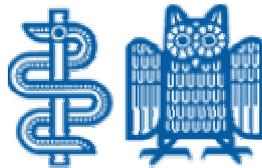


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institute für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ. – Prof. Dr. med. M. Herrmann



**Bakterielle Mikrobiomanalyse in oralen Kompartimenten
und dentalen Biofilmen mit Denaturierender Gradienten-
Gelelektrophorese und Terminalem
Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2012

vorgelegt von Ursula Elisabeth Maria Werra

geboren am 11.08.1989 in Ludwigshafen am Rhein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
1.1 Abstrakt (Deutsch)	1
1.2 Abstract (English)	4
2 Einleitung.....	7
2.1 Bakterielle Lebensgemeinschaften	7
2.2 Mundflora.....	9
2.3 Biofilm.....	11
2.3.1 Klinische Bedeutung von Biofilmen.....	11
2.3.2 Entwicklung eines Biofilms	13
2.3.3 Biofilm in der Mundhöhle	15
2.3.4 <i>in vitro</i> und <i>in situ</i> Biofilm Modelle.....	16
2.4 Untersuchung bakterieller Lebensgemeinschaften	17
2.4.1 Kulturelle Verfahren	17
2.4.2 Molekulargenetische Verfahren	18
3 Zielsetzung	23
4 Material und Methoden.....	24
4.1 Material.....	24
4.2 Methoden.....	26
4.2.1 Probanden und Probengewinnung	26
4.2.2 DNA-Extraktion	27
4.2.3 DGGE (Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese)	27
4.2.4 T-RFLP (Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) ..	33
5 Ergebnisse.....	36
5.1 Probanden	36
5.2 Exemplarische Darstellung der DGGE und T-RFLP Analyse	36
5.3 Signalintensität	42
5.4 Diversitätsanalyse.....	44
5.5 Qualitative Auswertung.....	46

6	Diskussion.....	60
7	Literaturverzeichnis.....	73
8	Publikationen	80
9	Danksagung	81
10	Lebenslauf.....	82
11	Anhang.....	83

1 Zusammenfassung

1.1 Abstrakt (Deutsch)

Das orale Mikrobiom ist sowohl von physiologischer Bedeutung für den Menschen als auch von Bedeutung für die Pathogenese enoraler Infektionen.

Die Mundhöhle bietet mit vielen unterschiedlichen Nischen wie Zunge, Wangentaschen, Zahnfleisch, Gaumen oder den Zähnen differente ökologische Bedingungen, was die Ansiedlung unterschiedlichster sessiler sowie planktonischer Bakterienspezies ermöglicht und somit die Entstehung von Biofilmen begünstigt.

Orale Biofilme sind die Ursache für das Auftreten von enoralen Erkrankungen wie Karies oder Parodontitis, wobei diese entzündlichen Krankheitsbilder nicht nur lokal eine Rolle spielen, sondern auch primäre Ursache systemischer Infektionen sein können. Ein besseres Verständnis für die Dynamik der komplexen bakteriellen Organisationsform Biofilm stellt dabei aus wissenschaftlicher und therapeutischer Sicht eine Herausforderung dar.

In dieser Arbeit sollte die zeitliche Entwicklung der Bakteriensignaturen des dentalen Biofilms untersucht werden. Hierfür wurden die molekulargenetischen Untersuchungsmethoden Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) und Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP) verwendet. Der Einsatz dieser kultur-unabhängigen Methoden zur Mikrobiomanalyse ist etabliert, aber im direkten Vergleich bislang kaum untersucht. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde mithilfe mit Rinderschmelzscheiben bestückter Oberkieferschienen ein *in situ* Biofilm Modell erstellt. An aufeinander folgenden definierten Zeitpunkten (3 min, 30 min, 2 h, 6 h, 24 h) wurden sequentielle Proben von 24 Proband(inn)en (24 bis 54 J.) sowie Speichel- und Plaqueproben entnommen.

Die Proben wurden unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht:

1. Charakterisierung des bakteriellen Mikrobioms der oralen Kompartimente unter qualitativen und quantitativen Aspekten
2. Analyse der Dynamik dentaler Biofilmbildung mithilfe eines *in situ* Modells
3. Differenzierung der Bakteriensignaturen der oralen Kompartimente
4. Biomathematische Similaritätsanalyse
5. Vergleich der DGGE und T-RFLP als diagnostische Verfahren

Es konnte gezeigt werden, dass sich die phylogenetischen Gruppen der unterschiedlichen Kompartimente von einander unterscheiden. So waren vor allem die 24 h Biofilmproben von Streptokokken dominiert ($p \leq 0,05$), wohingegen die *Bacteroidetes / Prevotella* Gruppe ($p < 0,001$) oder die *Veilonella* Gruppe ($p \leq 0,01$) die höchsten relativen Häufigkeiten in den Speichelproben zeigten. Andere Bakteriengruppen wie z.B. die *Rothia* Gruppe zeigten ähnliche Werte über alle Kompartimente. Dies lässt den Schluss zu, dass für jedes Kompartiment spezifische Bakteriensignaturen charakterisierbar sind.

Basierend auf diesen Untersuchungen konnte ein Modell zur frühen Entwicklung des dentalen Biofilms (<24 h) entwickelt werden. Dieses zeigt eine selektive Adhäsion vorrangig aerober Bakterien wie Streptokokken und Neisserien, sowie einiger Anaerobier wie *Fusobacterium periodonticum* mit anschließender streptokokkendominierter Expansion. Kodominant expandierten hierbei vor allem aerobe Bakterienspezies wie die Neisserien.

Die Diversität der Biofilmproben nahm innerhalb von 24h zu, eine signifikant höhere Biodiversität als in den dentalen Biofilmen wurde dennoch für die Speichel- und Plaqueproben nachgewiesen ($p < 0,001$).

Die biomathematischen Similaritätsindices zeigten, dass die initiale Besiedlung der Zahnoberfläche eine selektive Adhäsion spezifischer Keime darstellt. (Chao-Jaccard Estimated Abundance Index (Chao-J.)= 0,588 (2h zu Speichel)). Im

zeitlichen Verlauf wird die bakterielle Zusammensetzung der Biofilmprouben den Speichelproben jedoch immer ähnlicher (Chao-J.= 0,513 (6h zu Speichel); 0,692 (24h zu Speichel)). Die Plaqueproben zeigten im Vergleich mit den Biofilmprouben die höchste Ähnlichkeit zu den Speichelproben (Chao-J.= 0,65).

Beim direkten Vergleich von DGGE und T-RFLP konnte mithilfe der T-RFLP die Diversität des Bakterienspektrums signifikant besser aufgelöst werden ($p < 0,0001$), jedoch war die Nachweisgrenze der T-RFLP höher.

Die kulturunabhängige Diagnostik bietet neue Möglichkeiten für umfassende Analysen komplexer bakterieller Lebensgemeinschaften. Für die Zukunft sollten Möglichkeiten untersucht werden, kulturunabhängige Verfahren wie T-RFLP im klinischen Alltag für die Analyse der pathologischen Flora polymikrobieller Infektionen klinisch-diagnostisch zu nutzen und weiterzuentwickeln.

1.2 Abstract (English)

„Bacterial microbiome analysis of oral compartments and dental biofilms with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism”

The oral microbiome has great influence on the physiological and pathological properties of the human oral cavity.

The oral cavity offers a variety of distinct ecological niches such as tongue, cheek pouches, gingiva, palate or the teeth themselves. This enables the accretion of diverse sessile as well as planktonic bacteria and therefore the development of well-marked biofilms.

Oral biofilms are the major cause of oral diseases like caries and parodontitis. These infectious diseases are not solely of localized concern but can also be a basic cause of systemic infections. In this context a better understanding of the dynamics in the complex form of organization “biofilm” is one of the biggest challenges in research and therapy.

This research focuses on the developments of the bacterial composition of early dental biofilm in the course of time. The molecular techniques Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Terminal Restriction Fragment Polymorphism (T-RFLP) were used for the analysis of the biofilm samples.

These culture independent methods are well established for the analysis of microbiomes but so far they have not been directly compared to each other.

In this study, bovine enamel slices fixed at maxilla splints were used as an *in situ* biofilm model. 24 healthy volunteers carried them for 24 hours and the biofilm samples were harvested on consecutive points of time (3 min, 30 min, 2 h, 6 h, 24 h). In addition saliva and plaque samples were obtained at the beginning and the end of the investigation period.

The samples were analyzed considering the following aspects:

1. Qualitative and quantitative characterization of the oral microbiota
2. Dynamics of dental biofilm formation compared to an *in situ* model
3. Differentiation of the bacterial composition of oral compartments
4. Biomathetic similarity analysis
5. Comparison of DGGE and T-RFLP as diagnostic methods

It was shown that the microbial communities of the oral compartments are different from each other. The 24 h biofilm samples were dominated by streptococci ($p < 0.05$) whereas the saliva samples showed higher relative abundance for Bacteroidetes/ Prevotella group ($p < 0.001$) and the Veillonella group ($p < 0.01$). Other bacteria groups such as the Rothia group showed similar abundances for all compartments.

This suggests that each compartment has its specific bacterial spectrum.

Furthermore, a model of the early development of biofilm (<24 h) has been described. It shows the selective adhesion of primarily aerobic bacteria like streptococci and neisseria as well as some anaerobes, i.e., fusobacterium periodonticum. The subsequent expansion phase is dominated by streptococci and other aerobic bacteria, e.g., neisseria.

The diversity of the biofilm samples increased over time, but were exceeded by the diversity of the saliva and plaque samples ($p < 0.001$).

The statistical similarity analysis showed that the initial adhesion is a selective process (Chao-Jaccard Estimated Abundance Index (Chao-J.)= 0.588 (2 h to saliva)). Over time the bacterial composition of the biofilm samples became increasingly similar to the saliva samples (Chao-J.= 0.513 (6 h to saliva); 0.692 (24 h to saliva)), second only to the plaque samples (Chao-J.=0.65).

In direct comparison of DGGE to T-RFLP, T-RFLP allows for a deeper insight into the diversity of the oral microbiota ($p < 0.0001$) but exhibits a lower

sensitivity.

The culture independent analysis offers new possibilities for analysis of complex bacterial communities.

In future works possibilities need to be investigated how culture independent methods like T-RFLP could be used to analyze polymicrobial infections in clinical everyday routine.

2 Einleitung

2.1 Bakterielle Lebensgemeinschaften

Bakterielle Lebensgemeinschaften spielen in allen Bereichen auf der Erde eine große Rolle. Bakterien können hierbei viele unterschiedliche Funktionen einnehmen und sind an den meisten ökologischen Stoffwechselkreisläufen beteiligt. In diesen sind sie als Katabolite, Fermenter oder Energielieferanten, sowie als Generatoren von Biomasse aus Kohlenstoffdioxid und Wasser eingebunden.

Bakterien werden phylogenetisch klassifiziert. Diese Klassifikation umfasst elf Gruppen: die Thermogata, die grünen Bakterien, die Deinokokken, die Spirochäten, die grünen Schwefelbakterien, die Bacteroides, die Flavobakterien, die Planomyces, die Chlamydien, die Firmicutes und Actinobacteria, die Cyanobakterien und die Purpurbakterien (Garrity et al. 2007).

Durch die enorme Vielfalt der Bakterienspezies, auch im Bezug auf ihr **Anpassungsverhalten**, ist bakterielles Leben unter den unterschiedlichsten Bedingungen möglich. Bakterienarten unterscheiden sich nicht nur in ihrer Morphologie, dem Zellteilungsverhalten, ihrer Pathogenität oder dem Metabolismus; sie sind zudem sehr divers. So gibt es neben den Anpassungen an die Sauerstoffverhältnisse (aerob vs. anaerob) Bakterienarten, die sich in ihren Temperaturoptima (hyperthermophile vs. psychrophile) oder bezüglich ihres zum Leben benötigten pH-Werts, Drucks oder Salzgehalts unterscheiden. Durch diese unterschiedlichen Anpassungsfähigkeiten, wie die Toleranz gegenüber unterschiedlichster Temperaturen und Salzkonzentrationen, finden sich bakterielle Lebensgemeinschaften in verschiedener Zusammensetzung fast überall auf der Erde - sogar dort, wo das Leben für andere Lebewesen wie den Menschen nicht möglich wäre.

Auch der menschliche Körper und vor allem das menschliche Immunsystem machen sich bakterielle Lebensgemeinschaften und deren Funktionen zu Nutze.

So unterstützen Bakterien unseren Körper bei der Abwehr pathogener Keime und Parasiten (Costello et al. 2008), in Bereichen der Ernährung oder ermöglichen die Maturation unseres Immunsystems (Mazmanian et al. 2005).

Allein die **residente Flora** unserer Haut und Schleimhäute umfasst 10^{14} Bakterien und somit zehnmal mehr Bakterien als der Körper Zellen hat (Henderson und Wilson 1998). Diese leben auf und im menschlichen Organismus entweder als harmlose Kommensalen, Symbionten oder Parasiten (Blech 2000). Einige Spezies, die unsere Normalflora bilden, können fakultativ pathogen sein.

Die residente Flora der Haut und des Darms spielt eine wichtige Rolle beim Schutz des Körpers gegen pathogene Keime. Der Hauptmechanismus dieser Schutzfunktion ist die Befähigung der natürlichen Flora zur Kolonisationsresistenz. Durch den Entzug von Nährstoffen, dem Absenken des pH-Wertes durch Milchsäurebildung oder der Synthese antimikrobiell wirkender Substanzen wie flüchtiger Fettsäuren oder Peroxide wird den transienten pathogenen Keimen die Ansiedlung erschwert (Madigan et al. 2009).

Die physiologische Flora des Darms zeigt, wie der menschliche Organismus von seiner natürlichen Keimflora profitiert. So wird das für unsere **Ernährung** essentielle Vitamin K (eine für die Koagulation wichtige Substanz) unter anderem von den anaeroben Bakterien im Kolon gebildet (Finegold 1969). Zudem stellen Stoffwechselprodukte der Bakterien sicher, dass die Enterozyten ausreichend Nährstoffe zur Verfügung haben und spielen eine Rolle bei der Entgiftung von kanzerogenen Stoffen. Die von den Darmbakterien synthetisierten Glucuronidasen stellen die enterale Rückresorption von diversen Medikamenten sicher und ermöglichen so einen wirksamen Serumspiegel. Ein Beispiel dafür stellt die Interferenz von oralen Kontrazeptiva und Antibiotika dar: Unter Einnahme von Antibiotika kann durch orale Kontrazeptiva ein nur noch ungenügender Hormon-Serumspiegel aufgebaut werden, da die Rückresorption aus dem Darm nicht mehr erfolgt. Der Konzeptionsschutz ist so nicht mehr ausreichend gegeben (Hansen et al. 1991).

Die residente Bakterienflora unterstützt zudem die Ausbildung des

Immunsystems. Bakterieneigene Stoffe, wie das bakterielle Polysaccharid von *Bacteriodes fragilis*, stimulieren hierbei das Immunsystem direkt (Mazmanian et al. 2005). Auch in der frühen Ausbildung des kindlichen Immunsystems spielt die bakterielle Besiedlung von Haut und Schleimhäuten eine große Rolle. So wird unter anderem die adäquate Aktivierung von regulatorischen T-Zellen in direkten Zusammenhang mit einer ausreichenden kommensalen Bakterienflora gestellt. Zudem wird der residenten Bakterienflora eine protektive Rolle bezüglich nekrotisierender Enterocolitis und anderer schwerwiegender Erkrankungen der frühen Kindheit zugeschrieben (Martin et al. 2010).

2.2 Mundflora

Der **oralen bakteriellen Mikroflora** werden über 500 unterschiedliche Bakterienspezies aus neun Bakterienstämmen zugeordnet (Paster et al. 2001). Ihr wird eine große Bedeutung bezüglich des physiologischen Gleichgewichts der Mundhöhle zugesprochen (Hellwig et al. 2009; Ling et al. 2010). Zu den identifizierten Stämmen gehören neben Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacterium und Spirochäten auch Deferribacteria sowie die nicht anzüchtbaren Phyla TM7 und OP11 (Abb.1, Paster et al. 2001).

Den Firmicutes sind zahlreiche gram positive Spezies wie *Streptococcus sp.*, *Gemella sp.*, *Eubacterium sp.*, *Selenomonas sp.* oder *Veillonella sp.* zugeordnet. Zum Stamm der Actinobacteria gehören Bakterienarten wie *Actinomyces sp.*, *Atopobium sp.* oder *Rothia sp.* Zu den Angehörigen der Proteobacteria gehören *Neisseria sp.*, *Eikenella sp.* und *Campylobacter sp.* Vom Stamm der Bacteroidetes finden sich unter anderem *Porphyromonas sp.*, *Prevotella sp.* sowie *Capnocytophaga sp.* in der menschlichen Mundhöhle wieder. Der Stamm der Fusobacteria weist die Spezies *Fusobacterium sp.* oder *Leptotrichia sp.* auf (Aas et al. 2005).

Quantitative Analysen detektierten als prädominante orale Spezies *Streptococcus* sowie *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Rothia*, *Thiomonas*, *Lepotrichia*, *Granulicatella*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Fusobacterium*,

Eikenella und *Treponema* (Ling et al. 2010; Kolenbrander 2000).

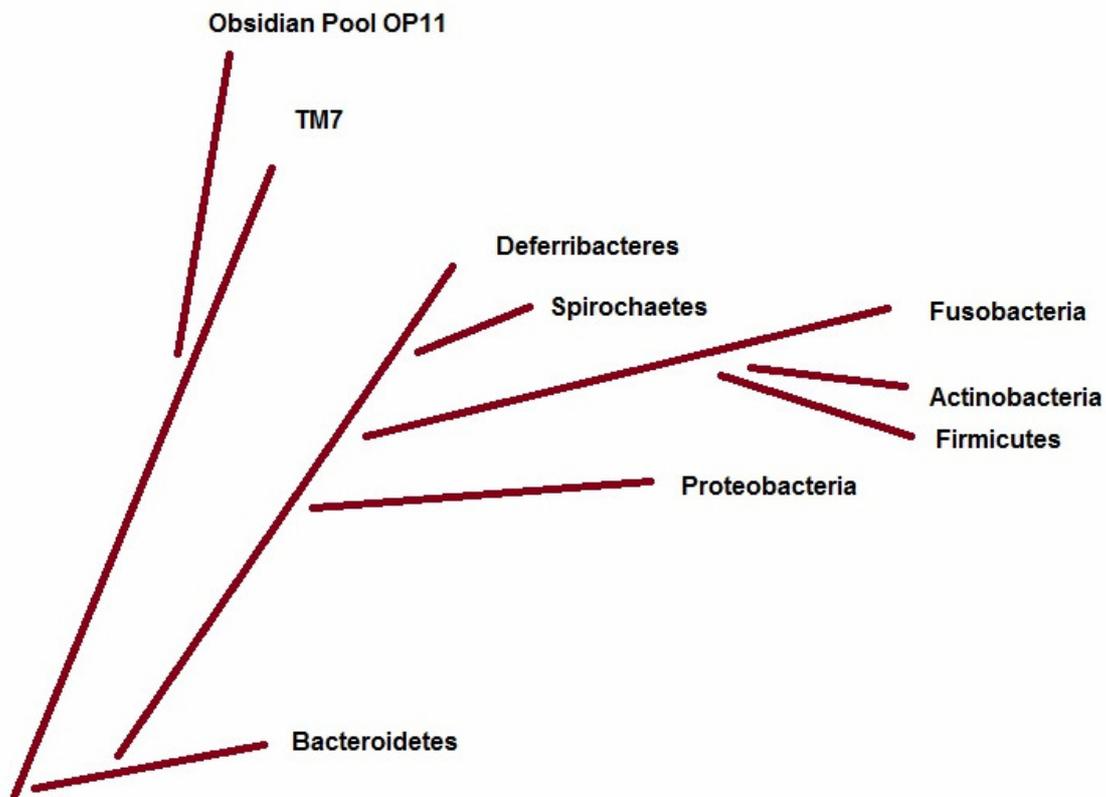


Abb. 1 Oral detektierte Bakterienphyla (modifiziert nach Paster et al. 2001)

Diese Vielfalt der sessilen sowie planktonischen Mikroorganismen, die in der humanen Mundhöhle angesiedelt sind, wird unter anderem auf das Vorhandensein unterschiedlicher **ökologischer Nischen** zurückgeführt. So bieten die Oberflächen von Zunge, Wangentaschen, Zahnfleisch oder Zähnen differente ökologische Bedingungen, welche die Ansiedlung unterschiedlichster sessiler Bakterienspezies begünstigt, wohingegen der Speichel viele planktonische Bakterienarten enthält. So unterscheiden sich *Streptococcus sp.* dominierte Kompartimente, wie die Wangentaschen, die Zunge oder der Gaumen von divers besiedelten Abschnitten wie den Tonsillen, für die vorrangig Bakterienspezies wie *Prevotella sp.* oder *Porphyromonas sp.* detektiert werden (Aas et al. 2005; Hellwig

et al. 2009). Die ökologischen Bedingungen in der warmen und feuchten Atmosphäre der Mundhöhle sind allgemein dem bakteriellen Wachstum sehr zuträglich.

