'	5'-GGGCTGAAAGAGGTTGTTCTCC-3'	656 bp	55 °C 35 Zyk.
PG16S	5'-AGGCAGCTTGCCATACTGCG-3'	5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3'	404 bp	60 °C 35 Zyk.

* PCR-Bedingungen in Grad und Anzahl der Zyklen

2.3.4 Speziestest

Um zu gewährleisten, dass es sich bei den Bakterienisolaten um *P.g* handelt, wurde jede DNA mit den spezifischen PG-16S Primern amplifiziert (s. Tab. 2, S. 20), die das 16S-rRNA Gen als Template haben.

2.3.5 PCR

Es wurde folgender Standardansatz verwendet:

Tabelle 3: Standardansatz PCR

Ansatz:		25,0 µl
10 x PCR Buffer	(Qiagen, Hilden, Deutschland)	2,5 µl
Primer F (10 pmol)	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)	1,0 µl
Primer R (10 pmol)	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)	1,0 µl
H ₂ O		16,3 µl
dNTP (100 mM per dNTP)	(dNTP, dNTP-Set 1 (pH 7), Roth, Karlsruhe, Deutschland)	1,0 µl
Ampli-Taq (5 u/µl)	(Qiagen, Hilden, Deutschland)	0,2 µl
DNA		2,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	(Qiagen, Hilden, Deutschland)	1,0 µl

Dieser wurde in Multiply 8er-Strips (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) pipettiert und nach dem unten folgenden Protokoll in einem Thermo-Cycler (S1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) amplifiziert. Bei jeder Reaktion wurde je eine Positiv- und eine Negativkontrolle (no template) mitgeführt.

1. Denaturierung	95 °C	3 min
2. Denaturierung	95 °C	20 s
3. Annealing	51 °C – 60 °C	20 s
	(Temperatur primerabhängig s.o.)	
4. Elongation	72 °C	45 s
5. Ende	12 °C	

Die Schritte 2.- 4. wurden bei PG0185 und PG0982 in 35 Zyklen wiederholt. Für PG0186 wurden die Schritte 2.- 4. 40 mal wiederholt, um eine größere Menge des Produktes zu generieren und somit in der später folgenden Gel-Elektrophorese (s. 2.3.6, S. 23) eine sichere Aussage treffen zu können.

2.3.6 Gel-Elektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung verschieden großer geladener Moleküle, die entlang eines angelegten elektrischen Feldes durch eine Matrix (hier Agarosegel) wandern.

Die Herstellung des 1,5%ige Agarose-Gel erfolgt aus:

- 3,75 g Agarose (Agarose Standard, Roth, Karlsruhe, Deutschland) ad
- 250 ml 1 x TBE Puffer (108 g TRIS PUFFERAN, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 mol EDTA mit pH 8 (93,06 g EDTA ad 500 ml VE-Wasser, pH 8 (Einstellung durch NaOH-Plättchen))

Dieses Gemisch wurde in der Mikrowelle gekocht und zwischendurch umgerührt. Nach vollständiger Lösung des Agarosepulvers im Gemisch wurde gewartet bis dieses auf ca. 50 °C abgekühlt war. Daraufhin wurden 12 µl Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml (\cong 120 µg ad 250 ml Gel) hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung in eine Gelkammer (Sub Cell-GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegossen. Sobald das Gel vollständig abgekühlt war, wurde es aus der Gussform genommen und in die Elektrophoresekammer mit 1 x TBE Puffer gelegt. Daraufhin wurden 25 µl des PCR Produktes mit 5 µl 6 x Ladepuffer (Rezept siehe Tabelle 4) gemischt und davon wiederum 12 µl in die Geltaschen pipettiert.

Tabelle 4: Rezept des Ladepuffers

6 x Ladepuffer	100 ml
1 x TBE	70 ml
Glycerol	30 ml
Bromphenolblau	250 mg

Zusätzlich wurden 8 µl einer DNA-Leiter (FastRuler Low Range DNA- Ladder 50-1500 bp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, U.S.A.) in die erste und die letzte Geltasche gegeben.

Dies ermöglicht die Bestimmung der Größe der PCR Produkte in Basenpaaren im Vergleich zu den Größenstandards die durch die Referenzleiter angezeigt werden.

Abschließend wurden 160 Volt über 45 min angelegt (PowerPac Basic Power Supply, Bio- Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

Die Gelbildentwicklung und –auswertung unter UV-Licht erfolgte in einer Gel Doc XR Workstation (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Die Proben galten als positiv, wenn im Gel bei einer Basenpaargröße von 656 bp (PG0982) bzw. 396 bp (PG0185) und 433 bp (PG0186) eine Bande sichtbar wurde (s. Abb. 5, S. 23).

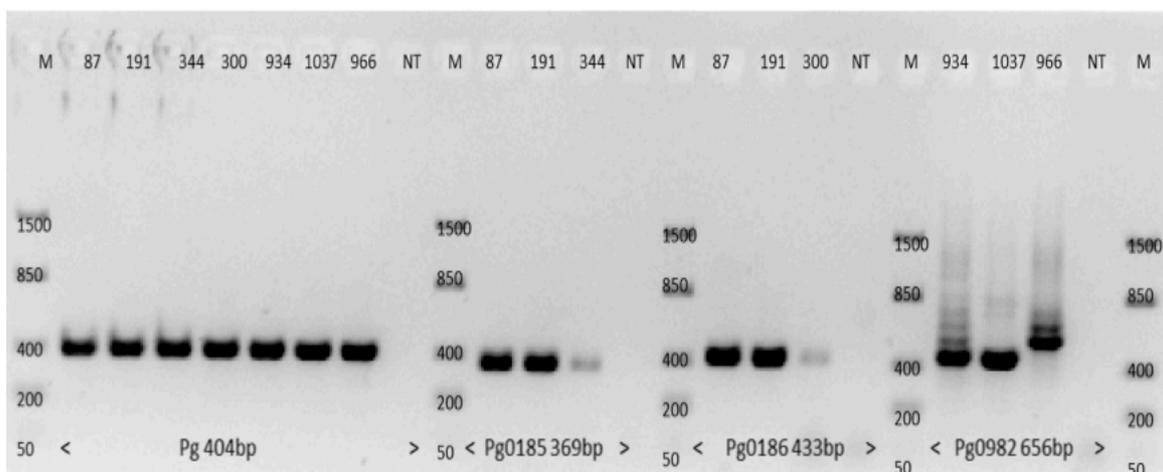


Abb. 5 Gelelektrophorese

2.3.7 Quantitative realtime- PCR

Zur Qualitätssicherung wurde zusätzlich zur PCR eine quantitative realtime-PCR durchgeführt. Diese beruht auf dem gleichen Prinzip wie die PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich eine Quantifizierung der DNA in Echtzeit(=real time). Diese Quantifizierung wird mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung durchgeführt, wobei die Menge der Fluoreszenz proportional zur Menge der amplifizierten DNA zunimmt. Der Fluoreszenzstoff SYBRGreen (Maxima SYBR Green/ Fluorescein qPCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, U.S.A.) lagert sich dabei an doppelsträngige DNA an. Die Zunahme der gebildeten und eingefärbten Ziel-

DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz, welche am Ende der Elongation in jedem Zyklus gemessen wird.

Zur Spezifizierung des Produktes wird im Anschluss an die qrt-PCR eine Schmelzkurve ermittelt, die den jeweils für ein DNA-Produkt spezifischen Schmelzpunkt anzeigt. Der Schmelzpunkt ist die Temperatur, bei der sich die doppelsträngige DNA wieder auftrennt und der Fluoreszenzstoff freigegeben wird. Es kommt so zu einem schlagartigen Abfall der Fluoreszenz. Zur Detektion dieser Änderung wird die Temperatur schrittweise um 0,5 °C von 65 °C auf 95 °C erhöht und nach jeder Temperaturänderung die Fluoreszenz gemessen. Durch den Vergleich der Schmelzkurve mit der Schmelzkurve der Positivkontrolle kann die Spezifität und Reinheit des PCR-Produkts kontrolliert werden.

Es wurde folgender Standardansatz für die qrt-PCR verwendet:

Tabelle 5: Standardansatz quantitative realtime-PCR

Ansatz	20,0 µl
Maxima SYBRGreen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, U.S.A.)	10,0 µl
Primer F (100 pmol) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)	0,5 µl
Primer R (100 pmol) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)	0,5 µl
Uracil-DNA Glykosylase (UNG) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, U.S.A.)	0,5 µl
DNA	1,0 µl
H ₂ O	7,5 µl

Mit Hilfe des CFX 96 RealTime PCR Detection System Thermocycler (Bio- Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde die qrt-PCR durchgeführt:

1. UNG-pre-treatment	50 °C	2 min
2. Initial-Denaturierung	95 °C	10 min
3. Denaturierung	95 °C	15 sec
4. Annealing	60 °C	60 sec
5. Messpunkt	77 °C	1 sec
6. Schmelzkurve	95 °C	10 sec
	65 °C	5 sec
	95 °C	
7. Ende	12 °C	30 sec

Die Schritte 3. – 5. wurden in 40 Zyklen durchgeführt.

Mit Hilfe der Software Bio- Rad CFX Manager 3.0 (Bio- Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurden die Ergebnisse ausgewertet.

2.4 Invasionsversuch

Um herauszufinden, ob die untersuchten Genotypen sich in ihrer Fähigkeit zur Zellinvasion unterscheiden wurde ein Invasionsversuch durchgeführt.

2.4.1 Austestung Antibiotika

Im Vorfeld des Invasionsversuches wurden Versuche durchgeführt um herauszufinden bei welcher Konzentration eine sichere Antibiotikawirkung eintritt. Außerdem sollte überprüft werden, ob die *P.g.*-Stämme die Aufzucht sowie den Wechsel zwischen dem Bakterienmedium Tryptic soy broth (TSB) und dem Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) überleben, oder ob sie anhand der veränderten Nährstoffzusammensetzung der beiden unterschiedlichen Medien absterben. Es wurden Versuche ohne Antibiotikum (AB), mit AB in einer Konzentration von 200 µg/ml sowie mit AB in einer Konzentration von 500 µg/ml durchgeführt.

Stellvertretend für alle MURIS-Proben wurden 3 Wildtypen mit den MURIS-Nummern Pg41 (PG0982 positiv), Pg88 (ohne Virulenzfaktoren) und Pg191 (Träger der Virulenzfaktoren PG0982, PG0186 und PG0185) ausgewählt.

Diese Wildtyp-*P.g.*-Stämme wurden zunächst wie unter 2.3.1 beschrieben auf CDC-Platten angezogen.

Im Anschluss wurde jeweils eine gewachsene *P.g.*-Kolonie von der CDC-Platte abgenommen und in 1 ml Phosphat buffered saline (PBS, Art. Nr. D8537, Sigma Aldrich, St.Louis, USA) resuspendiert um das Medium, in welchem die Zellen gewachsen waren abzuwaschen.

Gleichzeitig wurden 2 Aliquots à 7 ml hergestellt. Ein Aliquot beinhaltete TSB (Zusammensetzung s. Tab. 7, S. 28) inkl. 10 % Fetalem Kälberserum (FKS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), das andere DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium, Art.Nr D8537, Sigma Aldrich, St.Louis, USA) mit 10 % FKS. Diese Medien wurden 24 Stunden in der Anaerobierbank reduziert.

Anschließend wurde eine 6-Well Platte (Ref. 83.3920.300, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) nach folgendem Schema mit jeweils 2 ml TSB bzw. DMEM-Lösung pro Well befüllt.

Tabelle 6: Bestückung der 6-Well-Platte

TSB +10 % FKS + 200 µg/ml Metronidazol	TSB +10 % FKS + 500 µg/ml Metronidazol	TSB +10 % FKS ohne Antibiotikazusatz
DMEM + 10 % FKS + 200 µg/ml Metronidazol	DMEM + 10 % FKS + 500 µg/ml Metronidazol	DMEM + 10 % FKS ohne Antibiotikazusatz

In jedes Well wurden 100 µl *P.g.*-Suspension hinzugefügt.

Anschließend wurde die 6-Well-Platte aerob bei 37 °C im Brutschrank für 2 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 µl aus den Wells abgenommen und in 990 µl PBS (1:100 Verdünnung) aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 100 µl auf CDC-Platten ausplattiert und anschließend in der Anaerobierbank inkubiert. Nach ca. einer Woche wurde das Wachstum beurteilt.

2.4.2 Anzucht der Gingivazellen

Für diesen Versuch wurden die im Stickstoff gelagerten Primärzellen aus Gingivagewebe im Wasserbad bei 37 °C für etwa 2 Minuten aufgetaut.

Das Zellkulturmedium (DMEM) wurde mit 10 % fetalem Kälberserum gemischt und ebenfalls bei 37 °C im Wasserbad vorgewärmt.