Zudem weist die Mundhöhle die Besonderheit auf, Oberflächen zu bieten, die nicht einer regelmäßigen Abschilferung unterliegen und damit zur Biofilmbildung prädisponieren. Dazu zählen bestimmte Abschnitte der Zähne wie Fissuren der Kauflächen, Zahnzwischenräume und die subgingivalen Bereiche, die vom Speichelfluss fast gänzlich ausgenommen sind. Diese ermöglichen die Ausbildung ausgeprägter Biofilme.

2.3 Biofilm

2.3.1 Klinische Bedeutung von Biofilmen

Die bakterielle Organisationsform „Biofilm“ hat große Bedeutung für viele physiologische Prozesse im menschlichen Körper, aber auch für die Entstehung von Krankheiten.

Unter Biofilmen versteht man

- dreidimensional strukturierte bakterielle Gemeinschaften
(Zijngel et al. 2010)
- an Grenzflächen und sich selbst adhärente Bakterien, eingebettet in eine Polysaccharidmatrix (Costerton et al. 1995)
- komplexe Formen mikrobieller Flora (Jiang et al. 2011)

Welche Bakterienspezies in einem Biofilm vorhanden sind, hängt von der Lokalisation des Biofilms und der dortigen kommensalen Flora, sowie von den äußeren Bedingungen ab. Letztere werden durch die Wirtsfaktoren wie z.B. pH-Wert und Mineralisationsgrad der Zähne bestimmt.

Die **Polysaccharidmatrix** des Biofilms ist nicht nur eine rein physikalische Schutzhülle, durch welche die Mikroorganismen vor einer unfreiwilligen Ablösung

bewahrt werden, sie schützt die darin enthaltenen Bakterien auch vor Phagozytose sowie toxischen Molekülen. So erreichen Antibiotika durch Biofilme geschützte Bakterien nur schlecht oder gar nicht.

Zudem bietet diese Lebensform auf festem Untergrund besonders gute Wachstumsbedingungen: Nicht nur, dass an festen Untergründen mehr Nährstoffe adsorbiert vorliegen, durch die Biofilmmatrix werden diese zudem räumlich fixiert und stehen in hoher Konzentration zur Verfügung. Die räumliche Nähe der Bakterien ermöglicht zusätzlich eine exzellente interzelluläre Kommunikation und den Austausch genetischer Informationen. All dies macht in Biofilmen organisierte Bakterien außerordentlich überlebens- und widerstandsfähig (Madigan et al. 2009).

Biofilmbildende Bakterien stellen auch in der Medizin eine große Herausforderung dar. Dies soll im Folgenden anhand von fünf Beispielen erläutert werden.

Die **Cystische Fibrose** ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit, die auf einem genetischen Defekt der Chloridkanäle exokriner Drüsen beruht. Das klinische Bild ist jedoch vorrangig durch den Keim *Pseudomonas aeruginosa* und seinen Biofilm charakterisiert. Die chronische Besiedlung der Atemwege durch *Pseudomonas sp.* wird als Hauptgrund für Morbidität und Mortalität der an Cystischer Fibrose erkrankten Patienten angesehen (Govan 1996).

Ebenso problematisch ist die bakterielle Besiedlung von künstlichen oder vorgeschädigten natürlichen Herzklappen, die zu **Endokarditis** sowie infolgedessen zu Klappeninsuffizienzen und septischen Krankheitsbildern führen kann (Herold 2010).

Weiterhin kann es bei **Infektionen künstlicher Gelenke** zu Wundheilungsstörungen und Entzündungen des umliegenden Knochens bis hin zu chronischer Osteomyelitis und Einsteifung des betroffenen Gelenks kommen (Niethard et al. 2009).

Auch Katheter und andere künstliche Zugänge bieten exzellente Voraussetzungen zur Biofilmbildung. Gravierendste Komplikation einer solchen **Katheterinfektion**

ist die generalisierte **Sepsis** (Herold et al. 2010).

Plaque, der dentale Biofilm, ist die wohl bekannteste Form des natürlichen Biofilms im menschlichen Körper. Unter anderem durch die Säurebildung der Plaquebakterien kommt es zum Krankheitsbild der Karies, die Schmelz und Dentin zerstört. Andere bekannte Formen der bakteriellen Infektion des Zahnhalteapparates sind Gingivitis und Parodontitis, welche ebenso durch Plaque ausgelöst werden. Sie können isoliert auftreten oder verkomplizierend vergemeinschaftet mit Karies (Marsh et al. 2010; Biener 2002). Bei Zahnextraktionen, aber auch beim normalen Kauen, können diese Bakterien in die Blutbahn gelangen und z.B. am vorgeschädigten Herzen zu einer Endokarditis führen.

2.3.2 Entwicklung eines Biofilms

Biofilme unterliegen einem dynamischen Prozess des Auf-, Ab- und Umbaus. Sie bilden sich in einem Zeitraum von einigen Stunden über Tage und Monate bis zu Jahren.

Dabei kann der Aufbau eines Biofilms über die Zeit in mehrere Stadien eingeteilt werden. Klassischerweise werden hierbei die Induktionsphase, die Wachstumsphase und die Plateauphase unterschieden (Biener 2002).

In der **Induktionsphase** kommt es zur Anlagerung einer dünnen Schicht organischen Materials wie Polysacchariden, Huminstoffen und Proteinen aus der flüssigen Phase. Dies wird als Konditionierung bezeichnet (Fuchs 2006). Diese noch fast gänzlich bakterienfreie Schicht wird „Pellikel“ genannt und stellt die Grundlage für die Plaquebildung dar (Hannig, Hannig 2007). Sie ermöglicht vormals planktonischen Zellen am entsprechenden Untergrund anzuhafte. Dabei kommt es zunächst zu einer reversiblen Anlagerung mithilfe von Fimbrien oder aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen. Diese geht dann in eine permanente Anheftung über, welche durch die Synthese von spezifischen

Adhäsionsproteinen, Polysacchariden sowie Fimbrien und Pili ermöglicht wird (Fuchs 2006). Die erste Besiedlung der entsprechenden Oberflächen wird in ihrer Gesamtheit von elektrostatischen Wechselwirkungen, „acid-based“ Interaktionen, hydrophoben Wechselwirkungen, van der Waals Kräften, Wasserstoffbrücken und Calciumbrücken bestimmt (Hannig, Hannig 2009).

Die anschließende **Wachstumsphase** ist durch Bakterienvermehrung und die Produktion von extrazellulären Substanzen wie Polysacchariden gekennzeichnet, welche die extrazelluläre Matrix bilden und die Bakterienkolonien stabilisieren (Lazar 2011; Fuchs 2006).

Die **Plateauphase** ist die dynamische Existenzphase eines Biofilms. Sie ist vom Gleichgewicht von Anlagerung und Abschilferung geprägt, da die vertikale Ausdehnung eines jeden Biofilms limitiert ist (Biener 2002). Diese Limitation ist durch mehrere Faktoren bedingt. Zum einen wird der Biofilm mit entsprechender Größe instabil und die Einwirkung der Scherkräfte nimmt an Relevanz zu (Fuchs 2006). Hinzu kommen zusätzliche mechanische Einflüsse, wie die durch Denitrifikation und Kohlendioxid entstehenden Gasblasen, durch welche die Verbindung zu einzelnen Biofilmanteilen unterbrochen wird. Ein weiterer Einflussfaktor ist die Erosion, welcher die Oberfläche eines Biofilms durch den erhöhten Strömungswiderstand zusätzlich immer ausgesetzt ist (Madigan et al. 2009). Zudem kommt es zu einem Sauerstoffmangel in den tieferen Schichten, was nur noch anaeroben Bakterien das Überleben möglich macht (Fuchs 2006).

All dies führt zur Bildung eines aus mehreren Schichten bestehenden Biofilms, der abhängig von der umgebenden Flora viele unterschiedliche Bakterienspezies enthält. Diese Biofilme zeichnen sich durch ihre exzellente Anpassung an die spezifischen Umweltbedingungen (Marsh et al. 2011) und ihre daraus resultierende Widerstandsfähigkeit aus (Madigan et al. 2009).

2.3.3 Biofilm in der Mundhöhle

Auf allen Oberflächen der Mundhöhle können sich Biofilme bilden. Dabei unterscheidet man Biofilme, die sich auf Oberflächen der Zähne und damit auf einer harten Oberfläche bilden, von den Biofilmen, die sich auf weichem Gewebe wie Zunge, Wange oder Zahnfleisch bilden (Kolenbrander et al. 2009).

Spezifisch für die oralen Biofilme ist, dass die „flüssige Phase“ in der Mundhöhle, der **Speichel**, eine spezielle Zusammensetzung aufweist. Er beinhaltet Substanzen sowohl humanen, als auch mikrobiellen Ursprungs. Neben Wasser und anorganischen Bestandteilen wie Natrium, Kalium oder Chlorid enthält Speichel auch antimikrobielle Substanzen. Lysozyme, Laktoferrine, Peroxidasen und viele andere Enzyme wirken hemmend auf bakterielles Wachstum oder wirken direkt bakterizid. Andererseits unterstützen Bestandteile des Speichels wie Proteine und Glykoproteine wiederum das bakterielle Wachstum.

Ein Biofilm in der Mundhöhle (**Plaque**) gilt unter anderem als Hauptverursacher von Karies, Gingivitis und Parodontitis. Der Biofilm Plaque besteht zu 70% aus Bakterien wie *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.* oder *Actinomyces sp.*, welche in die sogenannte Plaquematrix eingebettet sind (Marsh 2010).

Plaque kann unter anatomischen Gesichtspunkten in supragingivale und subgingivale Plaque eingeteilt werden. Die supragingivale Plaque ist ein dünner Zahnbelag, der definitionsgemäß nicht den Sulcus gingivae betrifft. Sie weitet sich mit der Zeit jedoch auf diesen aus und resultiert in subgingivaler Plaque. Da dieser Teil der Plaque dem Speichelfluss ausgesetzt ist, können nur adhärente Bakterien die supragingivale Plaque bilden. Subgingivale Plaque ist im Gegensatz dazu im Sulcus gingivae angesiedelt und wird vom „gingival crevicular fluid“ umspült, der mehr dem Blutserum ähnelt als dem Speichel (Kolenbrander et al. 2009).

Diese differenten Grundbedingungen resultieren in der Ausbildung verschiedener Bakterienpopulationen und infolgedessen unterschiedlicher Biofilmstrukturen. Subgingivale Plaque ist durch die ökologischen Bedingungen wie dem sauerstoffärmeren Milieu eine höhere Parodontopathogenität zuzuschreiben als der supragingivalen Plaque (Hellwig et al. 2009).

2.3.4 *in vitro* und *in situ* Biofilm Modelle

Für die Erforschung von Biofilmen gibt es einerseits die Möglichkeit der Analyse direkt gewonnener diagnostischer Proben, andererseits den Ansatz der experimentellen Modelle.

2.3.4.1 *in vitro* Modelle

Die *in vitro* Methoden, bei denen Biofilme unter Reagenzglasbedingungen gezüchtet werden, ermöglichen durch die Vereinfachung der Rahmenbedingungen und Kontrolle der Einflussfaktoren, einzelne Komponenten aus einem komplexen Kontext wie dem menschlichen Körper gesondert zu untersuchen (Vignais et al. 2010; Nairn et al. 2009).

Sie ermöglichen differenzierte Betrachtungen wie die Untersuchung einzelner separierter Bakterienspezies oder der Reaktion verschiedener Arten auf Antibiotika oder andere Substanzen, ohne dass der Einfluss anderer Bakterien als Faktor beachtet werden muss. Zudem ist die Reproduzierbarkeit als überlegen anzusehen.

Die realen *in vivo* Bedingungen können jedoch nicht originalgetreu wiedergegeben werden, da niemals alle Einflussfaktoren, die im menschlichen Körper wirken, in einem Experiment gleichzeitig abgebildet werden können (Fadini et al. 2010; Raad et al. 2003).

Speziell bei der Betrachtung von Biofilmen ist zu beachten, dass im Labor gezüchtete Biofilme in ihrer Entwicklung nie den Einflüssen des Wirtes ausgesetzt waren, welche die Entwicklung eines Biofilms *in vivo* stark beeinflussen. Ebenso sind sie zum Teil durch die fehlende Maturität beeinflusst, sowie durch die Grenzen der verwendeten kulturellen Methoden (Raad et al. 2003).

2.3.4.2 *in situ* Modelle

Mit Hilfe von *in situ* Biofilm Modellen kann die Interaktion von bakteriellen Lebensgemeinschaften und Wirtsfaktoren für die Biofilmentstehung untersucht werden. Für das Wachstum und die Etablierung eines Biofilms sind die Wechselwirkungen mit der Umwelt und vor allem mit dem Wirt von großer Bedeutung. Die durch das natürliche Umfeld vorgegebenen Rahmenbedingungen, sowie die einwirkenden Faktoren, beeinflussen die Zusammensetzung und bakterielle Vielfalt des Biofilms. Das erklärte Ziel und die Attraktivität der *in situ* Methodik ist es, Untersuchungen und Beobachtungen zu ermöglichen, deren Bedingungen sich so wenig wie möglich von den realen Umständen unterscheiden (Fadini et al. 2010).

In Bezug auf die Erforschung von Biofilmen liegt ein klarer Vorteil der *in situ* Methoden darin, dass hier unter natürlichen Bedingungen gewachsene Biofilme untersucht werden können (Raad et al., 2003), die während ihrer Entwicklung allen Einflussfaktoren des menschlichen Körpers und der Umwelt ausgesetzt waren. Die Reproduzierbarkeit hängt jedoch unter anderem stark von der Compliance der Probanden ab.

2.4 Untersuchung bakterieller Lebensgemeinschaften

Die vielen etablierten kulturbasierten sowie genetischen Methoden zur Untersuchung bakterieller Lebensgemeinschaften weisen spezifische Eigenschaften auf, die in Diagnostik und Forschung genutzt werden können.

2.4.1 Kulturelle Verfahren

Die klassische Kultur ist ein wichtiger Bestandteil der mikrobiologischen Diagnostik und Forschung. Sie erlaubt mithilfe der gängigen Verfahren auf einfache und günstige Weise viele Informationen über schnell wachsende Bakterien zu gewinnen. Die angezüchteten Bakterienzellen können anschließend durch

genetische oder biochemische Untersuchungen typisiert und z.B. bezüglich Antibiotikaresistenzen weitergehend charakterisiert werden (Fadini et al. 2010).

Viele Bakterienspezies sind jedoch schwer oder gar nicht kultivierbar, sodass kaum die gesamte Vielfalt der Bakterienarten des untersuchten Materials wiedergespiegelt werden kann. Ebenso fallen Faktoren wie die Dominanz einzelner Bakterienspezies ins Gewicht, die unter *in vivo* Bedingungen quantitativ möglicherweise nicht annähernd so ausgeprägt sind, wie sie sich in Kultur darstellen.

Die große klinische Bedeutung der kulturellen Verfahren liegt in der erwähnten Möglichkeit der Antibiotikaresistenztestung an den aus entsprechenden klinischen Proben angezüchteten Bakterienkolonien, wobei jedoch die Pharmakokinetik nicht abgebildet werden kann (Nightingale et al. 1987).

2.4.2 Molekulargenetische Verfahren

Mit molekularbiologischen Verfahren kann durch den Einsatz spezieller Primer bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Hybridisierungssonden bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) der gezielte Nachweis einzelner Bakterienspezies erbracht werden.

2.4.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine wichtige Methode für den Genomnachweis und die Identifikation von Bakterien ist die Polymerasekettenreaktion (PCR). Sie ermöglicht eine exponentielle Vervielfältigung von DNA (Mullis et al. 1986).

Generell gibt es zwei unterschiedliche Ansätze der PCR-Amplifikation bezüglich der Charakterisierung bakterieller Lebensgemeinschaften. Die PCR Methode kann abhängig von der Wahl der Primer zum einen für den spezifischen Nachweis einer bestimmten Bakterienspezies eingesetzt werden (Park et al. 1998), zum anderen findet sie für pan-bakterielle Untersuchungen mithilfe von Universalprimern

Verwendung, die durch ihre Bindung an hoch konservierte Bereiche der bakteriellen DNA, wie die 16S rDNA, die Vervielfältigung der DNA-Sequenzen vieler unterschiedlicher Bakterienspezies ermöglichen (Lu et al. 2000). Die PCR ist hierfür gut geeignet, da sie eine hohe Sensitivität aufweist, weshalb nur eine sehr geringe Ausgangsmenge an DNA benötigt wird ($\geq 0,5$ ng) (Mullis et al. 1986, Eckert et al. 1991).

Auch bei Universalprimern kommt es schon durch die Primerwahl zu einer gewissen Vorauswahl der nachweisbaren Bakterienspezies, da nur DNA-Sequenzen, die einen Primer-kompatiblen Abschnitt aufweisen, amplifiziert werden können (Kanogawa 2003). Somit deckt ein Primer-Ansatz nie alle Bakterienarten der zu untersuchenden Probe ab. Zudem ist eine Verfälschung von PCR-Ergebnissen durch eine Kontamination der Probe mit fremder DNA möglich. Um diese Fehlerquelle zu reduzieren, wird die PCR-Zykluszahl möglichst gering gehalten.

Weitere zu erwähnende Limitationen der PCR sind u.a. die Bildung von Heteroduplexen, inkorrekte Primeranlagerung, Chimerbildung oder akzidentelle inkomplementäre Basenpaarungen (Kanogawa 2003). Nicht zuletzt beeinflusst auch die Konzentration an freiem Magnesium die PCR-Reaktion (Markoulatos et al. 2002).

Ein spezielles PCR-Verfahren stellt die Real-Time PCR dar. Sie ermöglicht durch kontinuierliche fluoreszenzbasierte Bestimmung der DNA die quantitative Auswertung der vervielfältigten DNA (Higuchi et al. 1992). Die Hauptproblematik stellen hier die korrekte Entwicklung entsprechender Assays, sowie mögliche Auswertungsfehler dar (Valasek et al. 2005).

2.4.2.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Eine häufig genutzte Möglichkeit der spezifischen Identifizierung von Bakterienspezies ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, auch FISH genannt.

Die FISH-Methode nutzt zur Identifizierung einzelner Bakterienspezies spezielle fluoreszenzmarkierte DNA- Hybridisierungssonden (John et al. 1969; Pardue et al.

1969). Diese gezielte Sondenmarkierung ermöglicht es, mit dieser Methode auch innerhalb komplexer bakterieller Lebensgemeinschaften und Biofilmen den Nachweis einzelner Spezies zu führen (Blasco et al. 2003). Unbekannte Bakterienspezies sind mit der Fluoreszenzhybridisierung jedoch nicht nachweisbar.

2.4.2.3 16S rDNA Fingerprinting Methoden

16S ribosomale (r) DNA Fingerprinting Methoden sind molekulare Techniken, mit denen das PCR-Produkt sequenzabhängig weiter differenziert werden kann. Dazu zählen die für diese Arbeit verwendeten Methoden der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) und des Terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP). Mithilfe dieser Methoden können Aussagen über die quantitative und qualitative Zusammensetzung der Bakterienspezies einer Probe gemacht werden.

2.4.2.4 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Die DGGE (Abb.2) ist eine molekularbiologische Methode, die 16S rDNA PCR Produkte mit Hilfe eines denaturierenden Gradienten auftrennt. Aufgrund der einheitlichen Länge der 16S rDNA PCR Produkte ist die Auftrennung mit einer konventionellen Gelelektrophorese per Agarose-Gel nicht möglich. Dem DGGE-Prinzip liegt das unterschiedliche Schmelzverhalten von DNA zugrunde, die sich in ihrer Basensequenz unterscheidet. Durch die im Gel ansteigende Konzentration von Harnstoff und Formamid denaturieren voneinander unterschiedliche DNA-Sequenzen in unterschiedlichen Abschnitten des Gels. Um dieses Auftrennungsprinzip zu erhalten, wird ein modifiziertes 16S rDNA PCR Verfahren angewandt. Einer der beiden Primer für die PCR beinhaltet eine 43bp lange so genannte „GC-Clamp“, welche in einem GC-Sequenzabschnitt an einem Ende des entstehenden PCR Produkts resultiert. Dieser GC-Abschnitt führt auch unter Denaturierungsbedingungen zu einer Verklammerung der PCR Produkte und damit zu einer Abbremsung des PCR Produktes.

Dadurch entsteht ein spezifisches Bandenmuster, mit dem komplexe Bakterienpopulationen aufgetrennt werden können, wobei die Banden verschiedenen Bakterienspezies entsprechen (Abb.2). Die so gewonnenen spezifischen Banden können im Anschluss per Sequenzierung identifiziert und somit eindeutig einzelnen Bakterienspezies zugeordnet werden (Muyzer et al. 1993).

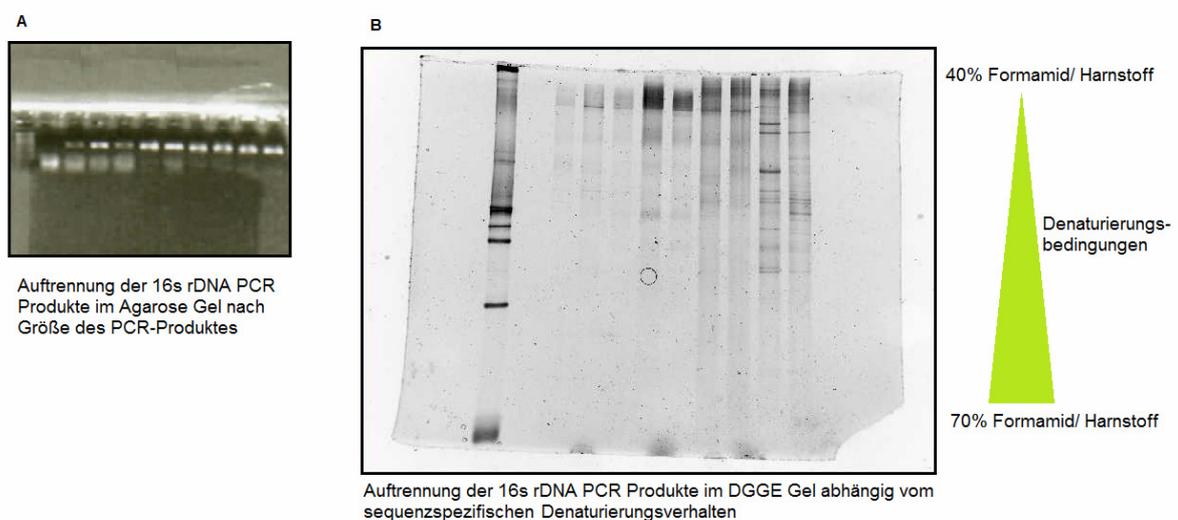


Abb. 2 Darstellung DGGE-Prinzip: Nachweis des 16S rDNA PCR Produktes einheitlicher Größe im Agarose Gel (A) Auftrennung des 16S rDNA PCR Produktes im DGGE-Gel (B) Anhand der Ergebnisse von Proband 2

2.4.2.5 Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP)

Für die T-RFLP (Abb.3) wird die gewonnene DNA mit einem fluoreszenzmarkierten und einem unmarkierten Primer amplifiziert, das 16S rDNA PCR Produkt aufgereinigt und dann mit Restriktionsenzymen verdaut. Die fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmente werden anschließend mit besonders empfindlichen und gut standardisierten Kapillarelektrophoresen separiert und die Länge per DNA-Sequencer detektiert (vgl. Abb. 3, Liu et al. 1997). Die Länge der Restriktionsfragmente wird anschließend mit Datenbanken abgeglichen und den

Restriktionsfragmenten die entsprechenden Bakterienspezies zugeordnet. In Zusammenschau mit den Fluoreszenzintensitätswerten erfolgt eine qualitative und quantitative Analyse. Als Voraussetzung für eine T-RFLP basierte Analyse zeigte sich ein DNA-Gehalt von über 10 ng/μl in den zu untersuchenden Proben.

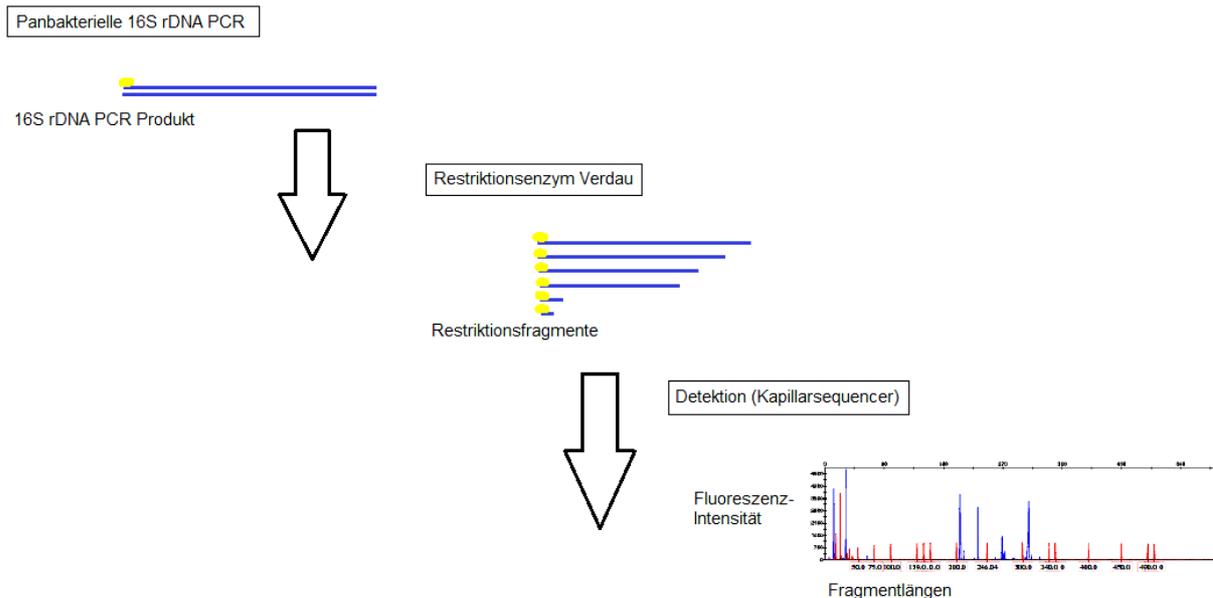


Abb. 3 Darstellung T-RFLP Prinzip: 16s rDNA PCR (fluoreszenzmarkierte Primer) und Restriktionsverdau mit anschließender Kapillarsequenzierung

Da die Nachfrage nach schnellen Sequenzierungsverfahren in den letzten Jahren immer vordringlicher wurde (Hall 2007), wurden neue Sequenzierungsverfahren entwickelt. NGS, „next generation sequencing“ Methoden, machen durch parallele Sequenzverfahren einer großen Probenanzahl mehrere tausende unabhängige Sequenzierungen möglich (Meyer et al. 2008). Die erste etablierte Methode war hierbei MPSS „Massively parallel signature sequencing“ 1990 (Brenner et al. 2000). Es folgten viele weitere Ansätze wie 454 Pyrosequencing oder Polony sequencing. Mit diesen Methoden sind besonders umfassende Analysen im Bezug auf die Vielfalt der Bakterienspezies der ökologischen Nischen des Mikrobioms möglich (Ling et al. 2010).

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Mikroflora dentaler Biofilme im Vergleich zu Speichel und interdentaler Plaque. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein *in situ* Modell für dentalen Biofilm erstellt werden. Hierfür werden 24 gesunden Probanden Oberkieferschienen angepasst. Die daran befestigten Schmelzplättchen sollen innerhalb eines Untersuchungszeitraums von 24h konsekutiv nach 3 min, 30 min, 2 h, 6 h und 24 h entnommen werden, um anschließend mithilfe der DGGE und T-RFLP Methode unter verschiedenen Gesichtspunkten analysiert zu werden:

Basierend auf der dualen Bearbeitung der Proben mit DGGE und T-RFLP soll ein **direkter Vergleich der beiden Methoden** bezüglich quantitativer und qualitativer Aspekte sowie ihrer Sensitivität erstellt werden.

Die Bakteriensignaturen und somit das **bakterielle Mikrobiom der oralen Kompartimente** sollen voneinander differenziert und bezüglich Diversität, Signalintensität, qualitativen und quantitativen Aspekten sowie der spezifischen Entwicklung einzelner Bakteriengruppen charakterisiert werden.

Es soll eine **biomathematische Similaritätsanalyse** der Biofilmproben sowie der Proben der unterschiedlichen oralen Kompartimente erstellt werden.

Basierend auf den Daten dieser Untersuchungen soll schlussendlich ein **Modell der frühen dentalen Biofilmentwicklung** entworfen werden, das die Modulationen in der bakteriellen Zusammensetzung des Biofilms der ersten 24h zur Darstellung bringt.

4 Material und Methoden

4.1 Material

DNA Extraktion

QIAamp DNA Mini Kit Cat. No. 51306	Qiagen
Cell Disruption Media 0,1mm Glass Beads	Scientific Industries
InstaGene Matrix	Bio Rad
Probengefäß mit Deckel	Greiner
Ethanol	
Thermomixer 5436, Thermomixer comfort	Eppendorf
Mikro 20 Zentrifuge	Hettich Zentrifugen

PCR

Primer (biomers.net)

GC 27F (104): CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCG CCC
CCG CCC CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG*

517R (105): ATT ACC GCG GCT GCT GG

16s for (1): AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG

16s-519r (11): GWA TTA CCG CGG CKG CTG

Primer 27F FAM markiert: AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG

*unterstrichene Sequenz: GC-Clamp

peqGOLD PCR-Hot Start-Mix 7 Order No 01-1599	Peqlab
--	--------

Aqua dest

PCR Thermocycler T-Gradient	Biometra
-----------------------------	----------

Agarose Gel

TBE Puffer (1:10)	MERCK
QA-Agarose TM Cat#AGAH0500	MP North American
Laufpuffer (1:10 TBE Puffer)	MERCK
Sybr Gold nucleic acid gel stain	Invitrogen
Gel Pilot 1kb Plus Ladder	Peqlab

Gelelektrophoresekammer SubCell®QT	BioRad
Transilluminator	Ultra-violet Products, INC
Verdau	
Exo-SAP-IT	USB
DGGE	
D-Code Universal Mutation Detection System	Bio-RAD
Rotiphorese Gel 40(37,5:1)	Roth
TEMED Art. 2367.3	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
EDTA Dinatrium Dihydrat	Zentrales Chemikalienlager UdS
Trizma base, Primary Standard and Buffer	Sigma
Harnstoff Art-Nr. 3941.1	Roth
Formamid ultrapure	AppliChem
SYBR Gold nucleic acid gel stain	invitrogen
Essigsäure 700875	Zentrales Chemikalienlager UdS
pH-Meter	Inlab Basics BNC
Bromphenolblau	Sigma
Glycerin	Sigma
Xylene Cyanole	Sigma
Geldokumentationssystem	BioRad
T-RFLP	
peqGOLD Cycle Pure Kit	peqlab
Ethanol absolut puriss. p.a.	Sigma_Aldrich
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Nanodrop	
DNA Sequencer ABI 310	Applied Bioscience
Enzym <i>MspI</i>	Fermentas
Enzym <i>HhaI</i>	Fermentas

Enzym <i>HaeIII</i>	Fermentas
Puffer "Tango"	Fermentas
Puffer R	Fermentas
Size Standard (ABI GeneScan 500 ROX)	Applied Bioscience

4.2 Methoden

4.2.1 Probanden und Probengewinnung

In die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden 24 gesunde Probanden eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren schwere systemische sowie schwere orale Erkrankungen. Zur *in situ* Generierung von dentalem Biofilm wurden von den Probanden mit Rinderschmelzscheiben bestückte Oberkieferschienen über einen Zeitraum von 24 h getragen.

An diesen individuell angepassten Schienen wurden die Rinderschmelzscheiben auf der buccale Seite mithilfe von Dentalabdruckmasse auf Silikonbasis (President light body, Coltene, Schweiz) befestigt. Die beladenen Schienen wurden während des Untersuchungszeitraums kontinuierlich getragen und nur zum Essen abgenommen.

Die Proben wurden aufeinander folgend zu mehreren Zeitpunkten (3 min, 30 min, 2 h, 6 h, 24 h) nach Einsetzen der Schiene entnommen. Die *in situ* Untersuchung von Biofilmen auf bovinem Schmelz wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (Ethikvotum 39/09) und das schriftliche Einverständnis der Probanden wurde eingeholt.

Zudem wurden Speichel und Plaqueproben zu Beginn sowie am Ende des Untersuchungszeitraums genommen. Die Plaqueproben wurden mithilfe von Zahnseide aus dem interproximalen Zahnzwischenraum gewonnen.

Aus allen gewonnenen Speichel- sowie Plaqueproben wurde die DNA extrahiert und diese anschließend mit zwei unterschiedlichen Methoden analysiert.

4.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde entsprechend der Herstellerangaben mit dem QIAamp DNA Mini Kit durchgeführt.

Im ersten Arbeitsschritt wurden die Eppendorfgefäße mit den Speichelproben bei 6000 g kurz anzentrifugiert und der Überstand des Zentrifugats anschliessend verworfen. Daraufhin wurde das Zentrifugat bzw. die Schmelzplättchen mit ATL-Puffer (180 µl) (re-)suspendiert und 20 µl Proteinase K hinzugegeben. Nach einminütigem Vortexen wurde die Probe eine Stunde bei 56 °C inkubiert und anschliessend nach kurzer Anzentrifugation und Zugabe von 200 µl AL nochmals für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Im Folgenden wurden der Probe nach erneuter Anzentrifugation 200 µl Ethanol hinzugefügt (Ethanol-fällung), diese Mischung auf eine QIAamp Spinsäule gegeben und eine Minute bei 6000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, die Spinsäule in ein neues Tube gestellt und 500 µl AW1 (Waschpuffer I) hinzugegeben. Es folgte eine einminütige Zentrifugation mit 6000 g. Dieses Zentrifugat wurde nochmals verworfen und die Spinsäule in ein neues Tube gestellt. Nach Zugabe von 500 µl AW2 (Waschpuffer II) wurde die Probe drei Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde wiederum verworfen, die Spinsäule in ein neues Tube gestellt. Der Probe wurden 200 µl AE (Elutionspuffer) hinzugegeben und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abschliessendem zweiminütigem Zentrifugieren bei 6000 g enthielt das Zentrifugat dann die DNA zum Einsatz in die PCR. Diese wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C eingelagert.

4.2.3 DGGE (Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese)

PCR-Amplifikation für das DGGE Gel

Die extrahierte DNA wurde für die Analyse per DGGE-Gel im Thermocycler amplifiziert.

Der Ansatz für die Amplifikation enthielt 5 µl der jeweiligen DNA, 20 µl Aqua dest.,

0,5 µl GC27F Primer sowie 0,5 µl 517R Primer und 25µl PCR-HotStartMix.

Somit wurde ein 50 µl Ansatz in den Thermocycler eingesetzt, die Amplifikation erfolgte mit 29 Zyklen.

Thermocycler Programm:

Lid temp 99°C preheating: on

1. 95°C 5 min
2. 94°C 1 min
3. 58°C 1 min
4. 72°C 1 min 30 sec Schleife zu Schritt 2 29x
5. 72°C 7 min
6. 4°C pause

Auftrennung per Agarose Gel

Um die DNA Amplifikation zu überprüfen, wurden die Proben im Anschluss auf ein 1% Agarose Gel aufgebracht. Dafür wurde zunächst das Gel selbst angefertigt.

Agarose und TBE-Puffer wurden gemischt (je 0,1 g Agarose auf 10 ml Puffer) und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Die Flüssigkeit wurde in die Gelhalterung gegossen, die Kämme eingesetzt. Nach ca. 20-25 min konnte das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden.

Für die Gelelektrophorese selbst wurden je 5 µl Amplifikat auf einem Stück Parafilm mit einem Tropfen loading buffer (1:500 SYBRGold) vermischt. Diese Mischung wurde dann in die Taschen des Gels gegeben. Das Gel wurde unter „constant Volt“ Bedingungen bei 70-120 Volt laufen gelassen.

Daraufhin wurde das Agarosegel unter dem Transilluminator überprüft und der Nachweis eines spezifischen PCR Produkts dokumentiert.

Vorbereitung der für die DGGE verwendeten Lösungen und Puffer

0,5 M EDTA Lösung

Um eine 0,5 M EDTA Lösung zu erhalten, wurden 18,612 g EDTA eingewogen und in 90 ml Aqua dest. gelöst. Im Anschluss wurde der pH-Wert der Lösung mit NaOH auf den Wert 8 eingestellt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

50x TAE Puffer

Zur Herstellung des fünfzigfachen TAE Puffer wurden 242 g Tris-Base mit 100 ml 0,5 M EDTA Lösung gemischt und mit Aqua dest. auf 900 ml aufgefüllt. Danach wurde tropfenweise Essigsäure hinzugegeben bis der pH-Wert von 8,5 eingestellt war (entsprach ca. 48 ml). Daraufhin wurde die Lösung mit Aqua dest. auf einen Liter aufgefüllt.

10% APS Solution

Für die APS Solution wurden 0,1 g Ammoniumpersulfate-APS in 1 ml Aqua dest. in einem Eppendorfgefäß gelöst. Dieses wurde bei -20 °C gelagert.

Färbelösung

Für die Färbelösung wurden 250 mg Bromphenol Blau mit 250 mg Xylene Cyanole und 35 ml Glycerin in 100 ml Puffer vermischt.

Denaturierungslösung

Für die Herstellung des Konzentrationsgradienten wurden 0 %, 40 % und 70 % Denaturierungs Lösungen als Ausgangslösungen angesetzt. Für diese wurden 40% Acrylamide/Bis 37,5:1, 50x TAE Puffer, deionisiertes Formamide, Harnstoff und Aqua dest wie folgt gemischt:

Für die 0 % Lösung wurden 18,8 ml 40% Acrylamide/Bis 37,5:1 mit 2ml 50x TAE Puffer gemischt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

Um die 40% Lösung zu erhalten, wurden 37,6 ml 40% Acrylamide/Bis 37,5:1 mit 4 ml 50x TAE Puffer sowie 32 ml deionisiertes Formamide und 33,6 g Harnstoff gemischt und mit Aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt.

Für die 70 % Lösung wurden 37,6 ml 40% Acrylamide/Bis 37,5:1, 4 ml 50x TAE

Puffer, 56 ml deionisiertes Formamide und 58,8 g Harnstoff vermischt und mit Aqua dest. auf 200ml aufgefüllt.

Die mit Aluminiumfolie eingewickelten Flaschen wurden im Kühlschrank gelagert.

DGGE Gel Herstellung

Die Gradientengele wurden entsprechend der Herstellerangaben (BioRad) gegossen. Die Glasplatten wurden vor jedem Gebrauch mit Isopropanol gereinigt. Mithilfe einer „alignment card“ wurden die 0,2 mm Spacer justiert und mit Schraubleisten fixiert, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Unterkanten absolut plan waren. Danach wurde die Gießvorrichtung in den Gießstand gestellt.

Daraufhin wurden je 20 ml der 70 % sowie der 40 % Acrylamide-Lösung blasenfrei in zwei Bechergläser pipettiert und der 70 % Lösung 300 µl Dye-Solution zugesetzt. Beiden Lösungen wurden zudem 180 µl APS (10 %) und 18 µl TEMED zugegeben.

Die vorgesehenen Spritzen des Gradient Former wurden mit je 15 ml der 70 % sowie der 40 % Lösung gefüllt, die 70 % Spritze hinten und die 40 % Spritze vorne am Gradient Former festgeschraubt. Der „double tube adapter“ wurde an beiden Spritzen befestigt und die Kanüle mittig an der Glasplattenkonstruktion mit durchsichtigem Klebeband fixiert. Durch langsames Drehen am Rad des Gradient Formers konnte daraufhin das Gel gegossen werden. Nach dem Gießen wurden 300 µl Isopropanol auf das Gel gegeben, um in der 30 minütigen Auspolymerisierungsphase ein Austrocknen zu verhindern. Vor der anschließenden Zugabe des Sammelgels wurde das Isopropanol dekantiert und mit Aqua dest. nachgespült, um die letzten Reste zu entfernen. Für das Sammelgel wurden 5 ml 0 % Denaturierungslösung mit 45 µl APS (10 %) und 4,5 µl TEMED versetzt, zwischen die Glasplatten pipettiert und die Kämme für die Taschen eingesetzt. Nach Auspolymerisation des Sammelgels konnte das Gel beladen werden.

Beladen des Gradientengels

Eine Stunde vor dem Starten der Gelelektrophorese mussten sieben Liter des 1x TAE-Laufpuffers im Elektrophorese Tank auf 60 °C vorgeheizt werden. Dafür wurde dieser in einer Styropor-Box isoliert.

Nach Erreichen der Lauftemperatur wurden 500 ml des Running Puffers abgeschöpft, die Glaskonstruktionen mit den Gelen in den Halter eingesetzt, wobei vorher vorsichtig die Kämme gezogen wurden und in den Elektrophorese Tank eingehängt. Danach wurden die 500 ml des Laufpuffers wieder zugegeben.

Anschliessend wurden die Taschen gespült und mit einer Mischung aus je 4 µl DNA und 3 µl Färbelösung beladen, wobei die äußeren ein bzw. zwei Taschen jeweils ausgespart wurden, da dort ein regelmäßiger Gradient nicht erwartet werden konnte. Zum Schluss wurde der Elektrophorese-Tank mit seinem Deckel verschlossen, die Pumpe angestellt und die Gelelektrophorese für 16 h (über Nacht) bei 70 Volt laufen gelassen.

Färben des Gradientengels

Um die Bandenmuster der 16S rDNA PCR Produkte auf dem Gel sichtbar zu machen, wurden die Gele von den Glasplatten gelöst und 15min auf einem Schwenktisch gefärbt. Die Färbelösung enthielt 30µl SYBR Gold auf 300ml 1x TAE Puffer.

Die gefärbten Gele wurden mit dem Geldokumentationssystem ChemiDoc™ von BioRad mithilfe einer Hintergrundsubtraktionsmethode ausgewertet und abfotografiert.

Elution spezifischer PCR Produkte aus DGGE Banden

Um die Banden eindeutig einer Bakterienspezies zuzuordnen, wurden sie ausgeschnitten und anschliessend sequenziert. Mit Hilfe eines UV Tisches konnten mit einem Skalpell die Banden knapp ausgeschnitten werden und in ein mit 200 µl Aqua dest. gefülltes Eppendorfgefäß transferiert werden.