Anschließend wurden 1 ml der Primärzellen zu 5 ml des vorgewärmten Medium-FKS-Gemisches in einen 15 ml Falcon pipettiert. Dieses Gemisch wurde bei 500 rounds per minute (rpm) 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Zu dem Zellpellet wurden 5 ml vorgewärmtes Medium-FKS-Gemisch gegeben und vorsichtig mit einer Pipette resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml vorgewärmtes Medium-FKS-Gemisch in eine 75 ml Zellkulturflasche gefüllt und das Medium-FKS-Zell-Gemisch ebenfalls in die Flasche überführt. Diese wurde dann bei 37 °C mit 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von 70-90 % inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, also vom Flaschenboden abgelöst. Hierfür wurden sie zuerst 2 x für 2 Minuten mit 2 ml PBS umspült um das FKS abzuwaschen, welches die Trypsinwirkung hemmt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Austria) von der Flasche gelöst. Die Trypsinlösung wurde im Anschluss durch Zugabe von 10 ml Medium inklusive FKS inaktiviert, der gesamte Flascheninhalt in ein 15 ml-Falcon überführt und bei 500 rpm für 5 min zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand abgesaugt und das übrig gebliebene Sediment in 1 ml Medium (DMEM + 10 % FKS) aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und im Faktor 1:75 verdünnt (1 ml Suspension + 74 ml Medium), damit die Zelldichte pro ml der optimalen Dichte von 5×10^5 zur Einsaat entsprach.

Anschließend wurden je 2 ml dieser Zellsuspension in 3 6-Well-Platten gegeben und 2 Tage bei 37 °C in 10 % CO₂ bebrütet. In dieser Zeit konnten die Zellen absinken, auf dem Boden der Platten adhären und konfluent wachsen.

Die in Stickstoff lagernden *P.g.*-Wildtypstämme mit den MURIS-Nummern Pg88, Pg191 und Pg41 wurden wie unter 2.3.1 beschrieben auf CDC Platten angezüchtet und ca. 7 Tage bei 37 °C anaerob inkubiert.

Anschließend wurden ein bis zwei Kolonien jeden Stammes in 10 ml autoklaviertem flüssigem TSB Medium (s. Tab. 7, S. 28) inkl. 10 % FKS überimpft und bei 37 °C anaerob bis zu einem sichtbaren Wachstum bebrütet.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Bakterienmediums auf 1 Liter Aqua

Zusammensetzung		Menge
TSB	(Fluka Analytical 22092-500G)	30,0 g
Hefeextrakt	(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	5,0 g
Hemin-Stammlösung*		10,0 ml
Vitamin K-Stammlösung**		1,0 ml
L-Cystein-HCL	(Fluka Analytica, Art.-Nr. 30129)	0,5 g

*Rezept für die Hemin Stammlösung: 50 mg Hemin (Fluka, Art.-Nr. 51280) in 1 ml 1N NaOH lösen und 100 ml Aqua dest. Hinzugeben

**Rezept für die Vitamin K1-Stammlösung: 100 µl Vitamin K1 (Sigma, Art -Nr. V.3501) in 9,9 ml 96 % Alkohol lösen, Vitamin K1 und Alkohol bei 56 °C im Wasserbad erwärmen

Mit einem Photometer (SmartSpecPlus Spectrophotometer, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde die Optische Dichte (OD) gemessen und auf 0,5 eingestellt, welches einer Keimzahl von ca. $2,5 \times 10^8$ pro ml entspricht.

Von dieser Suspension wurden 14 ml abgenommen und bei 5000 rpm 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Megafuge 16R Cetrifuge, ThermoScientific, Waltham, USA).

Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 14 ml Zellkulturmedium (DMEM) mit 10 % FKS resuspendiert.

2.4.3 Invasionsversuch von *P.g.* mit und ohne Zugabe von Antibiotika

Pro *P.g.*-Wildtypstamm (Pg41, Pg88, Pg191) wurden 6 Wells benutzt. Aus den jeweiligen Wells, die, wie unter 2.3.8.2 beschrieben, bereits mit Gewebezellen bewachsen waren, wurden 2 ml Zellkulturmedium abgesaugt und durch 2 ml der hergestellten jeweiligen *P.g.*-Suspensionen in Zellkulturmedium ersetzt. Diese Platten wurden daraufhin 1,5 Std bei 37 °C inkubiert und anschließend 2 mal mit jeweils 1 ml PBS gespült um alle *P.g.*-Keime, die nicht in die Zellen invadiert waren oder adhären anhafteten, abzuspülen.

Jeweils 3 von 6 Wells pro Keim wurden mit 1 ml destilliertem H₂O für 20 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden 500 µl der Suspension in

500 µl PBS aufgenommen, gemischt und anschließend je 100 µl unverdünnt, 1:20 sowie 1:400 verdünnt auf CDC-Platten ausplattiert.

Um die adhärenen Keime abzutöten wurden auf die anderen 3 Wells ein Zellkulturmedium inklusive zweier Antibiotika gegeben.

Hierfür wurden die Antibiotika Metronidazol sowie Gentamycin nach folgendem Ansatz benutzt.

Metronidazolstammlösung:

5 g Metronidazolpulver (M3761-5G, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) wurden in 1000 ml Aqua gelöst, dies entspricht 0,5 g in 100 ml H₂O.

Benötigt wurden 200 µg/ml. Um diese Konzentration zu erreichen wurde die Lösung im Verhältnis 1:25 verdünnt (40 µl auf 1 ml Zellkulturmedium).

Gentamycinstammlösung:

Es wurde eine Gentamycinlösung in der Konzentration von 10 mg/ml verwendet (G1272-10ML, Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

Um die benötigte Konzentration von 300 µg/ml zu erlangen wurde die Lösung im Verhältnis 1:33 verdünnt (30,3 µl der Lösung auf 1 ml Zellkulturmedium).

Es wurden 20 ml Medium mit Antibiotikum benötigt. Dies entspricht einer Mischung von 800 µl Metronidazol und 606 µl Gentamycin auf 18,596 ml Medium.

Die so behandelten Wells wurden für 1 h bei 37 °C aerob inkubiert.

Nach der Inkubation wurden diese Wells ebenfalls 2 x mit 1 ml PBS gespült und mit 1 ml H₂O für 20 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Auch von dieser Suspension wurden 500 µl in 500 µl PBS aufgenommen, gemischt und anschließend je 100 µl unverdünnt, sowie in Verdünnungen von 1:10 und 1:100 auf CDC-Platten ausplattiert.

Alle CDC-Platten wurden bei 37 °C anaerob bebrütet und nach 7 Tagen ausgezählt.

2.4.4. Bakterienkontrolle

Außerdem wurde parallel eine Viabilitätskontrolle durchgeführt, indem aus den restlichen Bakteriensuspensionen in Zellkulturmedium inkl. FKS jeweils 100 µl auf einer Platte ausplattiert und bei 37 °C anaerob bebrütet wurden.

2.5 Datenverarbeitung und statistische Analyse

Alle Daten wurden in anonymisierter Form gespeichert, mit Hilfe des Programms Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, W.A., U.S.A.) in tabellarischer Form zusammengefasst und anschließend mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, N.Y., U.S.A.) und unter fachlicher Leitung von Diplompsychologe S. Ullrich, .05 Statistikberatung (Düsseldorf, Deutschland), statistisch ausgewertet.

Klinisch gesunde Patienten wurden der Gruppe „gesund“ zugeordnet. Klinisch erkrankte Patienten wurden den Gruppen 1 und 2 (wie unter 2.2 beschrieben) zugeteilt. Die Untersuchungszeiträume wurden mit V1 (1. Visit) bis V4 (4. Visit) gekennzeichnet.

Für die statistische Auswertung wurden Regressionsanalysen verwendet, da mit deren Hilfe eine Beziehung zwischen einer abhängigen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen errechnet werden können.

Hierbei wurden entweder binär logistische Regressionen zur Vorhersage eines Ereignisses oder lineare Regressionen zur Vorhersage konkreter Werte verwendet.

Signifikanztests wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat- bzw. dem Exakter Test nach Fischer durchgeführt. Hierbei gilt generell eine Grenze der Signifikanzwerte (p-Werte):

$p > 0,05$ = kein signifikanter Effekt

$p \leq 0,05$ = signifikanter Effekt

$0,05 < p < 0,10$ = marginal signifikanter Effekt

Liegt ein marginal signifikanter Effekt vor sollte die Anzahl der Stichproben erhöht werden. Da die Longitudinalstudie bereits abgeschlossen war und es aus diesem Grund nicht möglich war die Anzahl der vorliegenden Patientenproben zu erhöhen, unterscheidet diese Untersuchung nur in signifikante und nicht signifikante Effekte.

3 Ergebnisse

3.1 Demographie

In der vorliegenden Arbeit wurden Proben von 62 Patienten untersucht. Davon waren 34 Patienten klinisch nicht an einer Parodontitis erkrankten jedoch *P.g.* positiv. 28 Patienten waren an einer Parodontitis erkrankt und wurden für die Analyse der Progression in die Untergruppen 1 und 2 unterteilt. Gruppe 1 wurde von 6 Patienten gebildet, bei denen *P.g.* im Laufe der Behandlung eliminiert wurde. Gruppe 2 wurde von 22 Patienten gebildet, bei denen *P.g.* bis zum Ende der Untersuchungen kontinuierlich vorhanden blieb.

Tabelle 8: Demographie und Mittelwerte

	gesund	Gruppe 1	Gruppe 2
Anzahl = N	34	6	22
Frauen	24	2	10
Raucher	4	1	9
Alter in Jahren	42,9	51,5	53,54

Der Altersdurchschnitt der gesunden Patienten betrug 42,9 Jahre, in Gruppe 1 51,5 Jahre, in Gruppe 2 53,54 Jahre.

In Gruppe 1 waren 16,6 % der Patienten Raucher, in Gruppe 2 40,9 %. 11,8 % der parodontal gesunden Patienten rauchten.

Die Anzahl der Frauen betrug in der Vergleichsgruppe der Gesunden 70,59 %, in Gruppe 1 33,33 % und in Gruppe 2 45,45 %.

Zusammenfassend zeigt sich eine deutliche Abweichung in der Geschlechterverteilung und der Raucherzugehörigkeit speziell für die Gruppe 1, da das Merkmal der Gruppendifinition *P.g.*-Eliminierung sehr restriktiv ist und die Gruppe mit 6 Personen entsprechend klein.

3.2 Deskriptive Statistik

3.2.1 Ausgangsbefunde der klinisch erkrankten Patienten

Bei allen Patienten der Versuchsgruppen 1 und 2 (generiert aus der *MURIS*-Studie) wurden BOP und PPD zu jedem Untersuchungszeitpunkt an jeweils 6 Stellen pro Zahn ermittelt (siehe 2.2).

Die Ausgangsbefunde der klinisch erkrankten Patienten (Versuchsgruppe 1 und 2) gliederten sich wie folgt auf:

Tabelle 9: Ausgangsbefunde der klinisch erkrankten Patienten

	BOP in % aller Stellen	PPD in mm*
Anzahl	28	28
Mittelwert	56,98	4,41
Standardabweichung	24,19	0,83

*gemittelt über alle Messungen

Das Auftreten der Virulenzfaktoren verteilte sich wie folgt auf die 28 Patienten:

Tabelle 10: Verteilung der Virulenzfaktoren in der Gruppe der erkrankten Patienten

Virulenzfaktoren	Anzahl
ohne	14
PG0186	2
PG0185 + PG0186	2
PG0982	7
PG0186 + PG0982	1
PG0185 + PG0186 + PG0982	2

Keiner der Patienten wies nur den Virulenzfaktor PG0185 oder die Kombination von PG0185 und PG0982 auf. Dagegen trugen 7 Patienten PG0982. 14 Patienten trugen keinen der untersuchten Virulenzfaktoren.

Die BOP- und PPD- Ausgangsbefunde stellten sich innerhalb der Gruppe der erkrankten Patienten wie folgt dar:

Tabelle 11: Ausgangsbefunde BOP- und PPD-Messwerte aller erkrankten Patienten

Kombinationen aus PG0185, PG0186, PG0982		BOP in % aller Stellen	PPD in mm*
ohne	Anzahl	14	14
	Mittelwert	69,54	4,71
	Standardabweichung	22,07	0,78
PG0186	Anzahl	2	2
	Mittelwert	50,22	4,57
	Standardabweichung	22,14	0,20
PG0185 + PG0186	Anzahl	2	2
	Mittelwert	29,20	4,40
	Standardabweichung	0,89	1,63
PG0982	Anzahl	7	7
	Mittelwert	44,30	3,66
	Standardabweichung	24,24	0,47
PG0186 + PG0982	Anzahl	1	1
	Mittelwert	44,70	5,44
	Standardabweichung	n.b.**	n.b.**
PG0185 + PG0186 + PG0982	Anzahl	2	2
	Mittelwert	54,17	4,26
	Standardabweichung	17,68	0,62

* gemittelt über alle Messungen

** nicht berechenbar

Die BOP-Mittelwerte aller Stellen liegen zwischen 69,5 % (keine Virulenzfaktoren) und 29,2 % (PG0185 und PG0186). Die Mittelwerte der PPD lagen in den verschiedenen Gruppen zwischen 3,6 mm (PG0982) und 5,4 mm (PG0186 und PG0982).