Sequenzierung der ausgeschnittenen PCR Produkte

Nachdem die DNA über Nacht aus den ausgeschnittenen Gelstücken herausdiffundiert war, wurde sie nochmals amplifiziert. Der Ansatz entsprach dem der PCR für das DGGE Gel selbst (s.o.) mit dem Unterschied, dass die Primer 16s for und 517R (ohne GC-Clamp) genutzt wurden.

Thermocycler-Programm:

Lid temp 99°C; preheating: on

1. 95°C 5 min
2. 95°C 30 sec
3. 55°C 45 sec
4. 72°C 1 min 30 sec Schleife zu Schritt 2 29x
5. 72°C 10 min
6. 4°C pause

Auch dieses Amplifikat wurde im Anschluss wie vorhergehend beschrieben auf einem Agarose Gel überprüft.

5 µl des Amplifikats wurden für den Restriktionsverdau mit 2 µl EXO-SAP (Exonuklease I und Shrimp Alkalische Phosphatase) gemischt; daraufhin fand für den enzymatischen Verdau eine Inkubation von 15 min bei 37 °C statt. Anschliessend wurde die Probe für 15 min bei 80 °C nochmals inkubiert, um das Enzym zu inaktivieren.

Die Proben wurden zur Sequenzierung an externe Laboratorien verschickt. Zu Beginn war dies die 4base lab GmbH Reutlingen, nachfolgendend das Labor Kaiserslautern der ISEQ-IT GmbH&Co. KG. Beide Laboratorien benutzten eine Sequenzierung nach Sanger zur Bearbeitung der Proben.

4.2.4 T-RFLP (Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)

PCR Amplifikation

Für die Analyse per T-RFLP wurden die DNA Extrakte mit einem fluoreszierenden Primer (27FAM, markiert) und einem 519R Primer amplifiziert. Zu Reduktion von Amplifikationsartefakten wurden alle DNA Proben in zweifacher Ausführung in die PCR eingesetzt. Der Ansatz für die PCR enthielt je 15 µl Mastermix, 0,18 µl jedes Primers (100 pmol), 11,64 µl Wasser und 3 µl der DNA. Die meisten Proben wurden mit 29 Zyklen amplifiziert, jedoch wurden die Proben des Zeitpunktes 2 h sowie die Proben, die beim ersten Lauf kein oder ein schlechtes Ergebnis zeigten, mit 35 Zyklen amplifiziert.

Thermocycler-Programm:

Lid temp 99°C; preheating: on

1. 95°C 2 min
2. 95°C 30 sec
3. 55°C 30 sec
4. 72°C 1 min 30 sec Schleife zu Schritt 2 29x bzw. 35x
5. 72°C 5 min
6. 4°C pause

Auch diese Amplifikation wurde auf einem Agarose Gel überprüft. Dafür wurden die doppelten Ansätze gepoolt. Die PCR-Produkte wurden anschließend gemeinsam weiterverarbeitet.

Aufreinigung:

Die Aufreinigung des PCR Produktes erfolgte mit dem peqGOLD cycle Pure Kit. Die Proben wurden gemäß der Arbeitsanleitung bearbeitet. Dabei wurde das PCR Produkt mithilfe eines zugesetzten Bindepuffers zunächst temporär an die Membran der Säule gebunden. Nach zwei Waschsritten und einem Trockenschritt wurde die gereinigte DNA mithilfe eines Niedrigsalzpuffers in einem Gesamtvolumen von 30 µl eluiert.

Restriktionsverdau:

Für die Analyse im DNA Sequencer wurden die aufgereinigten DNA-Proben mit den Restriktionsenzymen *MspI*, *HhaI* und *HaeIII* geschnitten.

Die aufgereinigten DNA Proben wurden mit einem Nanodrop Gerät per Spektrophotometrieverfahren gemessen. Von jedem aufgereinigten PCR Produkt wurde dann eine 100 ng entsprechende Menge mit dem Restriktionsansatz verdaut.

Der Ansatz enthielt je 0,1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym sowie 1 µl des zugehörigen Puffers. Bei den Reaktionsansätzen mit *Msp* und *HhaI* entsprach dies dem Puffer Tango. Für die Ansätze, die *HaeIII* enthielten, wurde der Puffer R verwendet. Anschließend wurde der Ansatz mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt und über Nacht verdaut.

T-RFLP Lauf:

Nach Zugabe von 15µl HI-DI Formamid und 0,2 µl Size-Standard zu je 1,5µl Restriktionsansatz konnte als letzter Arbeitsschritt der ABI 310 DNA Sequencer gestartet werden.

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mithilfe nicht-parametrischer statistischer Tests, dem Kruskal-Wallis Test sowie als Folgetest dem Dunn Multiple Comparison Test bzw. dem Mann Whitney U Test vorgenommen. Die Ähnlichkeitsanalysen sind auf dem Chao-Jaccard Estimated Abundance Index basiert.

5 Ergebnisse

5.1 Probanden

In die Untersuchungen wurden 24 gesunde Probanden eingeschlossen. Die untersuchte Personengruppe beinhaltete männliche und weibliche Probanden im Alter von 24 bis 52 Jahren.

5.2 Exemplarische Darstellung der DGGE und T-RFLP Analyse

Alle Proben wurden parallel mittels Denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) und Terminalem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP) untersucht.

Evaluiert wurden Biofilmprouben der Entnahmezeitpunkte 3 min, 30 min, 2 h, 6 h, 24 h sowie die Speichel- und Plaqueproben vom Beginn (SS, PS) und Ende (SE, PE) des Untersuchungszeitraums.

Die Proben der 24 Probanden wurden für jeden Entnahmezeitpunkt separat auf das **DGGE** Gel aufgetragen, ebenso auch die Speichel- und Plaqueproben vom Beginn und Ende des Untersuchungszeitraums. Diese zeigten hierbei nahezu identische Bandenmuster und wurden deshalb für die weitergehende Analyse kumuliert ausgewertet.

Die Veränderung der Bandenmuster der unterschiedlichen Zeitpunkte zeigt die intraindividuellen Veränderungen bezüglich der Bandenanzahl und Intensität der Einzelsignale sowie der gesamten Probe auf. Zur beispielhaften Veranschaulichung wird nachfolgend das DGGE Gel des Probanden 2 besprochen (Abb. 4). Alle DGGE Gele der gesamten Probanden kommen in Anhang A verkleinert zur Darstellung.

Bei allen Untersuchungen wurden zunächst ein Größenmarker sowie eine Negativkontrolle aufgetragen. Die Negativkontrolle bestand aus einem nicht

exponierten, jedoch ansonsten identisch behandelten Schmelzplättchen und diente dem Ausschluss von Kontaminationen. Im Anschluss wurden die Biofilm- sowie Speichel- und Plaqueproben auf das Gel aufgetragen.

Bei der Auswertung des Probanden 2 wurde deutlich, dass sich sehr frühzeitig Streptokokken nachweisen lassen. ( , Abb. 4). Ebenso zeigten sich für die Biofilmproben eine deutliche Signalintensitätszunahme sowie ein Anstieg der Diversität über die Zeit. Diese Phänomene wurden in den weiterführenden Analysen für alle 24 Probanden ausgewertet. Das Bakterienspektrum des Probanden wies *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella sp.*, *TM7 phylum sp.*, *Catonella morbi*, *Capnocytophaga granulosa*, *Actinomyces sp.* sowie die bereits erwähnten Streptokokken auf. Die unterschiedlichen Bakterienspezies hatten verschiedene Laufweiten im DGGE Gel. So zeigte *TM7 phylum sp.* eine geringere Laufweite als unter anderem *Capnocytophaga granulosa*. Einigen Bakterienspezies wie *Prevotella melaninogenica* oder *Streptococcus sp.* konnten zudem für einige Probanden unterschiedliche Laufweiten für die verschiedenen Zeitpunkte zugeordnet werden.

der drei Fragmentlängenspektren generiert.

Das Restriktionsenzym *HaeIII* wies die höchste Auflösung für Spezies der oralen Bakterienflora auf (vgl. Tab. 1). In den folgenden Auswertungen beziehen sich die Darstellungen zur Diversität, den relativen Häufigkeiten sowie die statistischen Berechnungen auf das Spektrum von *HaeIII*.

Tab. 1 Diskrimination der T-RFs von Bakteriengruppen in Abhängigkeit von verschiedenen Restriktionsenzymen (35-500nt) in 168 Patientenproben

Restriktionsenzym	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>
Detektierte T-RFs (n)	209	93	140

So konnten in der untersuchten Gruppe von 24 Probanden im relevanten Spektrenbereich von 35nt bis 500nt bis zu 209 verschiedene T-RFs (für das Restriktionsenzym *HaeIII*) detektiert werden. Hierbei wurden generell nur die Einzelsignale berücksichtigt, die eine relative Häufigkeit innerhalb der entsprechenden Probe von über 1 Prozent aufwiesen.

Beispielhaft für die T-RFLP Auswertung werden im folgenden Abschnitt die Fragmentlängenspektren des Probanden 2 (Abb. 5) besprochen. Die Gesamtdaten der T-RFLP Analyse sind im Anhang hinterlegt. Hierbei sind T-RFs, die keiner Bakteriengruppe zugeordnet werden konnten, ohne namentliche Bezeichnung aufgeführt. Die Spektren der unterschiedlichen Zeitpunkte zeigen die intraindividuellen Veränderungen bezüglich der Signalintensitäten sowie der Anzahl der Einzelsignale auf.

Proband 2 zeigte zum Zeitpunkt 2h hohe Signalintensitäten für *Haemophilus sp./Neisseria sp.* und *Actinobaculum sp./Rothia sp.*, eine mittlere Signalintensität für *Streptococcus sp.* und *Veillonella sp.* sowie eine Vielzahl von T-RFs von minor Signalintensität auf.

Im Spektrum des Zeitpunktes 6h wies der Peak der *Haemophilus sp./Neisseria sp.* Gruppe eine ähnliche Signalintensität wie zum Zeitpunkt 2h auf, es zeigten sich jedoch abgeschwächte Signale für *Veillonella sp.* und *Actinobaculum sp./Rothia sp.*; gleichzeitig nahm die Signalstärke des Peaks der *Bacteroides sp./Prevotella sp.* Gruppe sowie des *Streptococcus sp.*-Peaks im Vergleich zum Zeitpunkt 2h zu. Zudem wies der Zeitpunkt 6h eine geringere Anzahl minor Signale (geringe Signalintensität) auf, die sich zum Zeitpunkt 24h noch verminderte.

Zum Zeitpunkt 24h kamen nur noch mittelstarke Signale für *Haemophilus sp./Neisseria sp.* und *Actinobaculum sp./Rothia sp.* zur Darstellung. Es zeigte sich ein etwas stärkeres Signal für *Streptococcus sp.*, den anderen Bakterienspezies konnte optisch kaum mehr ein Signalpeak zugeordnet werden.

Das Fragmentlängenspektrum der Speichelprobe zeigte sich von den Signalen für *Haemophilus sp./Neisseria sp.* und *Actinobaculum sp./Rothia sp.* dominiert. Hinzu kamen schwächere Signale für *Streptococcus sp.* und *Treponema sp.* sowie ein mittelstarkes Signal für *Veillonella sp.*

Im Spektrum der Plaqueprobe zeigten die Peaks von *Actinobaculum sp./Rothia sp.*, *Veillonella sp.*, und *Streptococcus sp.* die höchsten Intensitäten, die jedoch im Vergleich zu den anderen Proben deutlich geringer waren. Zudem wiesen die Speichel- und Plaqueproben eine Vielzahl von minor Signalen auf.

Diese Einzelbeobachtung der Entwicklung der Anzahl der minor Banden spiegelte sich auch in der Diversitätsanalyse in höheren respektive niedrigeren Diversitätswerten wider (siehe Abschnitt 5.4).

HaellI

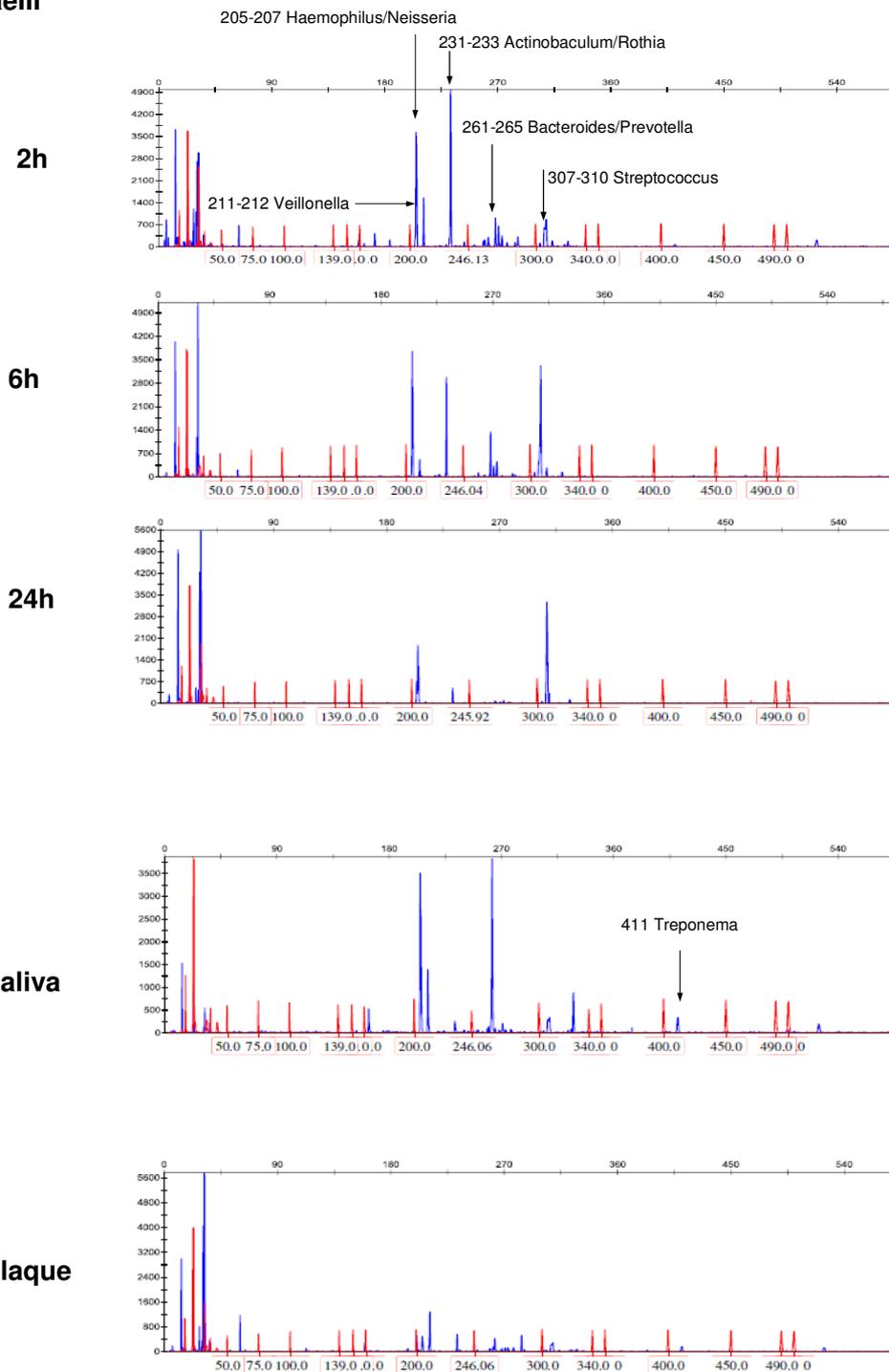


Abb. 5 Bakteriensignatur der oralen Proben nach Analyse mit T-RFLP (Proband 2); [rot dargestellt: Größenmarker, blau dargestellt: spezifische Signale]

Basierend auf bekannten Sequenzdaten konnte mithilfe der Datenbank einigen Bakterienspezies wie *Treponema sp.* eine spezifische Fragmentlänge (411nt) zugeordnet werden, andere Bakterienarten clusterten in bestimmten T-RF Gruppen und wurden entsprechend den Signalen mehrerer aufeinander folgender Fragmentlängen zugeordnet. Dies betraf unter anderem *Streptococcus sp.* (307-310nt) oder *Veillonella sp.*(211-212nt).

Einige Bakterienspezies wiesen identische T-RFs auf und werden in dieser Arbeit als Gruppen dargestellt, wie zum Beispiel *Actinobaculum sp.* und *Rothia sp.*, denen die Signale der Fragmentlängen 231-233nt zugeordnet wurden. Gleiches gilt für die *Haemophilus sp./Neisseria sp.* Gruppe(205-207nt) und die *Bacteroides sp./Prevotella sp.* Gruppe (261-265nt).

Die Daten der Fragmentlängenspektren von *MspI* und *HhaI* wurden als ergänzende Informationen und unabhängige Kontrollen stichprobenartig herangezogen.

Mithilfe der Größenmarker und der den Fragmentlängen zugeordneten Signalarea, erlaubten die Fragmentlängenspektren eine Begutachtung der zeitlichen Entwicklung einzelner Bakterienspezies.

Jedoch konnten nicht allen Peaks/ Restriktionsfragmenten mithilfe des Abgleichs mit den restriktionsenzym-spezifischen Datenbanken definierten Bakterienspezies zugewiesen werden.

5.3 Signalintensität

Die Untersuchungen mit der DGGE Methode erlaubten eine semiquantitative Analyse der spezifischen Bakterien-DNA in den Proben. Bezüglich der untersuchten Probanden zeigte sich eine Zunahme der Netto- Signalintensität über die Zeit (vgl Abb 6). Zur Beurteilung dieses quantitativen Aspekts wurden die DGGE Gele densitometrisch beurteilt, und für jede Probe die Signalintensität bestimmt. Hierfür wurden die Proben mit einer Hintergrundsubtraktionsmethode analysiert (Abb. 6).

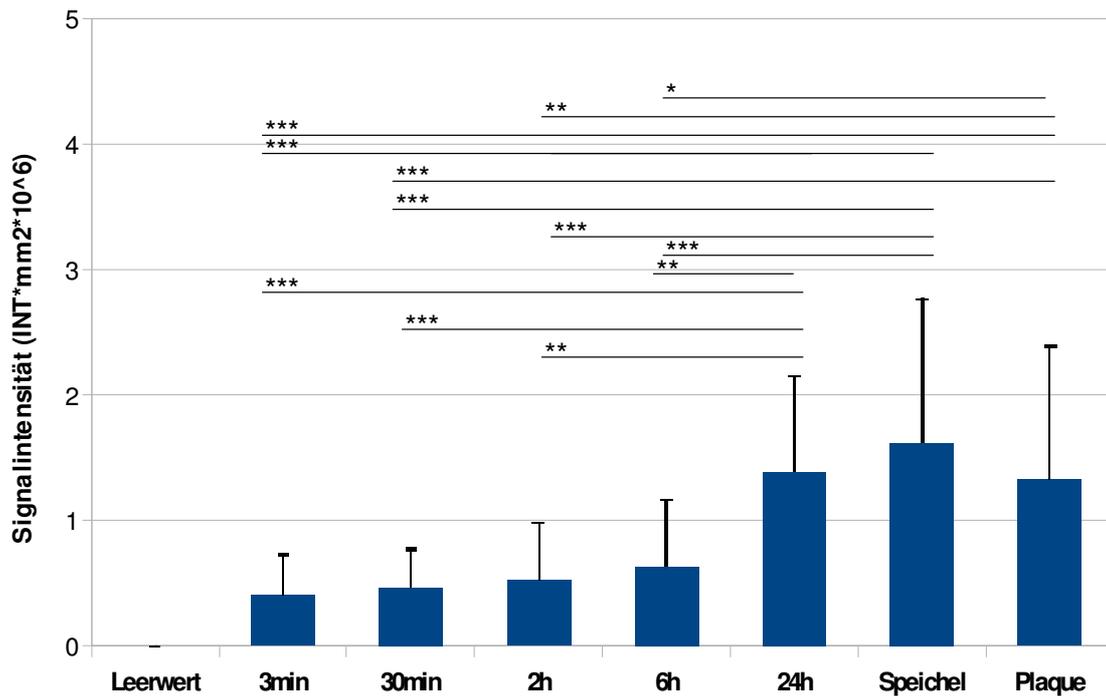


Abb. 6 DGGE Signalintensitätszunahme (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p = 0,0109$)

Neben dem Aspekt der mittleren Signalintensität für die Proben der unterschiedlichen Entnahmezeitpunkte wurde auch das Verhältnis von signalpositiven zu signalnegativen Probanden für die verschiedenen Zeitpunkte der Probenentnahme dokumentiert.

Zum Zeitpunkt 3 min wurden für 8 Probanden (33%) Bandenmuster detektiert. Die Proben vom Entnahmezeitpunkt 30 min und 2 h waren für 13 Probanden (54%) signalpositiv. Für 19 Probanden (79%) wurden Bandenmuster für die 6h Probe detektiert. Die 24 h Biofilmproben zeigten sich für alle 24 Probanden (100%) positiv.

Zusätzlich zu den über die Zeit *in situ* gewonnen Biofilmproben wurden die Speichel- und Plaqueproben vom Beginn und Ende der Untersuchung ausgewertet. Diese zeigten hohe Signalintensitäten und waren wie die 24h Biofilm Proben für alle 24 Probanden signalpositiv.

Eine Auswertung der Signalintensität mithilfe von T-RFLP war nicht möglich, da

die T-RFLP nur Rückschlüsse auf die relativen Häufigkeiten der verschiedenen T-RFs zulässt, jedoch keine Analyse der Gesamtsignalintensität einer Probe ermöglicht.

5.4 Diversitätsanalyse

Für die Analyse der Diversität der Proben wurden die DGGE und T-RFLP Daten bezüglich Bandenanzahl sowie T-RF Anzahl ausgewertet.

Die Analyse der **DGGE** Daten zeigte für die zu Beginn sowie am Ende der Untersuchungen gewonnenen Speichel- und Plaqueproben ähnliche Durchschnittswerte bezüglich der detektierten Bandenanzahlen. Die Plaqueproben zeigten leicht höhere Diversitätswerte als die entsprechenden Speichelproben. Diese Beobachtung war jedoch nicht von statistischer Signifikanz (Abb. 7).

Über die Zeit nahm die Diversität der Biofilmproben statistisch signifikant zu (vgl. Abb. 7). Die Biofilmproben wiesen eine Diversität von initial $2 \pm 0,7$ bis hin zu $4 \pm 1,4$ auf, erreichten jedoch nicht die Diversität der Speichel- (5 ± 2) oder Plaqueproben (6 ± 3) (vgl. Abb. 7, Abb. 8).

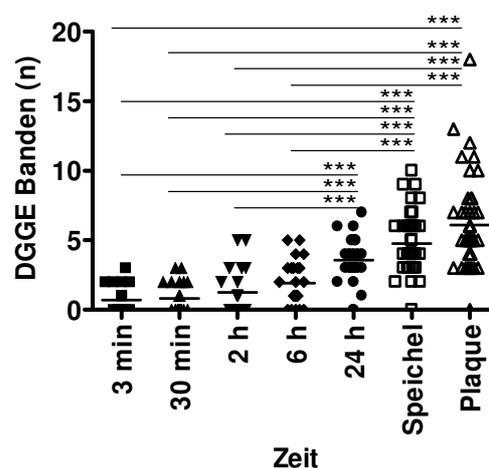


Abb. 7 Diversität der oralen Proben nach DGGE Analyse (***) $p < 0,001$)

Durch die parallele Untersuchung der Proben mit DGGE und T-RFLP konnte eine vergleichende Analyse der Diversitätsentwicklung über die Zeit zwischen den beiden Methoden selbst durchgeführt werden.

Hierfür wurden für jeden Entnahmezeitpunkt die unterschiedlichen Mittelwerte eines Zeitpunktes nach Analysemethode verglichen (Abb. 8).

Hierbei zeigten sich für die **T-RFLP** Methode im direkten Vergleich zur DGGE für jeden untersuchten Entnahmezeitpunkt eine signifikant höhere Diversität ($p < 0,0001$). Die T-RFLP Analysen zeigten für die 2 h Proben eine um den Faktor 6,4 höhere Diversität auf als die entsprechenden DGGE Analysen. Die 6 h Proben wiesen eine um den Faktor 3,7, die 24 h Proben eine um Faktor 2,6 höhere Diversität für T-RFLP auf. Die Speichel- und Plaqueproben zeigten eine um den Faktor 3,1 höhere Diversität in der T-RFLP Analyse. Für Proben mit einem sehr geringen DNA-Gehalt wie für die Proben der Zeitpunkte 3 min und 30 min zeigte sich die Sensitivität der T-RFLP Methode jedoch nicht als ausreichend. Die T-RFLP Diversitätsanalyse wies für beide Altersgruppen den höchsten Wert den Plaqueproben zu, gefolgt von den Speichelproben. Die dritthöchste Diversität wiesen die 2h Proben auf.

Für die 6 h und 24 h Proben wurden die niedrigsten T-RF Anzahlen nachgewiesen, während die Anzahl der Banden im DGGE Gel zeitabhängig kontinuierlich zunahm. 99% der ausgeschnittenen DGGE-Banden konnten mithilfe der Sequenzierung einer Bakterienspezies zugeordnet werden.

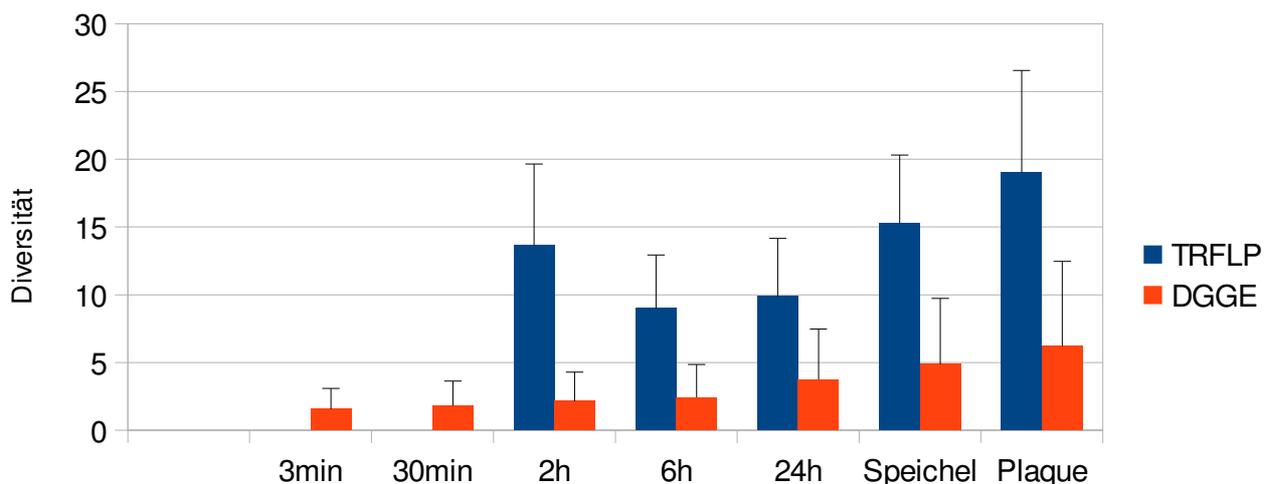


Abb. 8 Vergleichende Darstellung der Diversität DGGE/ T-RFLP

5.5 Qualitative Auswertung

194 Bakterienspezies konnten mithilfe der Sequenzierung der spezifischen DGGE- Banden nachgewiesen werden (siehe Tab. 2).

Tab. 2 Häufigkeit der verschiedenen Bakterienspezies bei den untersuchten Probanden nach Analyse mit DGGE

Streptococcus mitis	62,5%	Actinobaculum sp.	4,2%
Prevotella sp.	41,7%	Actinomyces massiliensis	4,2%
Lautropia mirabilis	37,5%	Actinomyces meyeri	4,2%
Capnocytophaga s.p.	29,2%	Actinomyces odontolyticus	4,2%
Leptotrichia sp.	29,2%	Bacteroides bacterium	4,2%
Prevotella melaninogenica	29,2%	Capnocytophaga gingivalis	4,2%
TM7 phylum sp.	29,2%	Capnocytophaga sputigena	4,2%
Neisseria sp.	25,0%	Corynebacterium matruchotii	4,2%
Prevotella denticola	20,8%	Cryptobacterium curtum	4,2%
Streptococcus sp.	20,8%	Delftia lacrestis	4,2%
Fusobacterium nucleatum	16,7%	Diaphorobacter sp.	4,2%
Lautropia sp.	16,7%	Fusobacterium periodonticum	4,2%
Veillonella parvula	16,7%	Gemella haemolysans	4,2%
Actinomyces sp.	12,5%	Granulicatella para adiacens	4,2%
Capnocytophaga granulosa	12,5%	Lachnospiraceae bacterium	4,2%
Catonella morbi	12,5%	Lactobacillus gaseri	4,2%
Fusobacterium nucleatum subsp.	12,5%	Leptotrichia shanii	4,2%
Polymorphum	12,5%	Leptotrichia trevisanii	4,2%
Granulicatella adiacens	12,5%	Leptotrichia wadeii	4,2%
Leptotrichia hofstadii	12,5%	Neisseria flarescens	4,2%
Leptotrichia sp.	8,3%	Neisseria mucosa	4,2%
Abiotropha defectiva	8,3%	Neisseria pharyngis	4,2%
Fusobacterium s.p.	8,3%	Neisseria sicca	4,2%
Neisseria meningitidis	8,3%	Porphyromonas gingivalis	4,2%
Porphyromonas catoniae	8,3%	Prevotella oris	4,2%
Prevotella oris	8,3%	Prevotella veroralis	4,2%
Prevotella tanneriae	8,3%	Rothia dentocariosa	4,2%
Rothia sp.	8,3%	Streptococcus australis	4,2%
Streptococcus orisuis	8,3%	Streptococcus criceti	4,2%
Treponema socranskii	8,3%	Streptococcus infantis	4,2%
Veillonella atypica	8,3%	Streptococcus pneumoniae	4,2%
Veillonella dispar	8,3%	Treponema sp.	4,2%

Die Sequenzierung der durch die DGGE aufgetrennten DNA Banden ermöglicht nicht nur die Differenzierung der PCR-Produkte nach Speziesgruppen, sondern macht auch die einzelnen Bakterienarten selbst unterscheidbar. Somit war es möglich seltene Bakterien wie *Treponema socranskii* oder *Delftia lacresti* mit der DGGE Methode nachzuweisen, ebenso nicht-kultivierbare Erreger wie *TM7 Phylum*.

Es zeigte sich eine Tendenz bezüglich der zeitlichen Detektierbarkeit einzelner Spezies. Besonders deutlich wurde dies bei *Streptococcus sp.* sowie in geringerem Ausmaß bei *Leptotrichia sp.*, die durchaus schon in den frühen Proben (<6 h) gefunden wurden, sowie bei *Neisseria sp.* welche vermehrt in den Proben späterer Untersuchungszeitpunkte gefunden wurden (≥ 6 h).

Besonders deutlich wurde dies für *Streptococcus sp.* bei den Probanden 2, 6, 9 bis 13, 15, 18 und 21 (siehe Anhang A, ). Die Probanden 8 und 12 zeigten diesen Aspekt für *Leptotrichia sp.* (siehe Anhang A, ).

Das beschriebene zeitliche Auftreten von *Neisseria sp.* zeigte sich vor allem bei den Probanden 6, 10, 12, 13, 15, 18, 19 und 21 bis 23 (siehe Anhang A, ).

Insgesamt kam mithilfe dieses Kultur-unabhängigen Verfahrens ein breites Bakterienspektrum zur Darstellung (Abb. 9). Es wurden gram negative und gram positive Bakterien aus dem aeroben mikroaerophilen und anaeroben Milieu sowie auch unkultivierbare Spezies detektiert.

Der Schwerpunkt lag im gram negativen Bereich mit Anteilen im aeroben und anaeroben Spektrum. Einzige Ausnahme stellte hierbei die gram positive Streptococcus Gruppe dar, die bei 83% der Probanden gefunden wurde. Zudem wurde *Actinomyces sp.* bei einem Fünftel der Probanden nachgewiesen (Abb. 9).

Aus der Gruppe der aeroben, gram negativen Spezies waren *Lautropia sp.* und *Neisseria sp.* mit Anteilen von 42% sowie 46% am häufigsten vertreten.

Für die Gruppe der gram negativen Anaerobier wurden die meisten Spezies nachgewiesen. Die Vertreter dieser Gruppe wiesen Werte von 71% (*Prevotella sp.*), 50% (*Leptotrichia sp.*) sowie 33% (*Fusobacterium sp.*) und 25% (*Veillonella sp.*) auf. 29% der Probanden waren zudem positiv für den nicht anzüchtbaren neuen Stamm *TM7 phylum*.

Auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet, da naturgemäß nur für einen Teil der DGGE Banden Sequenzdaten vorlagen, wodurch die Daten keine quantitative Aussage zuließen.

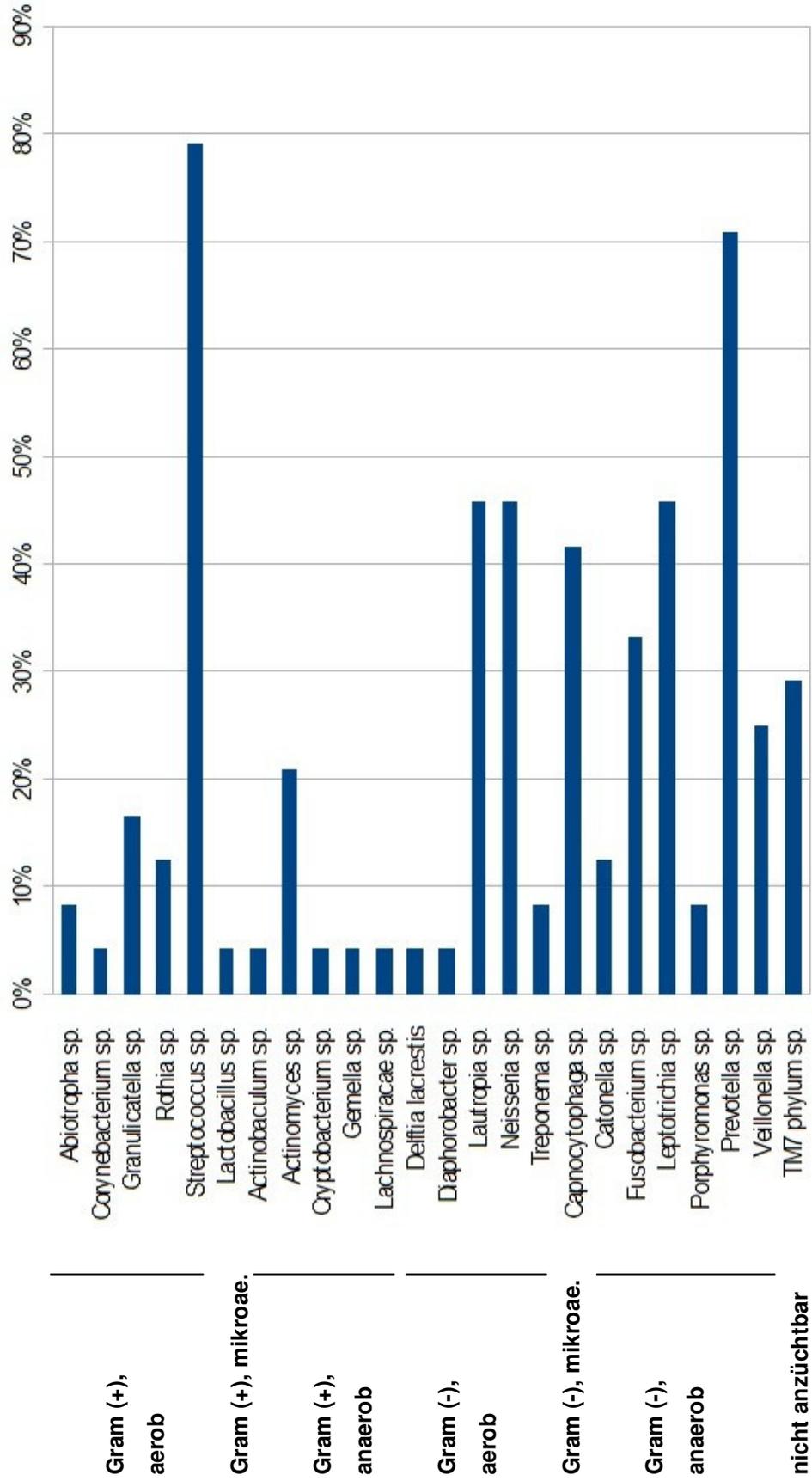


Abb. 9 Kumulatives DGGE Bacterienspektrum

Bei der **T-RFLP** basierten Analyse wiesen die drei untersuchten Kompartimente Biofilm, Speichel und Plaque bestimmte übereinstimmende prädominante Bakterienspezies auf.

Hierbei zeigte sich für die T-RF Signale der *Haemophilus sp./ Neisseria sp.* Gruppe und *Streptococcus sp.* in allen drei Kompartimenten eine deutliche Dominanz (vgl. Abb. 10, Abb. 11). Sie wiesen eine jeweilige relative Häufigkeit von mindestens 10% bis zu 47% (*Streptococcus sp.*, 24 h Biofilm), sowie bis zu 27% (*Haemophilus sp./ Neisseria sp.*, 24 h Biofilm) auf. Eine Ausnahme stellten die Plaqueproben dar, für die die *Haemophilus sp./ Neisseria sp.* Gruppe einen geringeren Wert von 7% erreichte, hier zeigt sich *Fusobacterium nucleatum* co-dominant mit *Streptococcus sp.* (Abb.10,11).

Ähnlichkeitsanalysen

Mithilfe des Chao-Jaccard Estimated Abundance Index (Chao-J.) können die generellen Ähnlichkeiten und Übereinstimmungen der mikrobiellen Profile kalkuliert werden (Chao et al. 2005). Hierbei entspricht ein Index von 1 identischen Bakteriensignaturen und ein Index von 0 Bakteriensignaturen ohne Übereinstimmung.

Die größte Übereinstimmung wiesen hierbei die 24 h Biofilm und die Speichelproben auf (Chao-J.= 0,692), gefolgt von den 24 h und 6 h Biofilmproben (Chao-J.= 0,645). Die niedrigste Ähnlichkeit zeigten die Plaqueproben im Vergleich mit den 24 h und 6 h Biofilmproben auf (jeweils Chao-J.=0,502).

Die vergleichenden Untersuchungen zeigten, dass die Biofilmproben mit längerer Entwicklungszeit den Speichelproben immer ähnlicher wurden (Chao-J.= 0,588 (2 h zu Speichel); 0,513 (6 h zu Speichel); 0,692 (24 h zu Speichel)).

Die Plaqueproben zeigten die zweithöchste Ähnlichkeit zu den Speichelproben (Chao-J.= 0,65).

Tab. 3 Similaritätsindices Speichel, Plaque, Biofilm

	6h	24h	Speichel	Plaque
2h	0,564	0,643	0,588	0,576
6h		0,645	0,513	0,502
24h			0,692	0,502
Speichel				0,65

Vergleich der Kompartimente Speichel und Plaque

Im direkten Vergleich der Bakteriensignaturen von Speichel- und Plaqueproben zeigte sich entsprechend der biomathematischen Similaritätsanalyse eine große Ähnlichkeit der beiden Kompartimente (Abb. 10).

Dennoch fielen Unterschiede bezüglich der großen dominanten Speziesgruppen auf. So wiesen die Plaqueproben als Spezies mit der größten relativen Häufigkeit *Fusobacterium nucleatum* mit $10,9 \pm 11,8\%$ auf, während *Fusobacterium nucleatum* für die Speichelproben mit einer statistisch signifikant ($p < 0,01$) geringeren relativen Häufigkeit von unter 1 % detektiert wurde. Für die Speichelproben zeigte hingegen die *Haemophilus sp./Neisseria sp.* Gruppe ($18,6 \pm 11\%$) die höchste relative Häufigkeit und einen signifikant höheren Wert ($p < 0,01$) als für die Plaqueproben.

Des Weiteren wiesen sowohl Plaque- als auch Speichelproben hohe Häufigkeiten für die *Bacteroides sp./Prevotella sp.* Gruppe sowie *Streptococcus sp.* auf. Die Speichelproben zeigten dabei die höheren Werte für diese Speziesgruppen, diese Unterschiede wiesen jedoch keine Signifikanz auf. Die relativen Häufigkeiten der anderen Bakterienspezies unterschieden sich für die beiden Kompartimente kaum.

Zusammenfassend zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der dominanten Spezies *Haemophilus sp./Neisseria sp.* und *Fusobacterium nucleatum*, für die übrigen T-RFs zeigte sich eine höhere Übereinstimmung.