Die Aufschlüsselung der Virulenzfaktorenverteilung innerhalb der beiden Gruppen zeigt folgende prozentuale Werte

Tabelle 12: Virulenzfaktorenverteilung zwischen Gruppe 1 und 2 der klinisch Erkrankten

Kombinationen aus PG0185, PG0186, PG0982		Gruppe 1 n=6	Gruppe 2 n=22
ohne	Anzahl	5	9
	%	83,4	41
PG0186	Anzahl	0	2
	%	0	9
PG0185 + PG0186	Anzahl	0	2
	%	0	9
PG0982	Anzahl	1	6
	%	16,7	27,3
PG0186 + PG0982	Anzahl	0	1
	%	0	4,5
PG0185 + PG0186 + PG0982	Anzahl	0	2
	%	0	9

Es zeigt sich eine deutliche Diskrepanz im Auftreten der Virulenzfaktoren zwischen den beiden Vergleichsgruppen.

In Gruppe 1 fanden sich nur bei 16,7 % aller Probanden die untersuchten Virulenzfaktoren, denn lediglich PG0982 ließ sich in einem Fall im Genom nachweisen. PG0185 und PG0186 konnten bei keinem der Patienten bei denen *P.g.* eliminiert wurde, gefunden werden.

In Gruppe 2 trugen 59 % der Patienten einen oder mehrere der Virulenzfaktoren im Genom. Jeweils 9 % trugen den Virulenzfaktor PG0186, PG0186 + PG0185 oder alle 3 Faktoren. 27,3 % trugen den Virulenzfaktor PG0982 und 4,5 % trugen eine Kombination von PG0186 und PG0982.

Eine Ermittlung der Signifikanzwerte war auf Grund der geringen Anzahl der positiven Patientenproben nicht sinnvoll.

3.2.2 Ausgangsbefunde der klinisch gesunden Patienten

Da in der Gruppe der klinisch gesunden Patienten keine Parodontitistherapie erfolgte, also keine Eliminierung erfolgen konnte, wurde in dieser Gruppe nur die Verteilung der Virulenzfaktoren zum Untersuchungszeitpunkt betrachtet.

Diese stellte sich wie folgt dar.

Tabelle 13: Verteilung der Virulenzfaktoren in der Kontrollgruppe in V1 (n=34)

Virulenzfaktor	Anzahl	%
nur PG0185	0	0
nur PG0186	0	0
nur PG0982	9	26,5
PG0185 + PG0186	0	0
PG0186 + PG0982	0	0
PG0185 + PG0982	1	2,9
PG0185 + PG0186 + PG0982	0	0
ohne	24	70,6

26,5 % der Patienten wiesen nur den Virulenzfaktor PG0982 auf. PG0185 konnte in keiner der Proben als alleinige Varianz im Genom festgestellt werden. Dieser VF trat lediglich einmal (2,9 %) in Kombination mit PG0982 auf. PG0186 trat weder alleine noch in Kombination mit einem der anderen Virulenzfaktoren in der Kontrollgruppe auf. Die Kombination aller 3 Virulenzfaktoren wurde ebenfalls nie im Genom der untersuchten Patienten detektiert. 70,6 % der *P.g.*-Stämme der Kontrollgruppe trugen keinen der Virulenzfaktoren.

3.2.3 Verteilung der Virulenzfaktoren im Vergleich der beiden Gruppen

Um einen Überblick zu erlangen in welcher Häufung die Virulenzfaktoren in den beiden Vergleichsgruppen „erkrankt“ und „gesund“ auftraten, wurde eine rein prozentuale Statistik angefertigt.

Tabelle 14: Vergleich der Häufung der Virulenzfaktoren

Virulenzfaktor	gesund		erkrankt	
	Anzahl	%	Anzahl	%
nur PG0185	0	0	0	0
nur PG0186	0	0	2	7,1
nur PG0982	9	26,5	7	25
PG0185 + PG0186	0	0	2	7,1
PG0186 + PG0982	0	0	1	3,5
PG0185 + PG0982	1	2,9	0	0
PG0185 + PG0186 + PG0982	0	0	2	7,1
ohne	24	70,6	14	50
gesamt	34	100	28	100

Die Virulenzfaktoren PG0186 sowie eine Kombination von PG0186 mit PG0185 und/oder PG0982 wurden lediglich in der Gruppe der klinisch an einer Parodontitis erkrankten Patienten detektiert. In der Gruppe der klinisch gesunden Patienten konnte nur PG0982 mit einer Häufigkeit von 26,5 % und die Kombination von PG0982 und PG0185 (2,9 %) nachgewiesen werden. In beiden Gruppen trugen 50 % bzw. 70,6 % der Patienten keinen der untersuchten Virulenzfaktoren.

3.3 Therapieverlauf

Im Anschluss an die genetischen Untersuchungen wurden die BOP- und PPD-Messwerte in den Phasen V1 und V4 der Gruppen 1 und 2 verglichen um herauszufinden ob das Vorhandensein der Virulenzfaktoren einen Einfluss auf die Parodontitisprogression hat.

3.3.1 Therapieverlauf anhand von BOP

Zunächst wurde ermittelt, ob anhand der Prädiktoren (hier Virulenzfaktoren) eine bessere Vorhersage über die Veränderung der BOP- und PPD-Werte getroffen werden kann als ohne diese. Hier ergab sich nach einer Analysis of variance (ANOVA) für die BOP-Werte kein signifikanter Effekt ($F_{(3, 24)}=1,822$, $p=0,17$). Das heißt, es gelingt keine signifikant bessere Vorhersage zur Veränderung der BOP- und PPD-Messwerte wenn die Virulenzfaktoren vorhanden sind.

Um die Güte dieser Vorhersage zu bestimmen wurde das statistische Maß R-Quadrat verwendet. Die Vorhersage gelingt mit einer Wahrscheinlichkeit von 18,5% (R-Quadrat).

Die BOP- und PPD-Messwerte von V1 sind bereits unter 3.2.1 dargestellt.

Die BOP-Veränderungen von V1 zu V4 stellen sich wie folgt dar:

Tabelle 15: BOP-Veränderung V1 zu V4

Modell	Nicht standardisierte	Standardisierte	p-Wert
	Koeffizienten	Koeffizienten	
	B	Beta	
PG0185	-17,218	-,276	,302
PG0186	-4,263	-,085	,748
PG0982	-10,260	-,225	,237

Der standardisierte Koeffizient Beta gibt eine vergleichbare Größe an und sollte zwischen -1 und +1 liegen. Ein negativer Wert bedeutet, dass die BOP-Werte sinken, wenn einer der Virulenzfaktoren vorliegt.

Dieser Zusammenhang tritt jedoch nicht signifikant auf, da $p > 0,05$ ist. Somit hat ein Vorliegen der Virulenzfaktoren keinen signifikanten Einfluss auf die BOP-Werte.

3.3.2 Therapieverlauf anhand von PPD

Im Folgenden wurde die Veränderung der Taschensondierungstiefen bewertet. Auch hier wurden im Vorhinein Tests durchgeführt ob die Vorhersage der PPD-Veränderung durch das Vorhandensein der Virulenzfaktoren besser gelingt als ohne diese. Es ergab sich ebenfalls kein signifikanter Effekt ($F_{(3, 24)}=1,603$, $p=0,215$). Die Güte dieser Vorhersage betrug nach dem statistischen Maß R-Quadrat 16,7 %.

Bei der Analyse der Veränderung der PPD von V1 zu V4 ergibt sich bei Vorliegen des Prädiktors PG0982 eine signifikante ($p=0,041$) Veränderung ($B= -0,66$ mm) der Taschensondierungswerte, der über alle Messstellen gemittelt wurde. Die beiden anderen Prädiktoren haben keinen signifikanten Effekt auf die Taschensondierungstiefen im Laufe der Behandlung.

Tabelle 16: PPD-Veränderung V1 zu V4

Koeffizienten*			
Modell	Nicht standardisierte	Standardisierte	p-Wert
	Koeffizienten	Koeffizienten	
	B	Beta	
PG0185	-,094	-,042	,874
PG0186	,155	,086	,747
PG0982	-,660	-,406	,041

* Abhängige Variable: PPD-Veränderung von 1. zur 4. Phase

3.4 Eliminierung von *P.g.* im Verlauf der Behandlung

Da die Eliminierung von *P.g.* im Verlauf der Behandlungsphasen eine dichotome Variable ist liegt der Berechnung eine binär logistische Regression zu Grunde.

Bei der folgenden Analyse wurde geprüft wie gut eine Variable (hier das Vorhandensein eines Virulenzfaktors) die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses (hier die Eliminierung von *P.g.*) voraussagt.

In die Analyse wurden die 28 Patienten der *MURIS*-Studie einbezogen. Im Omnibustest der Modellkoeffizienten wurde zunächst ausgewertet ob die Vorhersage über die Eliminierung von *P.g.* anhand des Vorhandenseins der Virulenzfaktoren besser gelingt als ohne diese.

Tabelle 17: Omnibustest der Modellkoeffizienten

Chi-Quadrat	df	p
5,106	3	,014

Es liegt ein signifikanter Effekt vor, da $p < 0,05$ ist. Somit gelingt die Vorhersage der abhängigen Variablen (*P.g.*-Eliminierung) durch die unabhängigen Variablen (Virulenzfaktoren) besser ($\chi^2_{(3)} = 10,619$, $p = 0,14$).

Um ein Maß für die Güte dieser Vorhersage zu bekommen wurde das statistische Maß „R-Quadrat nach Nagelkerke“ verwendet.

Liegt der errechnete Wert über 0,10 spricht man von einer guten Vorhersage. Das ermittelte R-Quadrat lag bei 0,433 was 43,3 % entspricht und somit einer sehr guten Vorhersage, da 43,3% der Varianz mit Hilfe der 3 Prädiktoren erklärt werden können.

Im Folgenden wurde die Eliminierung von *P.g.* zu irgendeinem Zeitpunkt der Screeningvisits untersucht.

Tabelle 18: Vorhersagbarkeit der Eliminierung von *P.g.*

Klassifikationstabelle

Beobachtet		Vorhersagewert		
		<i>P.g.</i> zu irgendeinem Zeitpunkt eliminiert		%satz richtig
		nein	ja	
<i>P.g.</i> zu irgendeinem Zeitpunkt eliminiert	nein	7	3	70,0
	ja	3	15	83,3
Gesamtprozentsatz				78,6

Die vorhergesagte Eliminierung von *P.g.* wird in diesem Modell mit der tatsächlichen verglichen.

In 7 Fällen wurde durch das Modell keine Eliminierung vorausgesagt und es trat auch keine auf. In 15 Fällen sagt das Modell eine Eliminierung voraus und es trat eine ein. In jeweils 3 Fällen lag eine Abweichung zwischen der Vorhersage

und den tatsächlichen beobachteten Daten vor. Es gelingt somit in 78,6 % der Fälle eine richtige Vorhersage über die Eliminierung von *P.g.* Es lässt sich also anhand der Tatsache ob ein Virulenzfaktor vorliegt oder nicht, bereits eine sehr gute Vorhersage treffen ob *P.g.* zu irgendeinem Zeitpunkt der Therapie eliminiert werden kann.

Um herauszufinden welcher der Prädiktoren einen signifikanten Einfluss auf die Eliminierung von *P.g.* hat und wie groß dieser Einfluss ist wurden die Virulenzfaktoren im weiteren Verlauf getrennt betrachtet.

Tabelle 19: Signifikanz der Virulenzfaktoren zur Vorhersage der *P.g.*-Eliminierung

		p	OR	95 % Konfidenzintervall für OR	
				Unterer	Oberer
Schritt 1*	PG0185	,999	n.a.**	0,000	
	PG0186	,303	,225	,013	3,839
	PG0982	,026	,100	,013	,759

* In Schritt 1 eingegebene Variable(n): PG0185, PG0186, PG0982.

** n.a. = nicht anwendbar

Es ist zu erkennen, dass nur der Virulenzfaktor PG0982 einen signifikanten Effekt aufweist. Anhand der Odds Ratio (OR) kann man ablesen welche Richtung dieser Effekt annimmt. Eine Odds Ratio ist eine Risikoeinschätzung. Ein Wert von $OR > 1$ bedeutet eine erhöhte Auftretenswahrscheinlichkeit des untersuchten Merkmals (hier Eliminierung von *P.g.*), ein Wert von $OR < 1$ bedeutet, dass es eine geringere Auftretenswahrscheinlichkeit gibt.

Ein Wert für PG0982 von 0,100 bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit einer *P.g.*-Eliminierung bei Vorliegen von PG0982 das 0,1-fache beträgt im Vergleich zu dem Fall dass PG0982 nicht vorhanden ist. Anders ausgedrückt, ist PG0982 vorhanden, ist die Wahrscheinlichkeit einer Eliminierung von *P.g.* um 90 % verringert. Man kann also hier von einer therapieresistenteren Form des *P.g.* sprechen.