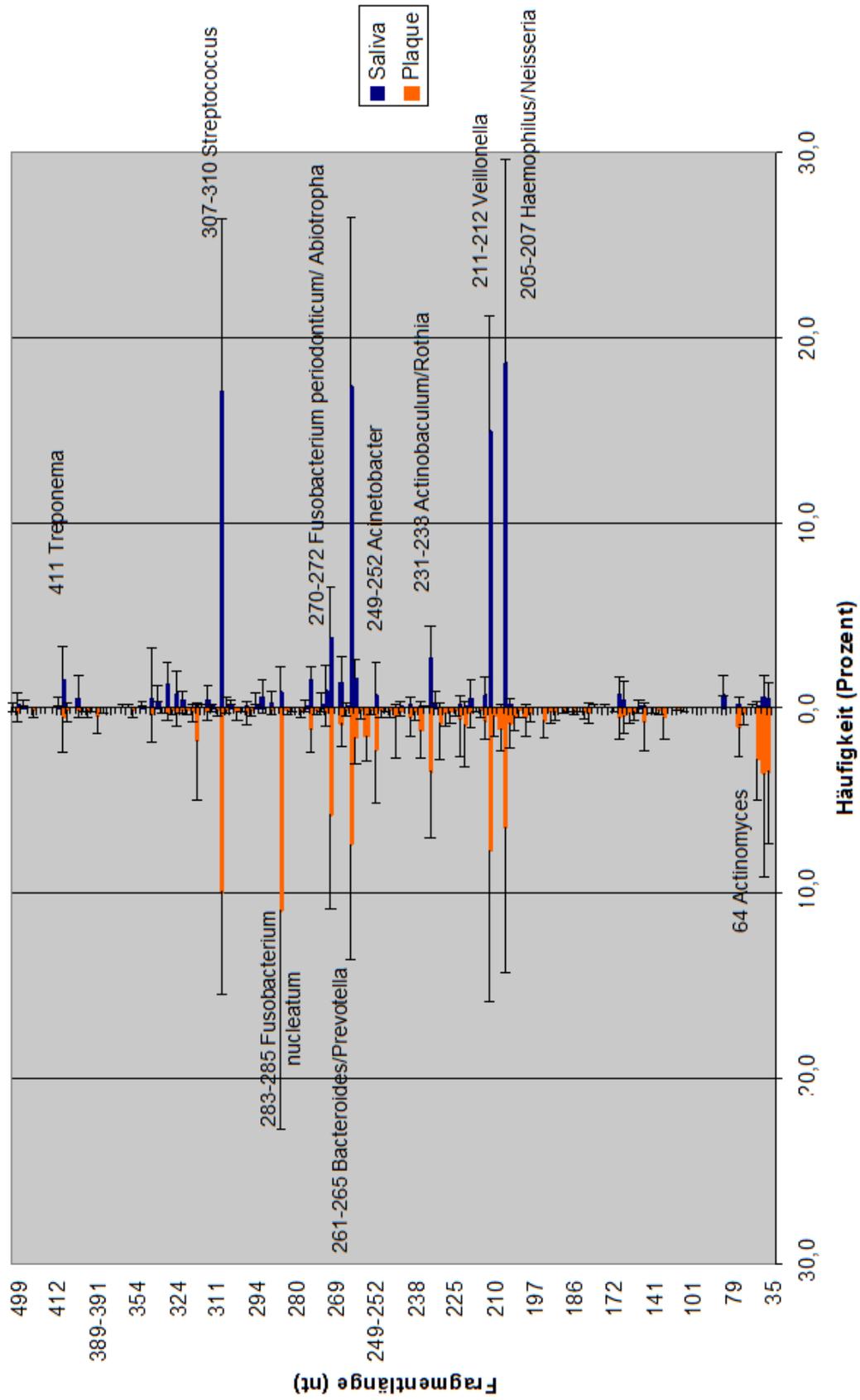


Abb. 10 Quantitative Analyse der kumulierten Bakteriensignaturen für Speichel, Plaque

Vergleich 2 h/24 h Biofilmproben

Neben dem Vergleich der relativen Häufigkeiten der Bakterienspezies der Kompartimente Speichel und Plaque wurden in dieser Arbeit die Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung des Biofilms über die Zeit untersucht. Analysiert wurden die detektierten Fragmentlängenspektren der Probenentnahmezeitpunkte 2 h und 24 h (vgl. Abb. 11).

Für das Fragmentlängenspektrum der Proben des Entnahmezeitpunktes 2h wiesen die Signale von *Streptococcus sp.* und die *Haemophilus sp./Neisseria sp.* Gruppe die höchsten relativen Häufigkeitswerte auf. Diese beiden Bakterienspezies dominierten ebenso das Fragmentlängenspektrum der 24 h Proben, wobei *Streptococcus sp.* für die 24 h Proben einen signifikant ($p < 0,05$) höheren Wert aufwies ($21,3 \pm 20,8\%$ vs. $37,4 \pm 18,9\%$).

Außer für die *Fusobacterium periodonticum/Abiotropha sp.* Gruppe (signifikant höherer Wert für 2 h ($p < 0,05$)) waren keine weiteren signifikanten Unterschiede bezüglich der relativen Häufigkeitswerte der einzelnen Bakterienspezies festzustellen.

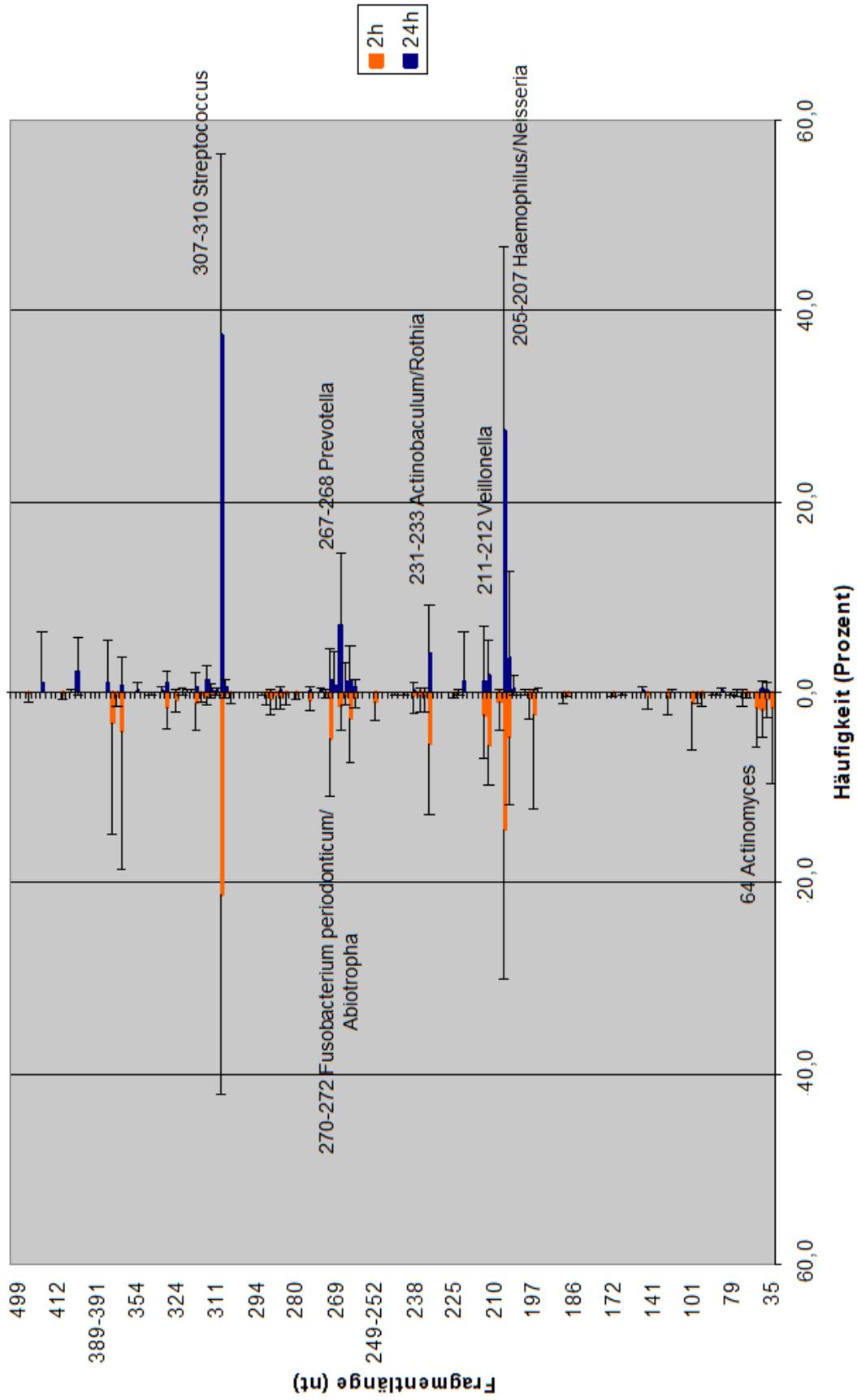


Abb.11 Quantitative Analyse der kumulierten Bakteriensignaturen der Biofilmproben 2 h/24 h

Relative Häufigkeiten einzelner Bakterienspezies der verschiedenen oralen Kompartimente

Neben der vergleichenden Darstellung der kumulierten Bakteriensignaturen der oralen Kompartimente wurden auch die relativen Häufigkeiten einzelner Bakterienspezies bezüglich eben dieser Kompartimente untersucht.

Actinomyces sp., die *Neisseria sp./Haemophilus sp.* Gruppe, *Veillonella sp.*, die *Rothia sp./Actinobaculum sp.* Gruppe, *Acinetobacter sp.*, die *Bacteroides sp./Prevotella sp.* Gruppe, die *Fusobacterium periodonticum/Abiotropha sp.* Gruppe, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sp.* und *Treponema sp.* wurden hierbei auf der Basis der zeitlichen Entwicklung ihrer relativen Häufigkeit an den Bakterienspektren der Biofilmproben und ihrer relativen Häufigkeit an den Speichel- und Plaqueproben jeweils gesondert analysiert (Abb.12).

Die quantitativen Daten der Bakterienspezies wurden mithilfe nicht-parametrischer statistischer Tests, dem Kruskal-Wallis Test, sowie dem Dunn Multiple Comparison Test als Folgetest, ausgewertet.

Actinomyces sp. zeigte signifikant ($p < 0,001$) höhere relative Häufigkeit dieser Bakterienspezies für die Plaqueproben im Vergleich zu allen anderen Proben. Zwischen den Biofilmproben sowie den Speichelproben bestanden dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Die *Neisseria sp./Haemophilus sp.* Gruppe zeigte durchweg hohe Werte für alle Kompartimente und wies keine Unterschiede für die Biofilm- und Speichelproben untereinander auf. Die 24 h Biofilmproben ($p < 0,001$) sowie die Speichelproben ($p < 0,01$) waren jedoch signifikant von den Plaqueproben unterscheidbar.

Veillonella sp. zeigte hohe Werte für die Speichel und Plaqueproben. Zudem zeigte sich für die Biofilmproben der Trend, dass mit zunehmender Zeit die Werte der relativen Häufigkeiten für *Veillonella sp.* abnahmen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede für die 6 h- und 24 h-Biofilmproben sowie bezüglich Speichel und Plaque ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,01$ für 24 h vs. Plaque). Ebenso statistisch signifikant unterschiedlich zeigten sich die Biofilmproben der Zeitpunkte 2 h und 6 h ($p < 0,01$) und die 2 h-Biofilmproben im Vergleich mit den

Speichelproben ($p < 0,01$).

Für die *Rothia sp./Actinobaculum sp.* Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede für die Proben der unterschiedlichen Kompartimente sowie den zeitlichen Verlauf der Biofilmproben nachgewiesen werden.

Acinetobacter sp. zeigte generell vergleichsweise niedrige Häufigkeitswerte über alle Proben hinweg. Signifikante Unterschiede für die relativen Häufigkeiten wiesen nur die 6 h Biofilmproben im Vergleich mit den Plaqueproben auf, sowie die 24 h Biofilmproben verglichen mit den Plaqueproben.

Die relativen Häufigkeitswerte der *Bacteroides sp./Prevotella sp.* Gruppe waren durch hohe Werte für Speichel und Plaque und relativ niedrige Werte für die Biofilmproben gekennzeichnet. Hier wiesen alle Biofilmproben signifikante Unterschiede zu den Plaque- und Speichelproben auf ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$ für 2 h vs. Plaque).

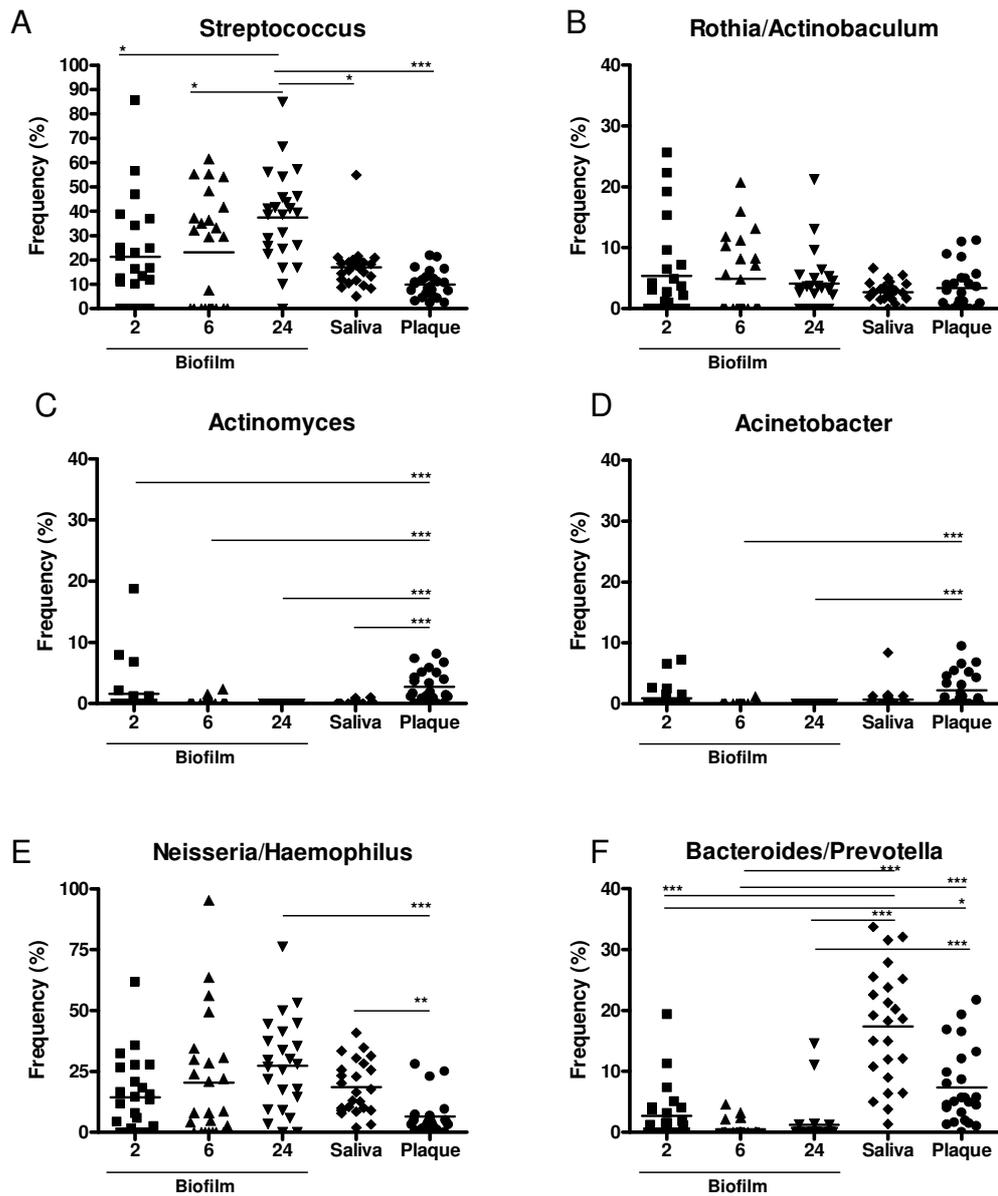
Die *Fusobacterium periodonticum/Abiotropha sp.* Gruppe zeigte für die Biofilmproben signifikante Unterschiede zwischen den 2 h Proben und den 6 h Proben ($p < 0,01$) sowie den 24 h Proben ($p < 0,05$). Des Weiteren stellten sich die 6 h- und 24 h-Biofilmproben sowie die Speichel- und Plaqueproben ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,01$ für 24 h vs. Speichel) als signifikant unterschiedlich dar.

Bei der speziesspezifischen Analyse fiel die prägnante Verteilung von *Fusobacterium nucleatum* auf. Die hohen relativen Häufigkeiten an den Plaqueproben der 24 Probanden unterschieden sich statistisch signifikant von den vergleichsweise sehr niedrigen Werte für die beiden anderen Kompartimente ($p < 0,01$ für Speichel- bzw. $p < 0,001$ für die Biofilmproben).

Die durchweg hohen relativen Anteile von *Streptococcus sp.* zeigten eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Zunahme über die Zeit für die Biofilmproben. Die höchsten Werte mit einem entsprechenden Mittelwert von fast 40% kennzeichneten die 24 h Biofilmproben, die sich, entsprechend der vergleichsweise niedrigeren Werte der Speichel- und Plaqueproben, signifikant von diesen unterschieden ($p < 0,001$ für Plaque bzw. $p < 0,05$ für Speichel).

Für *Treponema sp.* zeigte die Auswertung nur für die Speichelproben signifikant

höhere Werte auf ($p < 0,001$), welche von jeglichen anderen Proben auf diesem hohen Signifikanzniveau zu unterscheiden waren. Insgesamt wies *Treponema sp.* jedoch sehr niedrige relative Häufigkeiten auf.



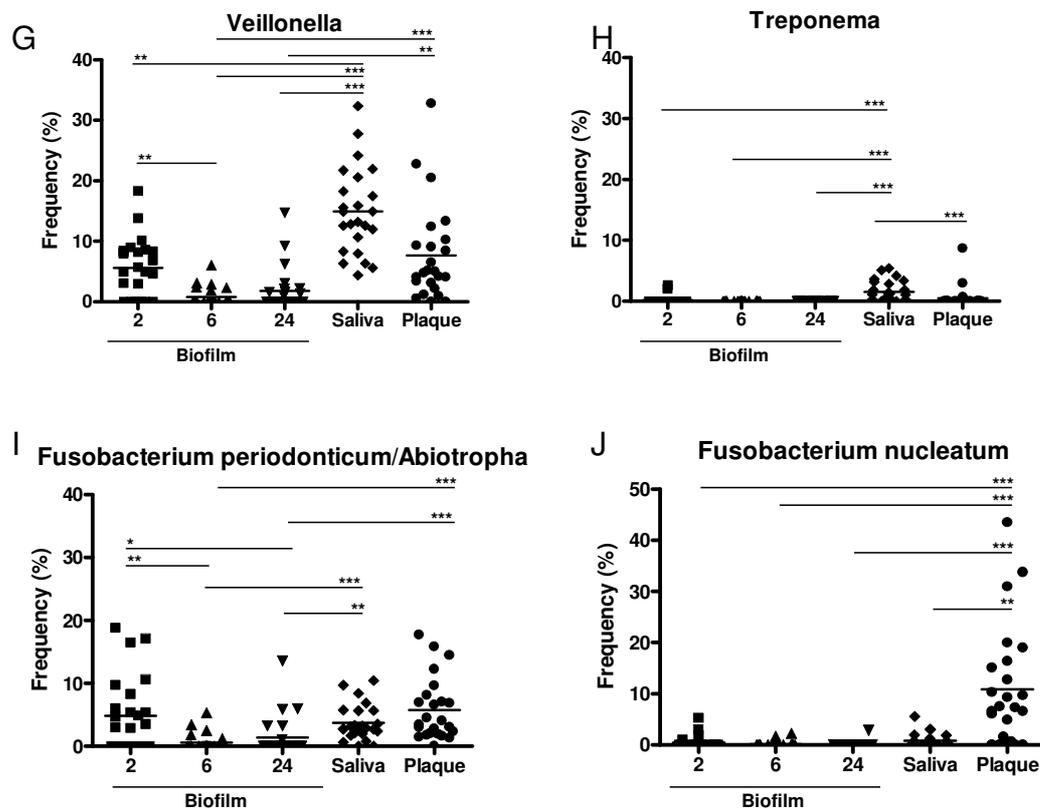


Abb. 12 Relative Häufigkeiten der einzelnen Bakterienspezies an den verschiedenen Kompartimenten. Statistisch signifikante Unterschiede: *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$

Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Spezies zeigte deutlich, dass die einzelnen Bakterienarten in verschiedenen Kompartimenten unterschiedlich vertreten sind. Zum Teil zeigten sich diese Unterschiede sehr prägnant, wie im Fall von *Fusobacterium nucleatum*. Andere wiesen hingegen kaum oder gar keine Unterschiede auf wie die *Rothia sp./Actinobaculum sp.* Gruppe.

Auch in dieser Analyse präsentierten sich Spezies wie *Streptococcus sp.* oder die *Neisseria sp./Haemophilus sp.* Gruppe quantitativ klar dominierend.

Die Analyse mithilfe der T-RFLP erlaubte die Unterscheidung der Bakterien auf Speziesgruppenniveau (siehe Tab. 4). In den Proben aller Probanden wurden *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium sp.*, die *Neisseria sp./Haemophilus sp.* Gruppe, *Veillonella sp.* und *Streptococcus sp.* nachgewiesen. Alle Probanden waren somit

positiv für sowohl Anaerobier als auch Aerobier aus dem gram negativen und gram positiven Bereich. Insgesamt stellte sich ein gram negativ dominiertes Bakterienspektrum dar, in dem der Anteil aerober Bakterienarten überwog. Die Bakterienspektren der frühen Entnahmezeitpunkte 3min und 30min konnten mit der T-RFLP Methode nicht erfasst werden da sie unter der Nachweisgrenze lagen.

Die mithilfe von DGGE und T-RFLP nachgewiesenen Bakterienspektren wiesen qualitative und quantitative Unterschiede auf (siehe Tab. 4).