Für PG0186 wäre die Wahrscheinlichkeit einer Eliminierung ebenfalls geringer, allerdings handelte es sich im Vorhinein um einen nicht signifikanten Effekt sodass die OR für PG0186 nur der Vollständigkeit halber mit aufgeführt ist.

Die OR für PG0185 ist nicht anwendbar, da nur sehr wenige Patienten PG0185 aufweisen und es somit zu extrem großen Werten kommt.

3.4.1 Eliminierung von *P.g.* von V1 zu V4

Im Anschluss an diese Überlegung untersuchte diese Arbeit noch die Eliminierung von *P.g.* von V1 zu V4. Hier zeigten sich jedoch nur nicht signifikante Effekte.

Tabelle 20: Eliminierung von *P.g.* von V1 zu V4

		p	OR	95 % Konfidenzintervall für OR	
				Unterer	Oberer
Schritt 1	PG0185	1,000	1,191	0,000	
	PG0186	,999	,000	0,000	
	PG0982	,322	,300	,028	3,250

Eine interferenzstatistische Auswertung der Kombinationen verschiedener Virulenzfaktoren war in dieser Arbeit nicht sinnvoll, da diese Kombinationen anhand der Patientenzahl zu selten auftraten.

Aus diesem Grund wurde eine deskriptive Übersicht angefertigt, bei welcher Kombination *P.g.* prozentual wie häufig eliminiert wurde.

Auch hier wurde wieder V1 zu V4 betrachtet.

Tabelle 21: Eliminierungshäufigkeit bei Kombination mehrerer Virulenzfaktoren

Kombinationen	ohne	Anzahl	PG eliminiert von Phase I zu IV		Gesamtsumme
			nicht eliminiert	eliminiert	
			%	%	
		9	5	14	
		64,3 %	35,7 %	100,0 %	
PG0186		2	0	2	
		100,0 %	0,0 %	100,0 %	
PG0185 + PG0186		2	0	2	
		100,0 %	0,0 %	100,0 %	
PG0982		6	1	7	
		85,7 %	14,3 %	100,0 %	
PG0186 + PG0982		1	0	1	
		100,0 %	0,0 %	100,0 %	
PG0185 + PG0186 + PG0982		2	0	2	
		100,0 %	0,0 %	100,0 %	
Gesamtsumme		22	6	28	
		78,6 %	21,4 %	100,0 %	

Es zeigte sich, dass eine Eliminierung am häufigsten (35,7 %) stattfindet, wenn der Patient keinen der 3 Virulenzfaktoren trägt. Trägt der Patient einen Keim der den Virulenzfaktor PG0186 trägt wurde der Keim nie eliminiert. Ebenso wurde er nie eliminiert wenn eine Kombination des Virulenzfaktors PG0186 mit einem oder beiden anderen Virulenzfaktoren vorlag.

Lag PG0982 vor wurde der Keim ebenfalls recht selten (14,3 %) eliminiert. Dagegen fand in 85,7 % der Fälle keine Eliminierung statt.

Generell lässt sich sagen, dass nur in 21,4 % der Fälle eine Eliminierung von *P.g.* stattfand. In 78,6 % der Fälle blieben diese Keime bis zum 4. Screeningvisit vorhanden.

3.5 Auftreten einer PA in Abhängigkeit vom Vorhandensein der Virulenzfaktoren

Abschließend betrachtet diese Arbeit den Unterschied zwischen der klinisch erkrankten und der klinisch gesunden Patientengruppe.

Die folgenden Tabellen zeigen die Häufigkeit mit der die Virulenzfaktoren PG0185, PG0186 und PG0982 in den Gruppen gesund (Parodontitis nein) und erkrankt (Parodontitis ja) auftreten.

Im nachfolgenden wird 0 mit „Virulenzfaktor nicht vorhanden“ und 1 mit „Virulenzfaktor vorhanden“ gleichgesetzt.

Tabelle 22: PG0185

		Parodontitis		Gesamtsumme	
		nein (Kontrolle)	ja (Parodontitis)		
PG0185	0	Anzahl	33	24	57
		% in PG0185	57,9 %	42,1 %	100,0 %
	1	Anzahl	1	4	5
		% in PG0185	20,0 %	80,0 %	100,0 %
Gesamtsumme		Anzahl	34	28	62
		% in PG0185	54,8 %	45,2 %	100,0 %

Tabelle 23: PG0186

		Parodontitis		Gesamtsumme	
		nein (Kontrolle)	ja (Parodontitis)		
PG0186	0	Anzahl	34	21	55
		% in PG0186	61,8 %	38,2 %	100,0 %
	1	Anzahl	0	7	7
		% in PG0186	0,0 %	100,0 %	100,0 %
Gesamtsumme		Anzahl	34	28	62
		% in PG0186	54,8 %	45,2 %	100,0 %

Tabelle 24: PG0982

		Parodontitis		Gesamtsumme	
		nein (Kontrolle)	ja (Parodontitis)		
PG0982	0	Anzahl	24	18	42
		% in PG0982	57 %	43 %	100,0 %
	1	Anzahl	10	10	20
		% in PG0982	50 %	50 %	100,0 %
Gesamtsumme		Anzahl	34	28	62
		% in PG0982	54,8 %	45,2 %	100,0 %

In den oben aufgeführten Tabellen sieht man, wie häufig eine PA-Erkrankung in Abhängigkeit des Virulenzfaktors auftritt. Diese Häufigkeiten wurden anschließend mit einem Exakter Test nach Fischer auf ihre Signifikanz geprüft. Hier ergab sich für den Prädiktor PG0185 ein p-Wert von 0,166. Es liegt somit kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Virulenzfaktor PG0185 und dem Auftreten einer Parodontitis vor.

Für den Prädiktor PG0186 ergab sich hingegen ein p-Wert von 0,002.

In diesem Fall lässt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Virulenzfaktors PG0186 und dem Auftreten einer Parodontitiserkrankung erkennen.

Auch für PG0982 wurde ein exakter Test nach Fischer durchgeführt. In diesem Fall wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Virulenzfaktors PG0982 und dem Auftreten einer Parodontitis festgestellt (p=0,785).

3.6 Risikoeinschätzung

Um das Risiko einschätzen zu können mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Parodontitiserkrankung auftreten wird, wenn diese Virulenzfaktoren vorliegen, wurde die Odds Ratio (OR) der jeweiligen Virulenzfaktoren ermittelt.

Im Falle von PG0186 ist eine Risikoeinschätzung auf Grund der Auswertung mit SPSS nicht möglich da einer der Quotienten zur Errechnung der OR 0 ist und es somit kein Ergebnis gibt.

Für PG0185 und PG0982 ergaben sich folgende Werte für die Odds Ratio:

Tabelle 25: Risikoeinschätzung PG0185

	Wert	95%-Konfidenzintervall	
		Unterer	Oberer
Odds-Verhältnis für PG0185 (0 / 1)	5,500	,578	52,366

Die Risikoeinschätzung ergab eine OR=5,50 (95% CI:0,58; 52,37).

Dies bedeutet, dass die Auftretenswahrscheinlichkeit einer Parodontitis bei Vorliegen des Virulenzfaktors PG0185 um das 5,5-fache erhöht ist. Allerdings handelt es sich um ein nicht signifikantes Ergebnis des Exakter Tests nach Fischer weswegen diese OR als nicht aussagekräftig zu beurteilen ist.

Tabelle 26: Risikoeinschätzung PG0982

	Wert	95 %-Konfidenzintervall	
		Unterer	Oberer
Odds-Verhältnis für PG0982 (0 / 1)	1,333	,458	3,881

Für den Virulenzfaktor PG0982 ergab sich OR= 1,333 (95% CI:0,458; 3,881). Dies bedeutet, dass das Risiko einer Erkrankung bei Vorhandensein des Virulenzfaktors PG0982 um das 1,333 fache erhöht ist. Es würde sich also hier um einen Risikofaktor handeln, doch auch hier liegt ein nicht signifikantes Ergebnis des Exakten Tests nach Fischer vor, sodass die Risikoeinschätzung auch hier nicht aussagekräftig ist.

3.7 Invasionsversuch

Um herauszufinden, ob Träger der Virulenzfaktoren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in die Zellen invadieren und somit vor einem lokal antibiotischen Angriff geschützt sind wurde der unter 2.3.8 beschriebene Invasionsversuch durchgeführt.

3.7.1 Auswertung der Antibiotikaaustestung

Die Auswertung der Antibiotikaaustestungen ergab folgendes Ergebnis.

Tabelle 27: Auswertung der Antibiotikaaustestung

aerob	
DMEM	TSB
<u>200 µg/ml Metronidazol</u>	<u>200 µg/ml Metronidazol</u>
kein Wachstum	leichter Rasen am Rand
<u>500 µg/ml Metronidazol</u>	<u>500 µg/ml Metronidazol</u>
kein Wachstum (s. Abb. 6, S. 46)	kein Wachstum
<u>ohne AB</u>	<u>ohne AB</u>
dichter Rasen (s. Abb. 7, S. 46)	dichter Rasen

Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 500 µg/ml Antibiotikum bewirkt, dass alle Bakterien abgetötet werden. Bei einer Konzentration von 200 µg/ml hingegen, zeigte sich auf den Platten mit TBS immer noch ein leichtes Wachstum.

Wichtig war das Ergebnis des Wachstums ohne Antibiotikazusatz. Hier zeigte sich, dass die Bakterien sowohl im Bakterienmedium als auch im Zellkulturmedium gleich gut wuchsen.

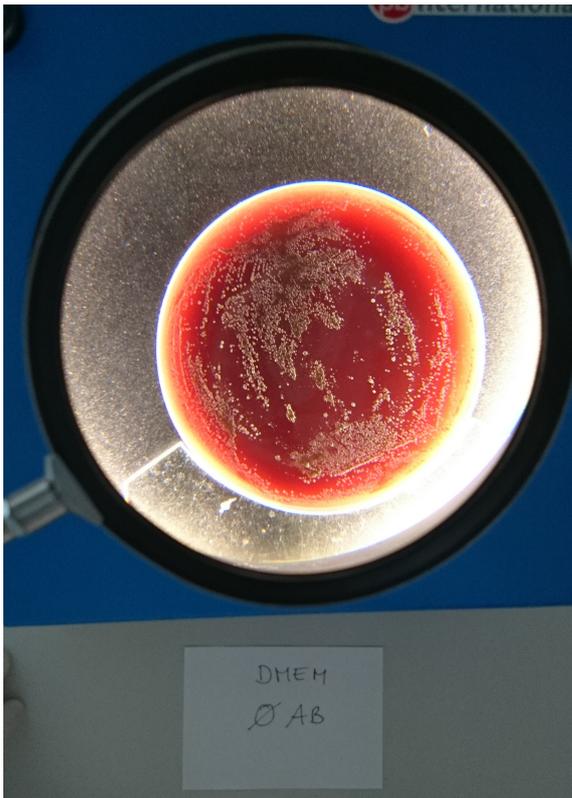


Abb. 6 DMEM ohne Antibiotikum

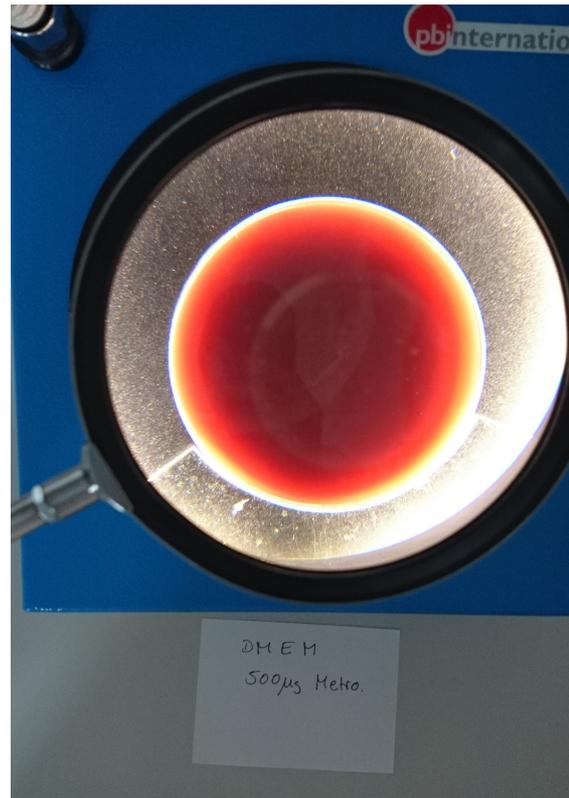


Abb. 7 DMEM mit 500 µg/ml Metronidazol

3.7.2 Auswertung Invasionsversuch mit und ohne Antibiotikum

Zur Auswertung des Invasionsversuches wurden die auf den CDC-Platten gebildeten Kolonien gezählt.

Um eine Zählung zu ermöglichen wurden einerseits Verdünnungen von 1:400 (Proben ohne Antibiotika), sowie Verdünnungen von 1:100 (Proben mit Antibiotika) vorgenommen. Anschließend wurden die Verdünnungen wieder herausgerechnet und so der Wert der Colony-forming Units (CFU) pro ml angegeben.