Tab. 4 Gegenüberstellung der Häufigkeiten der verschiedenen Bakterienspezies nach Analyse mit DGGE und T-RFLP
(N.A.: nicht analysierbar, mit vorliegender Datenbank nicht zuzuordnen)

Speziesgruppe	DGGE	T-RFLP
Streptococcus sp.	83%	100%
Prevotella sp.	71%	96%
Leptotrichia sp.	50%	8%
Neisseria sp.	46%	100%
Capnocytophaga sp.	42%	N.A.
Lautropia sp.	42%	8%
Fusobacterium sp.	33%	100%
TM7 phylum sp.	29%	N.A.
Veillonella sp.	25%	100%
Actinomyces sp.	21%	88%
Granulicatella sp.	17%	96%
Catonella sp.	13%	42%
Rothia sp.	13%	96%
Abiotropha sp.	8%	N.A.
Lactobacillus sp.	8%	N.A.
Porphyromonas sp.	8%	N.A.
Treponema sp.	8%	88%
Corynebacterium sp.	4%	N.A.
Cryptobacterium sp.	4%	N.A.
Delftia sp.	4%	N.A.
Diaphorobacter sp.	4%	N.A.
Gemella sp.	4%	N.A.
Lachnospiraceae sp.	4%	N.A.
Bacteroides sp.	-	100%
Acinetobacter sp.	-	79%
Burkholderia sp.	-	79%
Enterococcus sp.	-	38%
Alcaligenes sp.	-	29%
Nocardia sp.	-	29%

6 Diskussion

DGGE und T-RFLP sind zwei Methoden zur Analyse des oralen Mikrobioms. Sie ermöglichen eine kulturunabhängige Untersuchung von Diversität und Bakterienspektren. Da über 50% des oralen Mikrobioms bisher als nicht kultivierbar gelten (Aas et al. 2005), ermöglichen diese Methoden differenzierte Einsichten in qualitative und quantitative Merkmale oraler bakterieller Lebensgemeinschaften und qualifizieren sich damit für eine umfangreiche Analyse der zeitlichen Entwicklung der bakteriellen Zusammensetzung dentaler Biofilme (Moesender et al. 1999; Dunbar et al. 2000). Die auf diesen beiden Methoden basierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen im Folgenden unter zwei Gesichtspunkten diskutiert werden. Dabei sollen zunächst die Methoden selbst verglichen werden; im Anschluss werden die Ergebnisse der Bakterienspektren der oralen Kompartimente und des oralen Biofilms diskutiert.

Tab. 5 Spezifische Charakteristika der DGGE und T-RFLP

DGGE	TRFLP
Computerunterstützte Auswertung <ul style="list-style-type: none"> - Diversität (Vielzahl der Banden) - Signalintensität 	Computerbasierte Auswertung <ul style="list-style-type: none"> - Diversität (Anzahl der Peaks) - Quantitativ (Area der Peaks)
Bakteriennachweis aus einzelnen Banden auf Speziesniveau <ul style="list-style-type: none"> - Sequenzierung spezifischer Banden 	Globaler Bakteriennachweis für Bakteriengruppen <ul style="list-style-type: none"> - Identifizierung mit T-RF Datenbank
Direkte Auftrennung des 16S rDNA- PCR Produktes in der DGGE <ul style="list-style-type: none"> → hohe Sensitivität begrenzte Standardisierbarkeit	Voraussetzung: DNA-Menge des PCR Produkts >10ng/ml <ul style="list-style-type: none"> → Sensitivität geringer gute Standardisierbarkeit

Die **DGGE**, die optische Darstellung von Bakterienspektren mit der Möglichkeit der direkten Sequenzierung detektierter PCR-Produkte, eröffnet gute Möglichkeiten der qualitativen aber auch semiquantitativen Analyse.

In früheren Untersuchungen zeigte sich, dass die relative Nachweisgrenze der DGGE bei einem Anteil von $\geq 1\%$ an der gesamten Bakterien-DNA einer Probe liegt (Jiang et al. 2011). Es wird davon ausgegangen, dass jede nachweisbare DGGE- Bande die DNA aus mindestens 10^3 Bakterienzellen enthält (Cocolin et al. 2000).

Die qualitative Analyse der DGGE basiert bekannterweise auf der Separation bakterienspezifischer 16S rDNA PCR-Produkte mithilfe eines chemischen Gradienten. Dieser Gradient wird manuell generiert, dadurch durchlaufen die Proben unterschiedlicher Probanden immer leicht differente Gradienten, eine industriell vorgefertigte Standardisierung wird nicht angeboten bzw. ist nicht möglich. Der im Rahmen dieser Arbeit genutzte Gradient von 40%/70% stellt einen Kompromiss zwischen einer höheren Auflösung engerer Gradienten (Muzyer et al. 1993) und der gewünschten Abbildung eines breiten Bakterienspektrums dar.

Bei der Auswertung der DGGE- Gele wurden Bakterienspezies nachgewiesen, die mehr als einer Bande in einer Probe zuzuordnen waren. Bei Fujimoto et al. (2003) werden als Ursachen für die Abbildung einer Bakterienspezies in mehreren, nicht benachbarten DGGE- Banden die Heterogenität des 16Sr DNA Operons genannt, sowie die Möglichkeit einer akzidentiell inkorrekten PCR Amplifikation.

Nicht immer gelingt die Typisierung spezifischer Bakterienspezies aus definierten Banden, da auch Banden verschiedener Spezies komigrieren können. Dies resultiert in Mischsequenzen, die keine weitere Differenzierung zulassen. Dies stellte jedoch kein größeres Problem in dieser Studie dar.

Die **T-RFLP** als Methode für die Analyse komplexer Mikrobiome wie dentaler Plaque oder Speichel einzusetzen, wurde unter verschiedenen Aspekten beleuchtet (Dunbar et al. 2001):

- Abgrenzung und Differenzierung unterschiedlicher bakterieller Lebensgemeinschaften
- Analyse der Diversität bakterieller Lebensgemeinschaften
- Analyse der Struktur von Mikrobiomen
- Identifizierung einzelner, spezifischer Bakterienarten

Vorraussetzung für eine sinnvolle T-RFLP basierte Analyse ist ein DNA- Gehalt von über 10ng/µl in den zu untersuchenden Proben (16S rDNA PCR Produkt). Die DNA-Mengen der Proben unter diesem Wert sind zu gering, um sie standardisieren zu können, eine Standardisierung der analysierten DNA-Menge pro Probe ist jedoch für eine kontextbezogene Betrachtung der Ergebnisse essentiell (Dunbar et al. 2001). Bei geringeren DNA- Mengen wird das „Hintergrundrauschen“, also die Anzahl nicht reproduzierbarer zufälliger Peaks, welche auf akzidentiell amplifizierte DNA-Fragmenten zurückgeführt werden so dominant, dass die Artefakte nicht mehr von den eigentlichen T-RFs unterschieden werden können (Dunbar et al. 2001). Die Biofilmproben der Entnahmezeitpunkte 3min und 30min wiesen zu geringe DNA- Mengen auf und konnten somit nicht mit T-RFLP analysiert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Auswahl der Restriktionsenzyme. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden die Restriktionsenzyme *HaeIII*, *HhaI* sowie *MspI* eingesetzt.

Hierbei zeigte das Enzym *HaeIII* das größte Auflösungsvermögen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen früherer Arbeiten. Moyer et al. (1996) ordneten alle gängigen Restriktionsenzyme drei Gruppen zu- je nach Nachweismaximum bezüglich des Fragmentlängenspektrums. *HaeIII* gehört hierbei der Gruppe 2 an, die das breiteste Spektrum von 250-300bp sowie 400-1000bp besitzt. Zudem

zeigte sich im Rahmen dieser Untersuchungen, dass *HaellI* sein absolutes Nachweismaximum bei etwa 300nt und somit im Bereich der T-RFs der *Streptococcus sp.* Gruppe, einem der wichtigsten Vertreter der oralen Flora, hat. *MspI* gehört hingegen der Gruppe 1 (250-550 bp) an, *HhaI* wiederum der Gruppe 3 (250-500 bp). Die hier vorliegende Enzymkombination qualifiziert sich somit für umfassende Untersuchungen zur Entwicklung von dentalem Biofilm, sowie der Kompartimente Speichel und Plaque. Da das Auflösungsvermögen der T-RFLP bezüglich Bakterienspezies vor allem durch die eingesetzten Restriktionsenzyme beeinflusst wird (Dickie et al. 2007), beziehen sich alle Analysen und Statistiken auf die Fragmentlängenspektren von *HaellI*.

Beim Abgleich der einzelnen Fragmentlängenspektren mit den entsprechenden Datenbanken zeigten sich zwei Auffälligkeiten.

Theoretisch sollte für die T-RFLP jeweils genau eine Bakterienspezies spezifisch für einen Signalpeak eines T-RF sein. Bezüglich der untersuchten Spektren zeigen sich jedoch auf der einen Seite einzelne Peaks mehreren Bakterienspezies zugehörig, auf der anderen Seite werden einzelne Bakterienarten von mehreren Peaks repräsentiert. Beide Phänomene sind in der Literatur beschrieben. So begründen Ahmad et al. (2011) die Zuordnung mehrerer, nur entfernt verwandter, Bakterienspezies zu einem Signalpeak mit der so genannten „OTU (operational taxonomic unit) Homoplasy“, was die gemeinsame Migration von unterschiedlichen PCR-Amplifikaten in der Kapillarelektrophorese aufgrund ihrer ähnlichen Elektrophoreseeigenschaften bezeichnet.

Die Zuordnung einer Bakterienspezies zu mehreren T-RFs wurde in früheren Untersuchungen auf unterschiedliche Gründe zurückgeführt. Zum einen wird auf eine mögliche echte Zugehörigkeit mehrerer T-RFs zu einer Bakterienspezies verwiesen (Dickie et al. 2007), zum anderen auf methodische Probleme wie Fehler in den Restriktionsenzym-spezifischen Datenbanken. Diese können zum großen Teil durch den Abgleich mit den Fragmentlängenspektren anderer Restriktionsenzyme abgedeckt werden (Edwards et al. 2004). Eine andere Erklärung sind Pseudo- T- RFs: Fluoreszenz-markierte T-RFs, die jedoch nicht an der eigentlichen terminalen Restriktionsschnittstelle geschnitten wurden (Egert,

Friedrich 2003).

Mit den T-RFLP Ergebnissen der hier vorgestellten Untersuchungen können Aussagen über die Bakteriensignaturen der einzelnen Kompartimente, sowie der zeitlich aufeinander folgenden Biofilmproben getroffen und das Verhalten einzelner Bakterienspezies im Prozess der Biofilmmaturation charakterisiert werden.

Sie werden ergänzt durch die im Rahmen dieser Arbeit generierte DGGE- Analyse des Bakterienspektrums der quantitativ dominanten Bakterienspezies der drei untersuchten Kompartimente Speichel, Plaque und Biofilm, sowie des semiquantitativen Aspekts der Biofilmentwicklung über die Zeit.

Aufgrund der Limitationen der DGGE zur standardisierten quantitativen Auswertung basieren alle statistischen Analysen auf den Daten der T-RFLP Methode.

Der **semiquantitative Aspekt** der Biofilmentwicklung wurde anhand der Signalintensität der DGGE- Gele analysiert. Die aufgezeigte Verstärkung der Signalintensität über die Zeit ist mit einer Zunahme der bakteriellen Biomasse (Fuchs 2010, Davies 2004) und somit mit dem erwarteten Wachstum des Biofilms über die Zeit gleichzusetzen.

Die DGGE-Bandenanzahl steht zudem in direktem Zusammenhang zur **Diversität** einer Probe (Fuchs 2010). Die aufgezeigte Zunahme der Anzahl der Banden über die Zeit ist somit proportional zur zunehmenden Diversität der Biofilmproben. Die T-RFLP Analyse ergab ebenso eine Zunahme der Diversität über die Zeit. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Singh et al. 2006) zeigt sie jedoch signifikant höhere Diversitätswerte als die DGGE bezüglich der Biofilmproben $\geq 2h$, sowie der Speichel- und Plaque- Proben.

Die Zunahme der Diversität wird in früheren Studien auf die Koaggregation von unterschiedlichen Bakterienspezies, sowie andere Faktoren zurückgeführt, welche die vermehrte Anlagerung vielfältiger Bakterienarten mit fortschreitender Maturation des Biofilms ermöglichen bzw. begünstigen. Der Mechanismus der Koaggregation ist zudem essentiell für die Anlagerung der zu den „late colonizers“

zählenden Bakterien wie *Fusobacterium nucleatum* (Kolenbrander et al. 1993).

Die Annahme dieses Zusammenhangs wird durch die Ergebnisse der qualitativen Auswertung der Biofilmproben unterstützt (vgl. Hannig et al. 2007; Kolenbrander et al. 2011). Diese erbringt für die Proben früher Entnahmepunkte vor allem den Nachweis für Bakterienspezies wie *Streptococcus sp.*, die durch ihre Virulenzfaktoren wie die IgA₁-Protease oder ihre Glykosidaseaktivität die Fähigkeit zur Primärbesiedlung von u.a. dentalen Oberflächen besitzen und gleichzeitig die Anlagerung weiterer Bakterienspezies begünstigen. Auch das schwerpunktmässige Auftreten von z.B. *Neisseria sp.* oder *Corynebacterium sp.* zu späteren Untersuchungszeitpunkten lässt sich hiermit in Verbindung bringen, da beide u.a. Lactat, ein Stoffwechselendprodukt von *Streptococcus sp.*, als Nährstoffquelle nutzen können (Marsh et al. 2003).

Das DGGE basierte **Bakterienspektrum** zeigt eine große Bandbreite. Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Bakterienspezies sind Vertreter fünf der sieben Bakterienstämme (Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria) und eines der zwei nicht anzüchtbaren Phyla (TM7 phylum, OP11), die als residentielle Mundflora angenommen werden (Paster et al. 2001; Aas et al. 2005). Gram positive, gram negative, aerobe, anaerobe sowie mikroaerophile Bakterienspezies können nachgewiesen werden. Die Dominanz liegt jedoch bei den gram negativen Bakterienspezies mit Schwerpunkt auf den Anaerobiern. Das Auftreten des nicht anzüchtbaren Bakterienstamms TM7 phylum bei nahezu einem Drittel aller Probanden unterstreicht nochmals die Überlegenheit Kultur-unabhängiger Verfahren für die Analyse komplexer Mikrobiome (v. Wintzingerode 1999; Vaz-Moreira et al. 2011).

Die Analyse des nachweisbaren Bakterienspektrums mithilfe der T-RFLP wies für alle Probanden *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium sp.*, die *Neisseria/Haemophilus sp.* Gruppe, *Veillonella sp.* und *Streptococcus sp.* nach. Alle Probanden zeigten sich entsprechend positiv für sowohl Anaerobier, als auch Aerobier aus dem gram negativen und gram positiven Bereich. Insgesamt stellt sich ein gram negativ dominiertes Bakterienspektrum dar, in dem der Anteil aerober Bakterienarten überwiegt. Die Bakterienspektren der frühen Entnahmezeitpunkte 3 min und

30 min konnten mit der T-RFLP Methode nicht erfasst werden, ebenso wenig wie TM7 phylum oder mikroaerophile Spezies.

Die Bakterienspektren der beiden Analysemethoden zeigen sowohl qualitative, als auch quantitative Abweichungen. Beide wiesen Bakterienspezies nach, die für die jeweils andere Methode nicht gezeigt werden konnten. Auch die Nachweisquoten unterscheiden sich zum Teil sehr stark (z.B. *Veillonella sp.*, *Treponema sp.*, *Actinomyces sp.*: höhere Werte für T-RFLP; *Leptotrichia sp.*: höhere Werte für DGGE)

Streptococcus sp. und *Prevotella sp.*, die zu den prädominanten Bakterienspezies der Mundflora gezählt werden (Ling et al. 2010), weisen, wie auch *Neisseria sp.*, einen erwartungsgemäß hohen Positivanteil (>70% DGGE; >96% T-RFLP) auf. Auch die Analysen der anderen Bakterienspezies decken sich sinnvoll mit den Erwartungswerten der Literatur. Im Gegensatz dazu kommen andere in der Literatur als prädominant definierte Bakterienspezies wie *Haemophilus sp.* oder *Eikenella sp.* mit der DGGE nicht zur Darstellung. T-RFLP führt den Nachweis für *Haemophilus sp.* jedoch nicht für *Eikenella sp.*

Im Rahmen der T-RFLP Analyse wurden die **Bakteriensignaturen** der drei unterschiedlichen Kompartimente gegenübergestellt.

Frühere Untersuchungen zeigten im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit die **Dominanz von *Streptococcus sp.*** für fast alle oralen Kompartimente (Aas et al. 2005; Cephas et al. 2011). Kreth et al. (2009) beschreiben sogar einen Anteil von 80% an Oralstreptokokken in der frühen Phase dentaler Biofilme.

Cephas et al. (2011) definierten in Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten *Neisseria sp.*, *Haemophilus sp.* sowie *Streptococcus sp.* als prädominante Bakterienarten des Speichels. Auch der quantitativ etwas geringere Nachweis der *Haemophilus sp./Neisseria sp.* Gruppe in den Plaqueproben deckt sich mit der Literatur. Marsh et al. (2005) beschreiben die beiden Bakterienspezies als zwar nicht dominant, ordnen sie jedoch der residenten Flora der dentalen Plaque zu.

Fusobacterium nucleatum zeigt nur für die Plaqueproben relevante Häufigkeiten

auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass *F. nucleatum* der Gruppe der „late colonizers“ angehört, also den Bakterienspezies, die erst in späten Stadien der Biofilmmaturation nachweisbar sind (Marsh et al. 2005 nach Kolenbrander et al. 1993).

Bei der Betrachtung der Fragmentlängenspektren der zeitlich unterschiedlichen Biofilmprouben, sowie bei der Aufschlüsselung der unterschiedlichen relativen Häufigkeiten der einzelnen Bakterienspezies zeigt sich eine signifikante Zunahme von *Streptococcus sp.* Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen früherer Studien (Nyvad, Fejerskov 1987; Rehmer 2008). Für diese starke Dominanz einer Spezies werden mehrere Gründe angeführt. Zum einen zählen hierzu die exzellenten Anbindungsmöglichkeiten von *Streptococcus sp.* an die Zahnoberfläche z.B. durch die von *Streptococcus sp.* sezernierte Glykosyltransferase. Diese synthetisiert Glukane, die *Streptococcus sp.* wiederum als Rezeptor nutzen kann. Zum anderen hat *Streptococcus sp.* eine sehr kurze Verdopplungszeit, die im Gegensatz zu vielen anderen Bakterienarten der oralen Flora nur 1,4h beträgt. (Schilling et al. 1992; Rehmer 2005). Die Generationszeit von z.B. *Treponema sp.* beträgt hingegen 4-18h.

Parallel zur Gegenüberstellung der drei Kompartimente an sich wurde die Entwicklung des dentalen Biofilms über die Zeit anhand der Fragmentlängenspektren der Biofilmprouben der unterschiedlichen Entnahmezeitpunkte analysiert. Die gängige Literatur beschreibt für den dentalen Biofilm generell eine Wandlung vom gram positiven, aerob dominierten zum gram negativen, anaerob bestimmten Bakterienspektrum über die Zeit (Kolenbrander et al. 1993; Zijnga et al. 2010).

Basiert auf den Daten der vorliegenden Untersuchung wurde folgendes Modell für die Entwicklung von bakteriellen Lebensgemeinschaften in frühen dentalen Biofilmen entwickelt:

Die dentale **Biofilmbildung** innerhalb der ersten 24 Stunden stellt einen dynamischen Prozess dar, der in **zwei Phasen** eingeteilt werden kann: die selektive Adhäsion ($\leq 2h$) und die selektive Expansion ($> 2h$).

Die Phase der *selektiven Adhäsion* ist dominiert von der Anlagerung aerober Bakterienspezies wie *Streptococcus sp.*, *Rothia sp.* oder *Neisseria sp.* Anaerobe, gram negative Bakterienarten wie *Veillonella sp.* und *Fusobacterium periodonticum* sind ebenfalls im früh adhärenen Biofilm vertreten. Die in der gängigen Literatur als wichtige *early colonizer* im 2h- Biofilm beschriebenen *Actinomyces sp.* (Li et al. 2004) zeigten in der vorliegenden Analyse nur minimale Anteiligkeiten, weshalb sie im vorliegenden Modell eine untergeordnete Rolle spielen. Andere im Speichel enthaltene Bakterienspezies wie *Bacteroides sp.* lagerten sich ebenfalls nicht oder nur geringfügig an.

Die selektive Expansion ist geprägt durch die starke Vermehrung typischer oraler biofilmbildender Bakterien, was zu einer weiter zunehmenden Dominanz von *Streptococcus sp.* sowie *Neisseria sp.* führt. Anaerobier wie *Veillonella sp.* und *Fusobacterium periodonticum* sind zwar weiterhin im dentalen Biofilm nachweisbar bleiben aber in der relativen Häufigkeit gegenüber den schnell expandierenden Bakterienspezies zurück.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Biofilm Modelle (Sanchèz et al. 2011) war *Fusobacterium nucleatum* in dieser Studie für den 24h Biofilm nicht nachweisbar und ist somit in unserem Modell nicht vertreten.

Die Biofilmproben der Phase der selektiven Expansion zeigen sich somit erwartungsgemäß deutlich Streptokokken-dominiert, weisen zudem jedoch vordringlich Aerobier wie *Neisseria sp.* als kodominante Bakterienspezies auf (vgl. Abb. 13), was im Kontrast zu den Erkenntnissen über die generelle Biofilm Entwicklung steht (Zunahme der Anteiligkeiten gram negativer anaerober Bakterienspezies über die Zeit). Die ansteigende Diversität der Proben über die

Zeit lässt es zudem zu, dem vorliegenden Modell den Einflussfaktor der anhaltenden Modulation des Biofilms durch planktonische Bakterien zuzuschreiben. Die weitere Maturation (>24 h) des Biofilms wurde nicht untersucht.