Stellvertretend für alle Proben wurden die Proben mit den MURIS-Nummern Pg41 (PG0982 positiv), Pg88 (ohne Virulenzfaktoren) und Pg191 (Träger der Virulenzfaktoren PG0982, PG0186 und PG0185) ausgewählt.

Jeder Ansatz wurde als Triplikat durchgeführt, sodass 3 Vergleichswerte entstanden.

Für den Invasionsversuch ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tabelle 28: Invasionstest ohne AB-Zugabe

	Probe 1 ohne AB	Probe 2 ohne AB	Probe 3 ohne AB
Muris-Nr.	10 ⁶ /ml	10 ⁶ /ml	10 ⁶ /ml
Pg41	0,37	0,33	0,58
Pg88	5,6	5,7	5,3
Pg191	0,87	0,85	0,62

Tabelle 29: Invasionstest mit AB-Zugabe

	Probe 1 mit AB	Probe 2 mit AB	Probe 3 mit AB
Muris-Nr.	10 ⁶ /ml	10 ⁶ /ml	10 ⁶ /ml
Pg41	0,04	0,05	0,05
Pg88	2,4	1,9	2,5
Pg191	0,15	0,13	0,14

Es zeigte sich in den Proben, welche ohne Antibiotikum getestet wurden eine Kolonienanzahl für *P.g.* 41 von im Mittel $0,43 \times 10^6$ /ml.

Für die Proben *P.g.* 88 ergab sich eine mittlere Kolonienanzahl von $5,53 \times 10^6$ /ml und für *P.g.* 191 $0,78 \times 10^6$ /ml.

Es fiel auf, dass die Anzahl an CFUs im Mittelwert bei Pg88 um das 13-fache höher ausfiel als bei Pg41. Pg191 bildete im Mittelwert 7 mal weniger Kolonien als Pg88.

Unter Antibiotikazugabe wurden für Pg41 im Mittel $0,047 \times 10^6$ /ml, Pg191 $0,14 \times 10^6$ /ml und Pg88 $2,23 \times 10^6$ /ml CFUs gezählt.

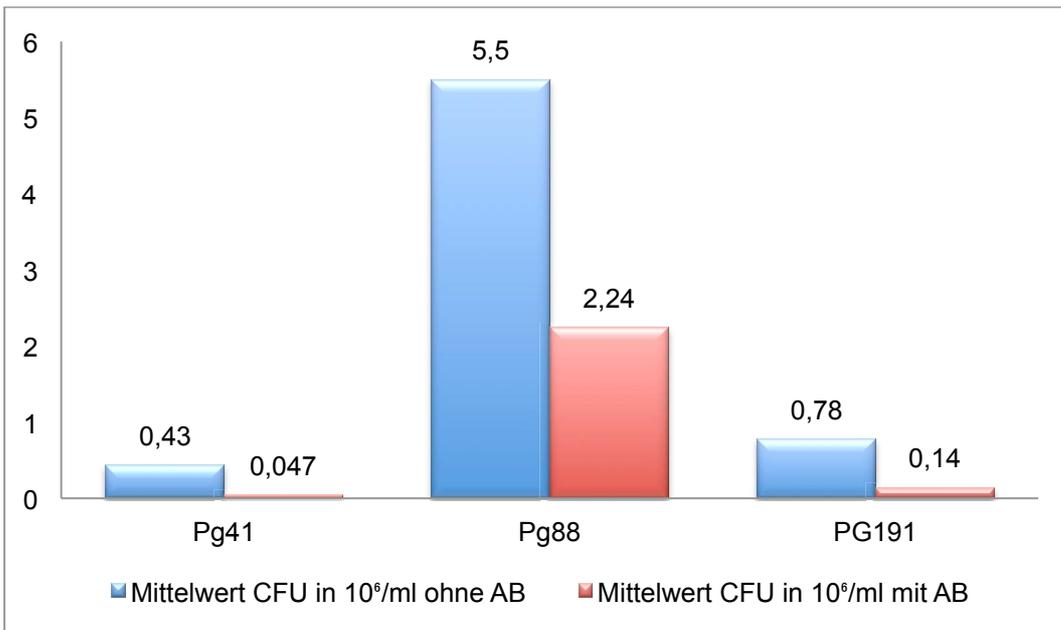


Abb. 8 Anzahl CFUs in 10^6 /ml mit und ohne Antibiotikum

Die Anzahl der gezählten Kolonien ohne und mit Antibiotikazugabe unterscheiden sich bei Pg41 um Faktor 9, bei Pg88 um Faktor 2,5 und bei Pg191 um Faktor 5,5. Im vorliegenden Versuch bedeutet dies, dass von Pg41 (PG0982) 11 % der Keime in die Zelle invadierten und so gezählt werden konnten, da alle außerhalb liegenden Keime durch das Antibiotikum abgetötet wurden.

Von Pg88 (keine VFs) invadierten 40,6 % der Kolonien und von Pg191 (PG0185, PG0186, PG0982) 17,9 % der Keime.

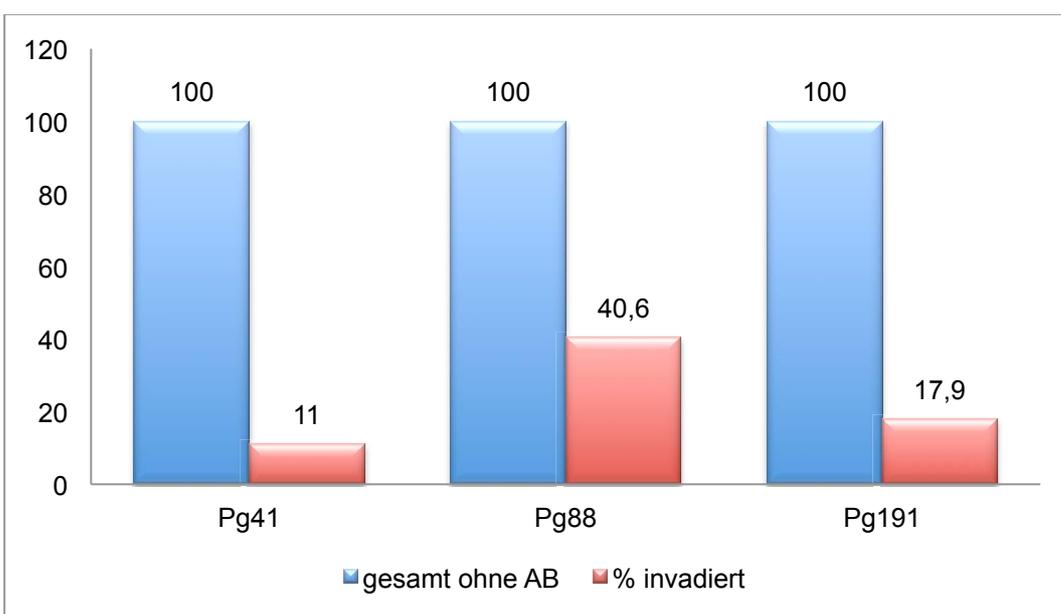


Abb. 9 prozentuales Verhältnis der invadierten Keime zur Gesamtzahl

4 Diskussion

4.1 Fragestellung

In der vorliegenden Studie wurde das Auftreten von 3 genetischen Polymorphismen in *Porphyromonas gingivalis* in 2 bzw. 3 Probandengruppen untersucht.

Grundlage der vorliegenden Forschung war die Arbeit von Dolgilevich et al. (2011), welche die hier untersuchten Polymorphismen als Virulenzfaktoren postulierten. Ziel war es herauszufinden ob eine Korrelation zwischen dem Auftreten der Virulenzfaktoren PG0185, PG0186 und PG0982 und dem Auftreten einer Parodontitiserkrankung sowie der Therapieresistenz besteht.

Das *Porphyromonas gingivalis* ein Bakterium ist, welches diverse genetische Polymorphismen aufweist wurde bereits in zahlreichen Arbeiten untersucht und belegt. Dazu zählen unter anderem die Arbeiten von Dolgilevich et al. (2011), Igboin et al. (2009), Beikler et al. (2003), Griffen et al. (1999), Loos et al. (1993; 1990) und Zhang (1993). Diese Varianzen im Genom sind deshalb interessant da *P.g.* unter anderem als Leitkeim der Parodontitis bezeichnet wird und zusammen mit *T.f.* und *T.d* den roten Komplex der parodontopathogenen Keime bildet. Somit ist eine Untersuchung der Gene, die Einfluss auf eine Therapieresistenz haben könnten oder einer erhöhte Virulenz bewirken von großem Interesse, um eine mögliche Therapie zu verbessern bzw. einen Verlauf des Schweregrades vorherzusehen und daraus Konsequenzen für die Therapie zu ziehen.

4.2 Material und Methode

4.2.1 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit nutze Patientenproben aus 2 unterschiedlichen Studien. Ein Nachteil besteht dahingehend, dass die Probenentnahmen und Untersuchungen nicht von ein und derselben Person durchgeführt wurden, und es so zu einer Abweichung bei Messwerten wie BOP und PPD auf Grund des Messdrucks kommen kann.

4.2.2 Probanden

Aus einer prospektiven longitudinalen *multiple-risk-Studie* der Universität Münster, welche im Jahr 2001 startete und an 165 Patienten durchgeführt wurde, wurden 2

Patientengruppen ausgewählt. Die strengen Einschlusskriterien der vorliegenden Studie schlossen viele dieser Patienten aus und es ergaben sich 2 heterogene Patientengruppen. Die 1. Gruppe wurde von 6 Patienten gebildet bei denen *P.g.* ebenfalls nachgewiesen wurde, bei denen der Keim aber im Laufe des Untersuchungszeitraumes eliminiert werden konnte. Gruppe 2 wurde von 22 Patienten gebildet, die *P.g.* bis zum letzten Screeningvisit nach 2 Jahren kontinuierlich trugen.

Diese ungleiche Verteilung war Ergebnis der Auswahlkriterien und ließ sich auf Grund der beschränkten Anzahl an verfügbaren Langzeitbeobachtungen nicht mehr verändern, muss jedoch bei der Bewertung der Ergebnisse mit berücksichtigt werden.

Ebenso muss der variierende Raucherstatus innerhalb dieser beiden Gruppen mit in Betracht gezogen werden, da eine klare Assoziation zwischen einer Parodontiserkrankung und dem Raucherstatus besteht (Ah, Johnson, Kaldahl, Patil, & Kalkwarf, 1994; Nassrawin, 2010). So führt eine verminderte Durchblutung im parodontalen Spalt zu einer verminderten Immunabwehr (Bergstrom & Bostrom, 2001) und einem schnelleren Fortschreiten der Parodontitis. Da *P.g.* gehäuft in fortgeschrittenen Läsionen auftritt (Rateitschak et al., 2004) wäre es interessant zu untersuchen, ob bei rauchenden Patienten eventuell sogar eine Varianz im *P.g.*-Gen gehäuft auftritt und ein Zusammenhang zwischen diesem Auftreten und einer aggressiveren Form der Parodontitis oder deren Ausbruch besteht.

Diese Frage bedarf weiterer Untersuchungen und war nicht Gegenstand der vorliegenden Studie.

Auch in der Gruppe der parodontal gesunden Patienten rauchte ein deutlich geringerer Prozentsatz der Patienten (11,8 %) im Vergleich zu Gruppe 2 der klinisch Erkrankten. Dies stimmt mit der Beobachtung, dass Rauchen ein Risikofaktor für Parodontitis ist, überein. Der Raucheranteil in Gruppe 1 der parodontal erkrankten war mit 16,6 % vergleichbar niedrig, hierbei handelt es sich aber wie oben ausgeführt um eine Grundmenge von $n = 6$.

Zusätzlich zeigte sich ein fast um 10 Jahre variierender Altersdurchschnitt (Gr. 1 51,5 Jahre, Gr. 2 53,54 Jahre, Gr. 3 42,9 Jahre). Dies ist bei den Auswertungen der vorliegenden Studie jedoch vernachlässigbar, denn es war lediglich wichtig, dass alle Patienten den untersuchten Keim aufwiesen, sodass eine Untersuchung

zum Auftreten der genetischen Polymorphismen und (bei Gruppe 1 und 2) zur Eliminierung des Keims stattfinden konnte.