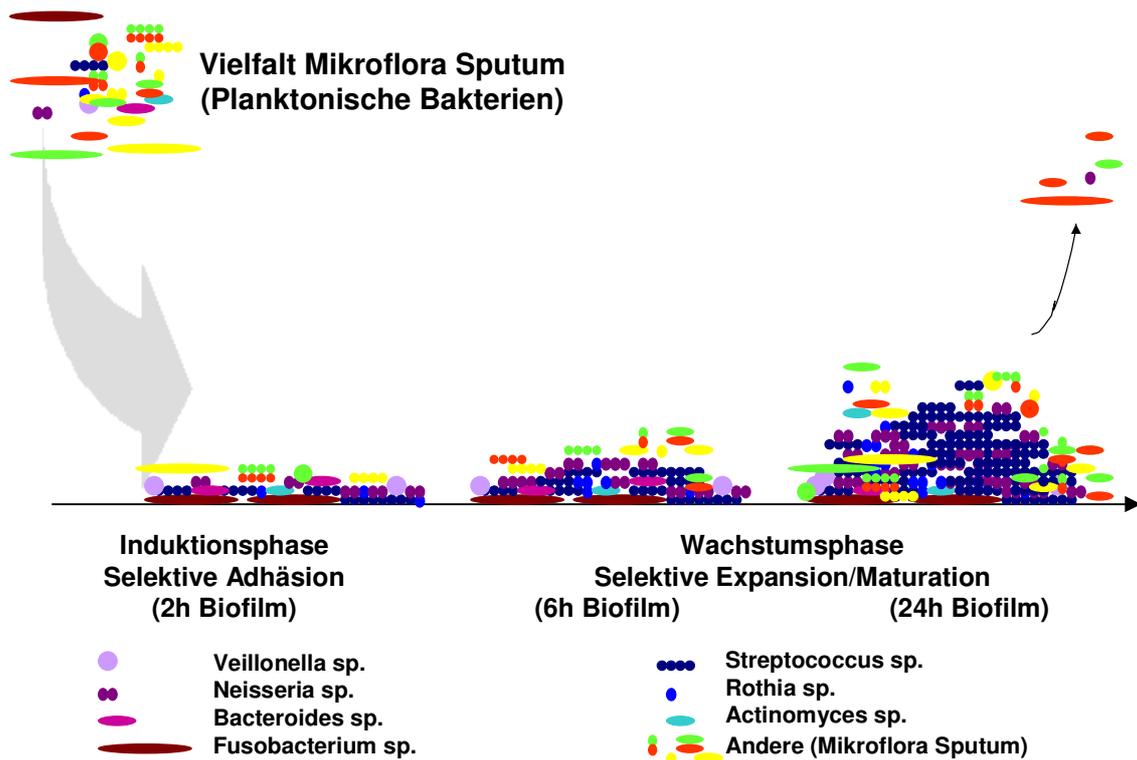


Abb. 13 Modell der frühen Biofilmentwicklung

Da die parallel untersuchten Plaqueproben sich mit hohen Werten für *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella sp.* und die *Bacteroides sp./ Prevotella sp.* Gruppe sowie niedrigen Werten für *Streptococcus sp.* und die *Neisseria sp./ Haemophilus sp.* Gruppe vom gram negativen anaeroben Bakterienspektrum dominiert zeigen, lässt sich schlussfolgern, dass der 24h- Biofilm sich generell von einem vollständig maturierten Biofilm unterscheidet. Auch in früheren Untersuchungen wurde der 24h-Biofilm als nicht vollständig ausdifferenziert betrachtet (Rupf et al. 2011).

Diese Annahme wird von den Ergebnissen des globalen biomathematischen Vergleiches der Bakteriensignaturen der Biofilmproben der frühen respektive späten Phase gestützt. Im Gegensatz zu Zijnga et al. (2010), in deren Studie die Biofilmproben nach drei Wochen morphologisch Plaqueproben entsprechen, zeigt sich für die Proben dieser Studie, dass die Biofilmproben über die Zeit gesehen den Speichelproben immer ähnlicher und den Plaqueproben immer unähnlicher werden.

Die zunehmende Ähnlichkeit der Biofilmproben dieser Arbeit kann möglicherweise zum Teil darauf zurück geführt werden, dass die vorliegenden Speichelproben hohe Anteile an gram negativen anaeroben Bakterienspezies, wie *Veillonella sp.*, *Haemophilus sp./Neisseria sp.* aufweisen und zudem auch Vertreter der „late colonizers“ wie *Treponema sp.* oder Fusobakterien beinhalten. Dagegen spricht hingegen die Tatsache, dass Bakterienarten wie *Veillonella sp.* oder die *Bacteroides sp./Prevotella sp.* Gruppe, die hohe relative Häufigkeitswerte für die Speichelproben aufweisen, minimale Werte für die 24h- Biofilmproben zeigen.

Auffällig war, dass neun der in dieser Studie untersuchten Probanden zum Zeitpunkt 6h in der DGGE Analyse negativ für *Streptococcus sp.* waren. Die Werte dieser neun Probanden sind kaum auf einen methodischen Fehler zurückzuführen, da die Proben der Probanden zu unterschiedlichen Zeitpunkten zusammen mit anderen Proben analysiert wurden, die dieses Phänomen nicht aufwiesen. Alle Probanden dieser Reihe waren auch in der T-RFLP Analyse negativ für *Streptococcus sp.* zum Zeitpunkt 6h.

Zudem ist zu beachten, dass in dieser Studie keine parodontalpathogenen Keime wie *T. forsythia* oder *T. denticola* nachgewiesen wurden. Es wurde jedoch auch keine subgingivale Plaque analysiert, wo diese Bakterien primär zu finden sind.

Schlussfolgerung

Die Gegenüberstellung der Analysemethoden DGGE und T-RFLP zeigte, dass beide Methoden bezüglich unterschiedlicher Aspekte der Bakterienspektrenanalyse ihre spezifischen Stärken aufweisen. Dies zeigte sich vor allem bei der Analyse von Bakterienspezies mit in Relation gesehen niedrigen relativen Häufigkeiten. Die T-RFLP stellt eine gut standardisierbare computerbasierte Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse komplexer Bakteriensignaturen dar. Sie zeigte sich der DGGE bezüglich der Sensitivität und Diversitätsanalyse deutlich überlegen, stellte aber im Gegensatz zur DGGE kein sicheres Mittel zur Analyse früher Biofilme dar. Zudem konnte der Bakteriennachweis mithilfe der T-RFLP nur für Bakteriengruppen geführt werden jedoch nicht auf Speziesebene. Nicht-kultivierbare Bakterienarten wie TM7 phylum konnten mit der T-RFLP nicht nachgewiesen werden, im Gegensatz zur DGGE, die eine diffizilere Unterscheidung auch nicht-kultivierbarer Bakterienarten auf Speziesniveau ermöglichte. Bezüglich der Untersuchung der quantitativen Zusammensetzung und entsprechende statistische Auswertung war die T-RFLP der DGGE signifikant überlegen.

Die Entwicklung des frühen Biofilms der ersten 24 h zeigte sich als zeitabhängigen Prozess, bei dem es zu qualitativen und quantitativen Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung des Biofilms kommt.

Basierend auf den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit wurde ein Modell der frühen Biofilmentwicklung erarbeitet, das zwischen einer Phase der selektiven Adhäsion (<2h) und der Phase der selektiven Expansion (>2h) unterscheidet (Abb. 13). Hohe relative Häufigkeiten weisen dabei für die Phase der selektiven Adhäsion vorrangig Aerobier wie *Streptococcus sp.* oder *Neisseria sp./Haemophilus sp.* Gruppe auf, sowie einige Anaerobier wie *Veillonella sp.* Die fortschreitende selektive Expansion und Maturation des Biofilms führt zu einer Zunahme der Häufigkeit aerober Bakterienspezies der *Streptococcus sp.* und der *Neisseria sp./Haemophilus sp.* Gruppe, wohingegen Spezies der *Actinomyces sp.* oder *Bacteroides sp./Prevotella sp.* Gruppe verdrängt werden.

Damit war der 24h Biofilm aerob dominiert so dass postuliert wird, dass sich der

24h Biofilm von vollständig maturierten oralen Biofilmen unterscheidet, für die vermehrt gram negativer anaerober Bakterienspezies erwarten werden.

Für die untersuchten Kompartimente Speichel, Plaque und auch für die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnenen Biofilmproben konnten charakteristische Bakteriensignaturen detektiert werden wie z.B. Fusobakterien in den Plaqueproben und *Haemophilus sp./Neisseria sp.* in den Speichelproben.

Ausblick

Die kulturunabhängige Diagnostik mit T-RFLP bietet viele Möglichkeiten für umfassende Analysen komplexer bakterieller Lebensgemeinschaften. Eine Limitation dieser Methode liegt noch immer in der ausbaufähigen Datenlage für die T-RF basierte Identifikation der detektierten Bakterienspezies. Durch eine konsequente Erweiterung der T-RF Spektren kann die Interpretation der T-RFLP verbessert werden. Dies könnte unter anderem durch intensive Kombination mit Methoden wie der DGGE geleistet werden.

Für die Zukunft sollten Möglichkeiten diskutiert werden, kultur-unabhängige Verfahren wie T-RFLP im klinischen Alltag für die Analyse der pathologischen Flora polymikrobieller oraler Infektionen wie Karies und Parodontitis sowie für andere polymikrobielle Infektionen wie z.B. Mukoviszidose, Haut-Weichteilinfektionen (Verbrennungen, diabetischer Fuß) einzusetzen. Die daraus gewonnenen Informationen könnten in Verbindung mit Ergebnissen zukünftiger klinischer Interventionsstudien in klinische Behandlungsalgorithmen einfließen („personalized medicine“).

Es ist anzunehmen, dass in den nächsten Jahren die diagnostische Verwendung der „next generation sequencing“ Verfahren deutlich zunehmen wird, was auch Einfluss auf die methodischen Aspekte der Mikrobiom- Untersuchung haben wird.

7 Literaturverzeichnis

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE: "Defining the normal bacterial flora of the oral cavity", 2005, J Clin Microbiology 43(11):5721-32.
2. Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J: "Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications", 2011, Springer, New York.
3. Blasco L, Ferrer S, Pardo I: "Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria", 2003, FEMS Microbiol Letters 225:115-123.
4. Blech J: „Leben auf dem Menschen“, 2000, Rowohlt Taschenbuch Verlag, Reinbek.
5. Biener T: „Mikrobenmatten- Biologische Grundlagen und geologische Relevanz“, 2002, Geologisches Oberseminar Technische Universität Freiberg.
6. Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S: "Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays", 2000, Nature Biotechnology, 18(6):630–634.
7. Cephas KD, Kim J, Mathai RA, Barry KA, Dowd SE, Meline BS, Swanson KS: "Comparative analysis of Salivary Bacterial Microbiome Diversity in Edentulous Infants and Their Mothers or Primary Care Givers Using Pyrosequencing", 2011, PLoS One 6(8):e23503.
8. Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen TJ: "A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data", 2005, Ecology Letters 8:148-159.
9. Cocolin L, Bisson LF, Mills DA: "Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentation", 2000, FEMS Microbiology Letter 189(1):81-87.
10. Consterton JW, Lewandorski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM: "Bacterial biofilms", 1995, Ann Rev Microbiol 49:711-745.
11. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R: "Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time", 2008, Science 326(5960):1694-1697.

12. Davies CE, Hill KE, Wilson MJ, Stephens P, Hill CM, Harding KG, Thomas DW: "Use of 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the microfloras of healing and nonhealing chronic venous leg ulcers", 2004, *J Clin Microbiol* 42(8):3549-57.
13. Dickie IA, Fitz John RG: Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review", 2007, *Mycorrhiza* 17(4):259-270.
14. Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR: "Assessment of microbial diversity in two southwestern U.S. soils by terminal restriction fragment analysis", 2000, *Appl Environ Microbiol* 66:2943-2950.
15. Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR: "Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA Genes from Bacterial Communities", 2001, *Appl Environ Microbiol* 67:190-197.
16. Eckert KA, Kunkel TA: "DNA fidelity and the polymerase chain reaction", 1991, *PCR Methods Appl.* 1:17-24.
17. Edwards IP, Cripliver JL, Gillespie AR, Johnsen KH, Scholler M, Turco RF: "Nitrogen availability alters macrofungal basidiomycete community structure in optimally fertilized loblolly pine forests", 2004, *New Phytol* 162:755-770.
18. Egert M, Friedrich MW: "Formation of Pseudo-Terminal Restriction Fragments, a PCR related Bias Affecting Terminal Restriction Fragment Polymorphism Analysis of Microbial Community Structure", 2003, *Appl Environ Microbiol* 69:2555-2562.
19. Fadini GP, Avogaro A: "Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology", 2010, *Cardiovascular Research* 87:12-21.
20. Finegold SM: "Intestinal bacteria. The role they play in normal physiology, pathologic physiology, and infection", 1969, *Calif Med* 110(6):455-9.
21. Fuchs G: „Allgemeine Mikrobiologie“, 2006, Thieme, Stuttgart.
22. Fuchs D: "The role of the gut flora in the *T. gondii*-induced ileitis of the C57BL/6-mice", 2010, Medizinische Fakultät Universität Berlin.
23. Fujimoto C, Maeda H, Kokeguchi S, Takashiba S, Nishimura F, Arai H, Fukui K, Murayama Y: "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of microbial communities of subgingival plaque", 2003, *Journal of Periodontal Research* 38(4):440-445.

24. Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J, Tindall BJ: "Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea", 2007, Michigan State University Board of Trustees.
25. Govan JR, Deretic V: "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*.", 1996, *Microbiol Rev* 60(3):539-574.
26. Hall N: "Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology", 2007, *J Exp Biol* 210(9):1518-1525.
27. Hannig M, Hannig C: „Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv?“, 2007, *Oralprophylaxe* 29:73-82.
28. Hannig C, Hannig M: "The oral cavity- a key system to understand substratum- dependent bioadhesion on solid surfaces in man", 2009, *ClinOral Invest* 13:123-139.
29. Hansen TH, Jensen SB: "Interactions between oral contraceptives and other drugs", 1991, *Ugeskr Laeger.* 153(44):3073-6.
30. Hellwig E, Klimek J, Attin T: „Einführung in die Zahnerhaltung“, 2009, Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln.
31. Henderson B, Wilson M: "Commensal communism and the oral cavity", 1998, *J Dent Res* 77:1674-1683.
32. Herold G: „Innere Medizin“, 2010, Köln.
33. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.", 1992, *Biotechnology (NY)* 10(4):413-7.
34. Jiang W, Jiang Y, Li C, Liang J: "Investigation of Supragingival Plaque Microbiota in Different Caries Status of Chinese Preschool Children by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis", 2011, *Microb Ecol* 61:342-352.
35. John HA, Birnstiel ML, Jones KW: "RNA-DNA hybrids at the cytological level", 1969, *Nature* 223:582-587.
36. Kanogawa T: "Bias and Artifacts in Multitemplte Polymerase Chain Reaction", 2003, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96(4):317-323.
37. Kolenbrander PE, London J: "Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence.", 1993, *J Bacteriol* 175(11):3247-52.

38. Kolenbrander PE: "Oral-Microbial Communities: Biofilms, Interactions and Genetic Systems", 2000, *Annu Rev Microbiol* 54:413-27.
39. Kolenbrander PE, Jakubovics NS, Chalmers NI, Palmer RJ Jr.: "Human Oral Multi-species Biofilms: Bacterial Communities in Health and Disease", 2009, aus "The biofilm mode of life: mechanisms and adaptation", Horizon Bioscience, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
40. Kolenbrander PE: "Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on Saliva as sole nutritional source", 2011, *Int J Oral Sci* 3:49-54.
41. Kreth J, Merritt J, Qi F: "Bacterial and Host Interactions of Oral Streptococci", 2009, *DNA Cell Biology* 28(8):397-403.
42. Lazar V: "Quorum sensig in biofilms- How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?", 2011, *Anaerobe* 17(6):280-285.
43. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG: "Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm", 2004, *J Appl Microbiol* 97(6):1311-8.
44. Ling Z, Kong J, Jia P, Wei C, Wang Y, Pan Z, Huang W, Li L, Chen H, Xiang C: "Analysis of Oral Microbiota in Children with Dental Caries by PCR-DGGE and Barcoded Pyrosequencing", 2010, *Microb Ecol* 60(3):677-90.
45. Liu W, Marsh T, Cheng H, Forney L: "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA", 1997, *Appl Environ Microbiol* 63:4516-4522.
46. Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC: "Use of PCR with Universal Primers and Restriction Endonuclease Digestions for Detection and Identification of Common Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid", 2000, *J Clin* 38(6):2076–2080.
47. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M: "Multiplex polymerase chain reaction: a pratical approach", 2002, *J Clin Lab Anal* 16:47-51.
48. Madigan M, Martinko J, Stahl D, Clark D: "Biology of the Microorganisms", 2009, Pearson, London, United Kingdom.
49. Marsh PD, Martin MV: "Oral Microbiology", 2003, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, U.S.
50. Marsh PD: "Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style", 2005, *J Clin Periodontol* 32(6):7-15.

51. Marsh PD: "Microbiology of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and Caries", 2010, *Dental Clinics of North America* 54(3):441-454.
52. Marsh PD, Devine DA: "How is the development of dental biofilms influenced by the host?", 2011, *J Clin Periodontol* 38(11):28-35.
53. Martin R, Nauta AJ, Ben Amor K, Knippels LM, Knol J, Garssen J: "Early life: gut microbiota and immune development in infancy", 2010, *Benef Microbes* 1(4):367-82.
54. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL: "An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system", 2005, *Cell* 122(1):107-18.
55. Meyer M, Stenzel U, Hofreiter M: "Parallel tagged sequencing on the 454 platform", 2008, *Nat Protoc* 3(2):267-78.
56. Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer G, Winter C, Herndl GJ: "Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis", 1999, *Appl Environ Microbiol* 65:3518-3525.
57. Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM: "A Computer-simulated Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Bacterial Small-Subunit rRNA Genes: Efficacy of Selected Tetrameric Restriction Enzymes for Studies of Microbial Diversity in Nature", 1996, *Appl Environ Microbiol* 62(7):2501-2507.
58. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction", 1986, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51:263-273.
59. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG: "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA", 1993, *Appl Environ Microbiol* 59(3):695-700.
60. Nairn J, Price NC: "Exploring proteins: a student's guide to experimental skills and methods", 2009, Oxford University Press.
61. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P: „Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie“, 2009, Thieme, Stuttgart.
62. Nightingale J: "Clinical limitations of in vitro testing of microorganism susceptibility", 1987, *AmJ Hosp Pharma* 44(1):131-7.

63. Nyvad B, Fejerskov O: "Transmission electron microscopy of early microbial colonisation of human enamel and root surfaces *in vivo*", 1987, *Scand J Dent Res* 95:297-307.
64. Pardue ML, Gall JG: "Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations", 1969, *Proc Natl Acad Sci* 64:600-604.
65. Park YH, Yoon HJ, Lee ST: "Application of multiplex PCR using species-specific primers within the 16s rRNA gene for rapid identification of *Nocardioides* strains", 1998, *International Journal of Systematic Bacteriology* 48(3):895-900.
66. Paster BJ, Boches SK, Galvin JK, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE: "Bacterial diversity in human subgingival plaque", 2001, *J Bacteriol* 183(12):3770-83.
67. Raad I, Chatzinikolaou I, Chaiban G: "In Vitro and Ex Vivo Activities of Minocycline and EDTA against Microorganisms Embedded in Biofilm on Catheter Surfaces", 2003, *Antimicrob Agents Chemother* 47(11):3580-5.
68. Rehmer O: "Detektion and visualisation of micro-organisms in the in-situ pellicle with different procedures", 2008, Medizinische Fakultät Universität Freiburg.
69. Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P: "A sequencing method based on real-time pyrophosphate", 1998, *Science* 281(5375):363-5.
70. Rupf S, Idlibi AN, Marrawi FA, Hannig M, Schubert A, von Müller L, Spitzer W, Holtmann H, Lehmann A, Rüpell A, Schindler A: "Removing Biofilms from Microstructured Titanium *Ex Vivo*: A Novel Approach Using Atmospheric Plasma Technology", 2011, *PloS One* 6(10):e25893.
71. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M: "Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from subgingival microbiota", 2011, *Journal of Periodontal Research* 46(2):252-260.
72. Schilling KM, Bowen WH: "Glucans synthesized *in situ* in experimental Salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*", 1992, *Infect Immun* 60:284-295.
73. Singh V, Shi W, Almo SC, Evans GB, Furneaux RH, Tyler PC, Painter GF, Lenz DH, Mee S, Zheng R, Schramm VL: "Structure and inhibition of a quorum sensing target from *Streptococcus pneumoniae*", 2006, *Biochemistry* 45:12929-12941.

74. Vaz-Moreira I, Egas C, Nunes OC, Manaia CM: "Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample", 2011, *Antonie van Leeuwenhoek* 100(2):245-57.
75. von Wintzingerode: "Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität einer anaeroben Trichlorbenzol- dechlorierten Mischkultur", 1999, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Humboldt Universität Berlin.
76. Valasek MA, Repa JJ: "The power of Real-Time PCR", 2005, *Adv Physiol Educ* 29:151-159.
77. Vignais PV, Vignais PM: "Discovering Life, Manufacturing Life: How the experimental method shaped life sciences", 2010, Springer, Dordrecht The Netherlands.