4.2.3 Erhebung klinischer Parameter

Es ist nicht auszuschließen, dass sich bei Patienten die Mundhygieneverhältnisse allein dadurch verändern, dass sie an einer Studie teilnehmen, die sich mit Keimen in der Mundhöhle befasst. Hier liegt der entscheidende Vorteil in den Untersuchungen der genetischen Polymorphismen darin begründet, dass *P.g.* sich vermehrt in Taschen befindet, die eine Tiefe von mehr als 3 mm besitzen (Rateitschak et al., 2004), also für den Patienten mit normalen häuslichen Mundhygienemitteln, nicht zu erreichen sind. Die Patienten der MURIS-Studie nahmen regelmäßig an professionellen Zahnreinigungen teil, sodass die häusliche Mundhygiene durch professionelles Prophylaxepersonal ergänzt wurde. Dies muss bei der Beurteilung anhand der BOP und PPD-Messwerte berücksichtigt werden, denn diese sind durch eine vermehrte oder verbesserte Mundhygiene durchaus zu erreichen. Ebenfalls kritisch zu betrachten ist, dass die BOP- und PPD-Messungen nicht immer mit dem exakt selben Druck durchgeführt werden können wodurch es zu Abweichung bei Messwerten wie BOP und PPD kommen kann. Um diesem Problem vorzubeugen wurden die Untersuchungen immer von demselben Behandler mit einer elektrischen Sonde durchgeführt, sodass die Varianz Messdruck zu vernachlässigen und die Messwerte als sehr genau angesehen werden können.

Die Probenentnahme mit sterilen Papierspitzen wurde ebenfalls durch denselben Behandler durchgeführt und unterliegt ebenfalls einer sehr geringen Varianz. Diese Verfahren sind zudem sehr standardisiert, minimieren somit die Fehlerwahrscheinlichkeit und stellen eine etablierte Methode dar (Beikler et al., 2006).

4.2.4 Erhebung mikrobiologischer Parameter

Die Kultivierung oraler Bakterien gilt seit viele Jahre als Goldstandard in der mikrobiellen Diagnostik (Sanz, Lau, Herrera, Morillo, & Silva, 2004). In dieser Arbeit wurden die Keimisolate der MURIS- Studie bzw. die Patientenproben der gesunden Vergleichsgruppe mit Hilfe von PCR und Gelelektrophorese daraufhin untersucht, ob die Sequenz eines oder mehrere Virulenzfaktoren im Genom

vorhanden waren. Das Bandenmuster welches nach Belichtung der Agarosegele entstand (s. Abb. 4, S. 23) lies eine dichotome Aussage zu ob eine der untersuchten Gensequenzen vorlag oder nicht.

Um eine Identifizierung und Quantifizierung des gewonnenen Materials zu ermöglichen wurde die quantitative real-time-PCR benutzt.

Diese Methode ist im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität der bakteriellen Kultivierung überlegen (Riggio et al., 1996; Suzuki, Yoshida, & Nakano, 2005) und ermöglichte die Absicherung der Ergebnisse mit einer zweiten Methode (s. Abb. 5).

Nachteil der PCR ist, dass sie nicht zwischen lebenden und toten Mikroorganismen unterscheidet. Da in der vorliegenden Studie jedoch nur ein dichotomer Ansatz gewählt wurde, also ob einer oder mehrere der Virulenzfaktoren im Genom vorlagen oder nicht, bzw. ob *P.g.* in der Patientenprobe vorhanden war oder nicht, musste keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Organismen getroffen werden.

Die Austestung der Antibiotikakonzentrationen und Anzuchtbedingungen gestaltete sich als Herausforderung, da die Antibiotika unter CO₂-Zugabe, sowie unter anaeroben Bedingungen anfangs keine Wirkung zeigten. Letztendlich wurde der Versuch wie bei Dolgilevich et al. (Dolgilevich et al., 2011) unter aeroben Bedingungen ohne CO₂-Zugabe bei 37 °C im Brutschrank durchgeführt.

Da im Vorfeld die Antibiotikakonzentrationen, sowie das Wachstum der Bakterien in unterschiedlichen Medien untersucht und verglichen wurde und sich zeigte, dass die Bakterien den Wechsel von TSB zu DMEM ohne Wachstumseinbußen verkrafteten (3.7.1) kann ausgeschlossen werden, dass die Bakterien lediglich auf Grund von äußeren Einflüssen verstarben und keine Kolonien bilden konnten. Dies wurde zusätzlich durch eine mitgeführte Positivkontrolle untersucht. Eine Reduktion der Keimzahl kann also einzig auf die Antibiotikawirkung zurückgeführt werden. Ebenso kann ausgeschlossen werden, dass die Einwanderungszeit für die Bakterien in die Zellen zu kurz war, da Belton et al (1999) nachwiesen, dass die Invasion in Epithelzellen nach 20 Minuten abgeschlossen ist. In der vorliegenden Studie wurde 1 Stunde gewartet, bevor die Bakterien abgespült wurden.

Der Invasionstest unterscheidet sich in der Durchführung in 2 Punkten von der zu Grunde liegenden Arbeit von Dolgilevich et al. (2011).

Zum einen wurden in dieser Vergleichsarbeit immortalisierte Zellen zur Überprüfung der Invasionsfähigkeit von *P.g.*-Stämmen benutzt. Im vorliegenden Versuch hingegen wurden Primärzellen aus Gingivagewebe verwendet. Man kann davon ausgehen, dass Primärzellen in vitro im Ergebnis vergleichbarer sind mit den Ergebnissen, welche auch bei Patienten in vivo auftreten würden.

Der 2. wichtige Unterschied in der mikrobiologischen Untersuchung der Invasionsfähigkeit ist der, dass die Arbeit von Dolgilevich et al (2011) lediglich die in die Zellen invadierte Anzahl an *P.g.* betrachtete. In der jetzt vorliegenden Studie wurde hingegen das Verhältnis von intrazellulären und Gesamt- *P.g.s* untersucht.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Invasionsversuch also in 2 Teilschritten unternommen.

Im 1. Teil wurden die Bakterien auf der Zellkultur co-kultiviert und nach einer Stunde lediglich gewaschen und lysiert sowie unter gleichen Bedingungen wie im 2. Teil angezüchtet. Die Bakterien die daraufhin wuchsen und gezählt wurden befanden sich also sowohl intra- als auch extrazellulär, sprich sie hafteten an den Zellen oder waren in diese eingewandert.

Im 2. Teil wurden die Bakterien-Zellkulturen mit Antibiotikallösung inkubiert, so dass die Bakterien, die außen über Fimbrien an den Gingivazellen hafteten abstarben. Es wurden also letztendlich nur Bakterien gezählt, welche in die Zellen eingewandert waren und somit vor dem antibiotischen Angriff geschützt waren.

Betrachtet man nur die Anzahl der invadierten Bakterien so kann der Eindruck entstehen, dass fast 50 mal so viele Pg88 ($2,23 \times 10^6/\text{ml}$) wie Pg41 ($0,047 \times 10^6/\text{ml}$) in den Zellen vorzufinden sind. In der Realität wuchsen allerdings auch schon 13 mal mehr Pg88 als Pg41 ohne Antibiotikazugabe auf den CDC-Platten.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Zählung im Verhältnis so fällt auf, dass von Pg41 lediglich 11 % der Keime, in die Zellen invadiert sind. Bei Pg88 waren es 40,6 % und bei Pg191 17,9 %.

4.3 Ergebnisse

Die der Arbeit zugrunde liegende Hypothese, dass die Invasionsfähigkeit von *Porphyromonas gingivalis* mit Polymorphismen in den Genen PG0185, PG0186 und PG0982 zusammenhängt konnte nicht bestätigt werden.

Es zeigte sich allerdings eine auffällige prozentuale Abweichung im Auftreten der Virulenzfaktoren zwischen den Gruppen klinisch erkrankter und klinisch gesunder Patienten. Die Studie zeigt also, dass die untersuchten Faktoren PG0185 und PG0186 Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis* sind. Ob dies nur in der vorliegenden Studie der Fall ist lässt sich bis hierhin auf Grund fehlender Vergleichsstudien noch nicht beurteilen und bedarf weiterer Forschung.

Der Virulenzfaktor PG0186 konnte weder alleine noch in Kombination mit einem oder beiden anderen Faktoren in der Vergleichsgruppe der klinisch gesunden Patienten nachgewiesen werden. In der Gruppe der klinisch erkrankten Patienten trat er mit einer prozentualen Häufigkeit von 7,1 % alleine, mit 7,1 %iger Wahrscheinlichkeit in Kombination mit PG0185 und mit 3,5 %iger Wahrscheinlichkeit mit PG0982 zusammen auf.

PG0185 trat in 2,9 % der Fälle alleine und in weiteren 2,9 % in Kombination mit PG0982 in der Gruppe der klinisch gesunden Patienten auf. In der Gruppe der klinisch Erkrankten, konnte er hingegen nur in Kombination mit PG0186 (7,1 %) oder PG0186 + PG0982 (7,1 %) gefunden werden.

Innerhalb der Gruppe der erkrankten Patienten zeigte sich ebenso eine Abweichung in der Verteilung. So traten die Virulenzfaktoren in Gruppe 1, in der *P.g.* im Laufe der Behandlung verschwand seltener (16,7 %) auf als in Gruppe 2 (59,1 %), in der *P.g.* bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt kontinuierlich vorhanden war. Dies untermauert ihre Bedeutung als Virulenzfaktoren.

PG0982 trat in beiden Gruppen der klinisch erkrankten Patienten auf (Gr. 1 16,6 %, Gr. 2 27,27 %). In der gesunden Vergleichsgruppe trat PG0982 mit 26,5 % auf. Das heißt sowohl ca. $\frac{1}{4}$ der klinisch gesunden sowie der klinisch erkrankten Patienten tragen die Varianz PG0982 im Genom.

Dieses Ergebnis korreliert mit dem unter 3.5 untersuchten Auftreten einer Parodontitis in Abhängigkeit vom Vorhandensein eines Virulenzfaktors. Hier zeigte sich kein signifikanter Effekt ($p=0,785$) für den Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von PG0982 und dem Auftreten einer Parodontitis.

Allerdings war PG0982 der einzige Virulenzfaktor bei dem sich ein signifikanter ($p=0,026$) Effekt in Bezug auf die Eliminierung von *P.g.* zu irgendeinem Zeitpunkt der Behandlung feststellen ließ. Hier lag die Eliminierungswahrscheinlichkeit bei Vorliegen von PG0982 bei 0,1 (=OR), sodass die Wahrscheinlichkeit einer Eliminierung von *P.g.* bei Vorliegen von PG0982 um 90 % verringert ist. Da PG0982 allerdings wie oben bereits erläutert in keinem signifikanten Zusammenhang zum Auftreten einer Parodontitis steht, ist dieses Ergebnis hinsichtlich der Therapie zwar ein neuer Ansatz, man kann aber nicht sagen, dass PG0982 ein Risikofaktor der Parodontitis ist.

PG0186 trat in Gruppe 1 der klinisch erkrankten Patienten weder alleine noch in Kombination mit einem oder beiden der anderen Virulenzfaktoren auf. Dies deckt sich mit der Verteilung innerhalb der klinisch gesunden Patientengruppe. Auch dort fanden wir das Gen PG0186 weder alleine noch in Kombination. PG0186 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Eliminierung von *P.g.* zu irgendeinem Zeitpunkt der Behandlung ($p=0,303$). Wäre dieser Effekt jedoch signifikant gewesen hätte sich eine verringerte Eliminierungswahrscheinlichkeit für *P.g.* ergeben (OR=0,225). Hier ist wiederum abzuwägen ob die Gruppengröße einen ausschlaggebenden Punkt für dieses Ergebnis dargestellt hat. Nur 2 Patienten wiesen PG0186 als einzige Varianz im Genom auf, 5 weitere wiesen PG0186 in Kombination mit einem oder beiden anderen Faktoren auf. Wäre die Gruppengröße der PG0186 positiven Patienten größer gewesen hätte sich eventuell ein signifikanter Effekt gezeigt. PG0186 zeigt allerdings einen hochsignifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten einer Parodontitis ($p=0,002$). Dass dieser Effekt so hoch signifikant war muss allerdings relativiert werden, denn alle Patienten die PG0186 trugen waren auch an einer Parodontitis erkrankt. Leider trug kein einziger klinisch gesunder Patient diese Varianz im Genom. Ob die Gruppengröße mit $N=34$ auch hier zu klein war müsste weitere Forschung zeigen. Allerdings ist dies recht unwahrscheinlich, da die Gruppengröße deutlich größer war als die Gruppe der an Parodontitis erkrankten Patienten. Somit ist PG0186 ein potentieller Risikofaktor der Parodontitis. Die OR war auf Grund des Fehlens eines PG0186 positiven klinisch gesunden Patienten nicht zu errechnen, da dadurch einer der Quotienten bei dieser Berechnung 0 wurde. Hätte sich jedoch nur ein klinisch gesunder Patient mit diesem Virulenzfaktor im Genom

gefunden wäre die Signifikanz gestiegen und es hätte sich eine OR von 11,3 ergeben. Dies entspräche einem um das 11,3-fach erhöhten Risiko an einer Parodontitis zu erkranken.

PG0185 wurde lediglich in Kombination mit PG0186 in Gruppe 2 mit einer Wahrscheinlichkeit von 9,1% gefunden. Für PG0185 ließ sich kein signifikanter Zusammenhang mit der Eliminierung von *P.g.* feststellen ($p=0,999$; OR=nicht anwendbar). Diese extrem großen Werte kamen zustande, da in der Stichprobe nur sehr wenige Patienten PG0185 aufwiesen, sodass keine konkrete Aussage getroffen werden konnte. Auch bei diesem Virulenzfaktor zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zum Auftreten einer Parodontitis. Ob sich dies bei einer größeren Stichprobe ändert, in der ggf. mehr PG0185 positive Patienten vorhanden sind, sollte Fragestellung nachfolgender Forschung sein. Interessant wäre es diesen Ansatz weiter zu verfolgen, denn die OR, also das Risiko an einer Parodontitis zu erkranken, wäre in der vorliegenden Studie um das 5,5-fache erhöht sobald sich PG0185 im Genom nachweisen lässt. Allerdings war dieser Effekt im Vorhinein nicht signifikant.

Der Therapieverlauf wurde anhand von BOP und PPD-Messwerten beurteilt. Dies konnte nur in der Gruppe der klinisch erkrankten Patienten geschehen, da die Patienten die klinisch gesund waren nicht therapiert werden brauchten. Hier zeigte sich lediglich bei Patienten die PG0982 trugen eine signifikante ($p=0,041$) Änderung der PPD-Messwerte um $-0,66\text{mm}$ vom 1. zum 4. Untersuchungszeitpunkt. Allerdings konnte in dieser Studie wie oben bereits erwähnt kein signifikanter Zusammenhang zwischen PG0982 und dem Auftreten einer Parodontitis festgestellt werden konnte, und sowohl $\frac{1}{4}$ der gesunden als auch der klinisch erkrankten Patienten trugen PG0982.

Die BOP-Messwerte veränderten sich bei keinem der Patienten signifikant.

Weitere Schwerpunkte in der Forschung sollten auf PG0186 gelegt werden, da dieser in der vorliegenden Studie signifikant mit dem Auftreten einer PA assoziiert ist.

P.g. ist ein Keim, welcher innerhalb von 12 Minuten (Belton et al., 1999) in Epithelzellen (Lamont, Oda, Persson, & Persson, 1992; Yilmaz, Young, Lamont, &

Kenny, 2003) einwandert. Außerdem ist er ebenfalls in der Lage in Zahnfleischtaschenepithel (Sandros, Papapanou, Nannmark, & Dahlen, 1994) und Endothelzellen (Deshpande, Khan, & Genco, 1998; Dorn, Dunn, & Progulsk-Fox, 1999) einzudringen. Irshad et al. (2012) zeigten zudem, dass *P.g.*-Stämme, welche in Zellen invadierten in vitro Antibiotikaangriffe überleben.

Es ist bekannt, dass sich das Genom des einzig bekannten nicht-invasiven *P.g.*-Stammes (AJW4) in mehr als 100 Sequenzen von invasiven Stämmen unterscheidet (Chen et al., 2004; Dolgilevich et al., 2011). Dazu gehören Oberflächenproteine, Lipoproteine, Kapselpolysaccharide, Enzyme und viele mehr.

Die Ergebnisse des vorliegenden Invasionstests zeigten, dass die untersuchten Virulenzfaktoren (PG0185 (*ragA*), PG0186 (*ragB*) und PG0982) keinen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit von *P.g.* haben.

Pg88 bildete mit einem deutlichen Abstand die meisten Kolonien nach Behandlung mit Metronidazol und Gentamycin (Mittelwert: $2,23 \times 10^6$ /ml). Dieser *P.g.*-Stamm trug keinen der untersuchten Virulenzfaktoren.

Der Stamm Pg41 bildete im Mittel lediglich $0,0466 \times 10^6$ /ml CFUs, Pg191 $0,14 \times 10^6$ /ml CFUs.

Betrachtet man die prozentuale Invasion der untersuchten *P.g.*-Stämme so fällt auf, dass von Pg41 (Träger von PG0982) lediglich 11 % in die Gingivazellen einwanderten. Bei Pg88 waren es 40,6 % (Träger von keinem VF) und bei PG191 17,9 % (Träger von PG0185, PG0186 und PG0982).

Es zeigte sich also in diesem Versuch, im Gegensatz zu der Untersuchung von Dolgilevich et al. (Dolgilevich et al., 2011), keine Korrelation im Vorhandensein der untersuchten Virulenzfaktoren mit der Invasionsfähigkeit der Bakterien.

Die oben beschriebenen Unterschiede im Versuchsaufbau sind sicherlich für die unterschiedlichen Ergebnissen verantwortlich. Das Verhältnis der invadierten Bakterien zu der Gesamtzahl ist jedoch deutlich aussagekräftiger als die Gesamtzahl der Bakterien, die von Dolgilevich et al. (2011) gezählt wurde.

Da die hier getesteten Virulenzfaktoren keinen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit der *P.g.*-Stämme haben liegt die Vermutung nahe, dass andere Faktoren Einfluss auf die Invasionsfähigkeit von *P.g.* haben als die hier untersuchten. Dies sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

5 Schlussfolgerung

Obwohl Parodontitis keine Monoinfektion mit *P.g.* ist trägt dieser doch mit seiner Vielzahl an destruktiven und inflammatorischen Eigenschaften maßgebend zur Ausprägung der Parodontitis bei. Durch vorangegangene Studien konnte belegt werden, dass sich invasive und nichtinvasive *P.g.*-Stämme in ihrem Genom unterscheiden (Chen et al., 2004; Dolgilevich et al., 2011). Interessante genetische Abweichungen ließen sich in den Virulenzfaktoren ragA (PG0185), ragB (PG0186) (Nagano et al., 2007; X. Shi et al., 2007) und PG0982 (Dolgilevich et al., 2011) finden.

In der vorliegenden Studie ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Virulenzfaktor PG0186 und dem Auftreten einer Parodontiserkrankung, allerdings hatte dieser keinen signifikanten Effekt auf die Eliminierung von *P.g.*

Die Invasionsversuche zeigten, dass der Keim der keine Virulenzfaktoren trug mit Abstand die höchste Invasionsrate zeigte. Die Vermutung, dass die untersuchten Faktoren eine genetische Variation sind, die den Keimen eine Invasion in die Zellen ermöglichen, und diese somit vor lokalantibiotischen Angriffe geschützt sind, konnte also nicht bewiesen werden.

Obwohl sich also ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von PG0186 und dem Auftreten einer Parodontitis zeigt, zeigt dieser keine erhöhte Invasionseigenschaft. Es muss dementsprechend ein anderer Mechanismus vorliegen, welcher den Keim therapieresistenter macht als Keime, die diese Varianz nicht in ihrem Genom tragen.

Nicht belegen konnte die Studie dagegen den Zusammenhang von PG0185 und PG0982 mit dem Auftreten einer Parodontitis.

6 Literaturverzeichnis

Ah, M. K., Johnson, G. K., Kaldahl, W. B., Patil, K. D., & Kalkwarf, K. L. (1994). The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 21(2), 91-97.

Ardila, C. M., Granada, M. I., & Guzman, I. C. (2010). Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*, 45(4), 557-563. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01274.x

Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1-6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1

Armitage, G. C. (2004). Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 34, 9-21.

Beikler, T., Abdeen, G., Schnitzer, S., Salzer, S., Ehmke, B., Heinecke, A., & Flemmig, T. F. (2004). Microbiological shifts in intra- and extraoral habitats following mechanical periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(9), 777-783. doi: 10.1111/j.1600-051X.2004.00557.x

Beikler, T., Karch, H., & Flemmig, T.F. (2003). Adjuvante Antibiotika in der Parodontitistherapie *Stellungnahme der DGZMK*. Münster: DZZ.

Beikler, T., Peters, U., Ehmke, B., & Flemmig, T. F. (2003). Sequence analysis of kgp in *Porphyromonas gingivalis* isolates from periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(6), 393-397.

Beikler, T., Schnitzer, S., Abdeen, G., Ehmke, B., Eisenacher, M., & Flemmig, T. F. (2006). Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. *Journal of Periodontology*, 77(8), 1323-1332. doi: 10.1902/jop.2006.050204

Belton, C. M., Izutsu, K. T., Goodwin, P. C., Park, Y., & Lamont, R. J. (1999). Fluorescence image analysis of the association between *Porphyromonas gingivalis* and gingival epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 1(3), 215-223.

Bergstrom, J., & Bostrom, L. (2001). Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(7), 680-685.

Brunner, J., Wittink, F. R., Jonker, M. J., de Jong, M., Breit, T. M., Laine, M. L., . . . Crielaard, W. (2010). The core genome of the anaerobic oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiology*, 10, 252. doi: 10.1186/1471-2180-10-252

Chen, T., Hosogi, Y., Nishikawa, K., Abbey, K., Fleischmann, R. D., Walling, J., & Duncan, M. J. (2004). Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology*, *186*(16), 5473-5479. doi: 10.1128/JB.186.16.5473-5479.2004

Chen, T., Nakayama, K., Belliveau, L., & Duncan, M. J. (2001). *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infection and Immunity*, *69*(5), 3048-3056. doi: 10.1128/iai.69.5.3048-3056.2001

Clark, W. B., & Loe, H. (1993). Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontology 2000*, *2*, 72-82.

Colombo, A. V., da Silva, C. M., Haffajee, A., & Colombo, A. P. (2007). Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Periodontal Research*, *42*(3), 236-243. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00938.x

Curtis, M. A., Slaney, J. M., Carman, R. J., & Johnson, N. W. (1991). Identification of the major surface protein antigens of *Porphyromonas gingivalis* using IgG antibody reactivity of periodontal case-control serum. *Oral Microbiology and Immunology*, *6*(6), 321-326.

Darby, I. (2009). Non-surgical management of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, *54 Suppl 1*, S86-95. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01146.x

Darveau, R. P., Tanner, A., & Page, R. C. (1997). The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000*, *14*, 12-32.

Deshpande, R. G., Khan, M. B., & Genco, C. A. (1998). Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, *66*(11), 5337-5343.

Dolgilevich, S., Rafferty, B., Luchinskaya, D., & Kozarov, E. (2011). Genomic comparison of invasive and rare non-invasive strains reveals *Porphyromonas gingivalis* genetic polymorphisms. *J Oral Microbiol*, *3*. doi: 10.3402/jom.v3i0.5764

Dorn, B. R., Dunn, W. A., Jr., & Progulsk-Fox, A. (1999). Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infection and Immunity*, *67*(11), 5792-5798.

Enersen, M., Olsen, I., Kvalheim, O., & Caugant, D. A. (2008). *fimA* genotypes and multilocus sequence types of *Porphyromonas gingivalis* from patients with periodontitis. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(1), 31-42. doi: 10.1128/jcm.00986-07

- Gemmell, E., Marshall, R. I., & Seymour, G. J. (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*, *14*, 112-143.
- Gomes, B. P., Jacinto, R. C., Pinheiro, E. T., Sousa, E. L., Zaia, A. A., Ferraz, C. C., & Souza-Filho, F. J. (2005). Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiology and Immunology*, *20*(4), 211-215. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00214.x
- Griffen, A. L., Becker, M. R., Lyons, S. R., Moeschberger, M. L., & Leys, E. J. (1998). Prevalence of Porphyromonas gingivalis and periodontal health status. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(11), 3239-3242.
- Griffen, A. L., Lyons, S. R., Becker, M. R., Moeschberger, M. L., & Leys, E. J. (1999). Porphyromonas gingivalis strain variability and periodontitis. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(12), 4028-4033.
- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R. L., Jr., & Socransky, S. S. (1997). Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology*, *24*(10), 767-776.
- Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, *5*, 78-111.
- Hajishengallis, G. (2009). Porphyromonas gingivalis-host interactions: open war or intelligent guerilla tactics? *Microbes Infect*, *11*(6-7), 637-645. doi: 10.1016/j.micinf.2009.03.009
- Hall, L. M., Fawell, S. C., Shi, X., Faray-Kele, M. C., Aduse-Opoku, J., Whiley, R. A., & Curtis, M. A. (2005). Sequence diversity and antigenic variation at the rag locus of Porphyromonas gingivalis. *Infection and Immunity*, *73*(7), 4253-4262. doi: 10.1128/iai.73.7.4253-4262.2005
- Hawkey, P. M. (1998). Action against antibiotic resistance: no time to lose. *Lancet*, *351*(9112), 1298-1299. doi: 10.1016/S0140-6736(98)22018-6
- Hellwig, E., Klimek, J., & Attin, T. (2010). *Einführung in die Zahnerhaltung* (5 ed.): Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln.
- Henderson, B. (2002). Oral bacterial disease and the science of cellular conversation. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *95*(2), 77-80.
- Igboin, C. O., Griffen, A. L., & Leys, E. J. (2009). Porphyromonas gingivalis strain diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(10), 3073-3081. doi: 10.1128/JCM.00569-09

Irshad, M., van der Reijden, W. A., Crielaard, W., & Laine, M. L. (2012). In vitro invasion and survival of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts; role of the capsule. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *60*(6), 469-476. doi: 10.1007/s00005-012-0196-8

Keijser, B. J., Zaura, E., Huse, S. M., van der Vossen, J. M., Schuren, F. H., Montijn, R. C., . . . Crielaard, W. (2008). Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *Journal of Dental Research*, *87*(11), 1016-1020.

Kornman, K. S., Page, R. C., & Tonetti, M. S. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* *2000*, *14*, 33-53.

Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(4), 1244-1263.

Lamont, R. J., Oda, D., Persson, R. E., & Persson, G. R. (1992). Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiology and Immunology*, *7*(6), 364-367.

Levin, B. R., & Rozen, D. E. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, *4*(7), 556-562. doi: 10.1038/nrmicro1445

Lewis, J. P. (2010). Metal uptake in host-pathogen interactions: role of iron in *Porphyromonas gingivalis* interactions with host organisms. *Periodontology* *2000*, *52*(1), 94-116. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00329.x

Loos, B. G., Dyer, D. W., Whittam, T. S., & Selander, R. K. (1993). Genetic structure of populations of *Porphyromonas gingivalis* associated with periodontitis and other oral infections. *Infection and Immunity*, *61*(1), 204-212.

Loos, B. G., Mayrand, D., Genco, R. J., & Dickinson, D. P. (1990). Genetic heterogeneity of *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* by genomic DNA fingerprinting. *Journal of Dental Research*, *69*(8), 1488-1493.

Michalowicz, B. S., Diehl, S. R., Gunsolley, J. C., Sparks, B. S., Brooks, C. N., Koertge, T. E., . . . Schenkein, H. A. (2000). Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, *71*(11), 1699-1707. doi: 10.1902/jop.2000.71.11.1699

Nagano, K., Murakami, Y., Nishikawa, K., Sakakibara, J., Shimosato, K., & Yoshimura, F. (2007). Characterization of RagA and RagB in *Porphyromonas gingivalis*: study using gene-deletion mutants. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(Pt 11), 1536-1548. doi: 10.1099/jmm.0.47289-0

Nakhjiri, S. F., Park, Y., Yilmaz, O., Chung, W. O., Watanabe, K., El-Sabaeny, A., . . . Lamont, R. J. (2001). Inhibition of epithelial cell apoptosis by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*, *200*(2), 145-149.

Nassrawin, N. A. (2010). Effect of smoking on the response to nonsurgical periodontal therapy. *East Mediterr Health J*, *16*(2), 162-165.

Page, R. C., & Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*, *34*(3), 235-249.

Petersilka, G. J., Ehmke, B., & Flemmig, T. F. (2002). Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontology 2000*, *28*, 56-71.

Potempa, J., Banbula, A., & Travis, J. (2000). Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontology 2000*, *24*, 153-192.

Potempa, J., Pike, R., & Travis, J. (1997). Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. *Biological Chemistry*, *378*(3-4), 223-230.

Rateitschak, Klaus H., Rateitschak, Edith M., & Wolf, Herbert F. (2004). *Farbatlanten der Zahnmedizin Parodontologie* (3. ed. Vol. 1): Thieme Verlag, Stuttgart.

Reynolds, J. J., & Meikle, M. C. (1997). Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology 2000*, *14*, 144-157.

Riggio, M. P., Macfarlane, T. W., Mackenzie, D., Lennon, A., Smith, A. J., & Kinane, D. (1996). Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Periodontal Research*, *31*(7), 496-501.

Sandros, J., Papapanou, P. N., Nannmark, U., & Dahlen, G. (1994). *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium in vitro. *Journal of Periodontal Research*, *29*(1), 62-69.

Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M., & Silva, A. (2004). Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *Journal of Clinical Periodontology*, *31*(12), 1034-1047. doi: 10.1111/j.1600-051X.2004.00609.x

Shi, X., Hanley, S. A., Faray-Kele, M. C., Fawell, S. C., Aduse-Opoku, J., Whiley, R. A., . . . Hall, L. M. (2007). The rag locus of *Porphyromonas gingivalis*

contributes to virulence in a murine model of soft tissue destruction. *Infection and Immunity*, 75(4), 2071-2074. doi: 10.1128/iai.01785-06

Shi, Y., Ratnayake, D. B., Okamoto, K., Abe, N., Yamamoto, K., & Nakayama, K. (1999). Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, and *hagA*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17955-17960.

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144.

Suzuki, N., Yoshida, A., & Nakano, Y. (2005). Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clinical Medicine & Research*, 3(3), 176-185.

Teles, R. P., Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2006). Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology 2000*, 42, 180-218. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00192.x

Van Dyke, T. E., & Sheilesh, D. (2005). Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*, 7(1), 3-7.

van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., van der Reijden, W. A., & van der Velden, U. (2002). *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(11), 1023-1028.

Walker, C. B. (1996). The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontology 2000*, 10, 79-88.

Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2000). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(9), 648-657.

Yilmaz, O. (2008). The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology*, 154(Pt 10), 2897-2903. doi: 10.1099/mic.0.2008/021220-0

Yilmaz, O., Young, P. A., Lamont, R. J., & Kenny, G. E. (2003). Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiology*, 149(Pt 9), 2417-2426.

Zhang, Y. J. (1993). Heterogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains on fimbriin gene locus by restriction fragment length polymorphism analysis. *Bulletin of Tokyo Medical and Dental University*, 40(3), 113-123.

Zhou, J., & Windsor, L. J. (2006). Porphyromonas gingivalis affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *Journal of Periodontal Research*, 41(1), 47-54. doi: 10.1111/j.1600-0765.2005.00835.x

7 Anhang

Datentabellen

Tabelle 30: Einzelproben

Tabelle 31: PCR- und rtPCR- Ergebnisse

Tabelle 30: Einzelproben

Lab-Nr.	MS-Nr.	Therapie- phase	Gruppe 0= Pg versch. 1= Pg bleibt	Geschlecht 0=weiblich 1=männlich	Alter	Raucher 0=nein 1=ja	Zahnzahl V1 zu V4	PG	PG	PG
								0185	0186	0982
								0=nicht vorhanden 1=vorhanden		
3	4977	1 10	1	1	58	1	25	0 0	0 0	1 1
4	1098	1 11	1	1	49	1	24 - 16	0 0	0 0	0 0
11	1660	1 14	1	0	62	0	21 - 20	0 0	1 1	0 0
13	833	1 12	1	0	66	0	21	1 1	1 1	0 0
21	1037	1 14	1	1	68	0	21	0 0	0 0	1 1
22	4343	1 10	1	0	69	0	14	0 0	0 0	1 1
27	121	1	0	0	54	0	22	0	0	0
39	2858	1 14	1	1	64	0	18	0 0	0 0	0 0
50	2959	1 8	1	1	49	1	26 -17	0 0	0 0	0 0
51	559	1	0	1	62	0	19	0	0	0
56	2861	1 12	1	0	51	0	27	0 0	0 0	0 0
59	3731	1 4	0	0	41	0	20	0 0	0 0	0 0
62	990	1 5	0	0	40	0	28 -26	0 0	0 0	0 0
66	2412	1 12	1	0	62	1	22	0 0	0 0	0 0
69	4769	1 9	1	0	48	1	28	1 1	1 1	1 1
70	3308	1 10	1	1	45	0	14 -11	1 0	1 0	1 1
72	2228	1 9	1	1	50	0	30	0 0	0 1	0 0
88	1731	1 11	1	0	43	1	27	0 0	1 0	0 0
95	3017	1	0	0	69	1	18-14	0	0	1
97	3068	1 8	1	0	42	1	22	0 0	1 0	1 1
112	781	1 11	1	0	40	1	27	0 0	0 0	0 0
118	3295	1 7	1	0	35	1	17	1 1	1 1	0 0

127	1962	1 9	1	0	47	0	24	0 0	0 0	1 1
129	1990	1 11	1	1	57	0	19	0 0	0 0	0 0
132	1499	1 9	1	0	61	0	24	0 0	0 0	1 1
135	4633	1 9	1	1	60	0	26	0 0	0 0	1 1
157	1956	1	0	1	43	0	26	0	0	0
163	3607	1 8	1	1	42	0	20	0 0	0 0	0 0

Tabelle 31: PCR- und rtPCR-Ergebnisse

Labor Nr.	MS-Nr.	Isolate Nr.	PG 0185		PG 0186		PG 0982	
			PCR	rt	PCR	rt	PCR	rt
3	4977	1	0	0	0	0	1	1
		934	0	0	0	0	1	1
4	1098	5	0	0	0	0	0	0
		994	0	0	0	0	0	0
11	1660	23	0	0	1	1	0	0
		231	0	0	1	1	0	0
		684	0	0	0	0	0	0
		1019	0	0	0	0	0	0
13	833	87	1	1	1	1	0	0
		1030	1	1	1	1	0	0
21	1037	36	0	0	0	0	1	1
		1037	0	0	0	0	1	1
22	4343	41	0	0	0	0	1	1
		966	0	0	0	0	1	1
39	2858	88	0	0	0	0	0	0
		1011	0	0	0	0	0	0
50	2959	117	0	0	0	0	0	0
		962	0	0	0	0	0	0
56	2861	337	0	0	0	0	0	0
		972	0	0	0	0	0	0
66	2412	176	0	0	0	0	0	0
		1008	0	0	0	0	0	0
69	4769	191	1	1	1	1	1	1
		919	1	1	1	1	1	1

70	3308	187	1	1	1	1	1	1
		703	0	0	1	1	1	1
		940	0	0	0	0	1	1
		981	0	0	0	0	1	1
72	2228	207	0	0	0	0	0	0
		1016	0	0	0	0	0	0
88	1731	252	0	0	1	1	0	0
		702	0	0	0	0	0	0
		859	0	0	0	0	0	0
		1013	0	0	0	0	0	0
97	3068	300	0	0	1	1	1	1
		636	0	0	0	0	1	1
		766	0	0	0	0	1	1
		824	0	0	0	0	1	1
112	781	344	0	0	0	0	0	0
		1006	0	0	0	0	0	0
127	1962	370	0	0	0	0	1	1
		1018	0	0	0	0	1	1
129	1990	373	0	0	0	0	0	0
		1003	0	0	0	0	0	0
132	1499	398	0	0	0	0	1	1
		1002	0	0	0	0	1	1
135	4633	408	0	0	0	0	1	1
		989	0	0	0	0	1	1
118	3295	358	1	1	1	1	0	0
		880	0	1	1	1	0	0
163	3607	548	0	0	0	0	0	0
		952	0	0	0	0	0	0
27	121	53	0	0	0	0	0	0
51	559	121	0	0	0	0	0	0
59	3731	142	0	0	0	0	0	0
		512	0	0	0	0	0	0
62	990	658	0	0	0	0	0	0
		603	0	0	0	0	0	0
95	3017	278	0	0	0	0	0	1
157	1956	483	0	0	0	0	0	0

SA001				0		0		0
SA011				0		0		0
SA020				0		0		0
SA036				0		0		1
SA054				0		0		1
SA086				0		0		1
SA088				0		0		0
SA095				0		0		0
SA098				0		0		1
SA100				0		0		0
SA103				0		0		0
SA105				0		0		1
SA110				0		0		0
SA112				0		0		0
SA116				0		0		0
SA118				0		0		0
SA120				0		0		1
SA123				0		0		1
SA124				1		0		1
SA126				0		0		1
SA138				0		0		1
SA139				0		0		1
SA140				0		0		0
SA149				0		0		0
SA163				0		0		0
SA170				0		0		1
SA190				0		0		1
SA191				0		0		1
SA195				0		0		0
SA200				0		0		0
SA212				0		0		0
SA213				0		0		0
SA218				0		0		0
SA226				0		0		0

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Beikler für das Überlassen dieses Dissertationsthemas, die Freiheit in der Durchführung und Gestaltung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich zudem bei Frau Dipl.-Biol. Dr. rer. nat. Ulrike Peters für die fachliche Betreuung, dauerhafte Unterstützung und das Beantworten vieler Fragen. Danke für konstruktive Kritik, gefühlt 100-faches Korrekturlesen und immer ein offenes Ohr, eine offene Tür bzw. Telefonleitung. Ohne ihre fachliche Betreuung wäre diese Arbeit nicht so entstanden.

Ich bedanke mich auch bei den medizinisch-technischen Assistentinnen der mikrobiologischen Abteilung, insbesondere Claudia Heier, für Ihre Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Versuche und Untersuchungen.

Für die Generierung und Bereitstellung der Kontrollproben der klinisch gesunden Vergleichsgruppe bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Sabine Adyani-Fard.

Außerdem möchte ich mich noch bei Herrn Sebastian Ullrich, .05Statistikberatung, bedanken, der mir bei Fragen zur statistischen Auswertung immer geholfen hat und statistische Unverständlichkeiten meinerseits stets schnell, unkompliziert und verständlich löste.

Zudem gilt mein Dank Dr. Andreas Kurrek, der mir die Promotion bei Prof. Dr.med. Dr. med. dent. Beikler vorschlug.

Abschließend bedanke ich mich bei Frau Stephanie Werner und Herrn Karl Müller, die mir, sowohl in meiner Assistenzzeit als auch im späteren Angestelltenverhältnis in Ihrer Praxis, stets genug Freiheiten einräumten um diese Arbeit zu vollenden.

Auf Grund Ihrer immerwährenden Unterstützung meines beruflichen Werdegangs bedanke ich mich von Herzen bei meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme.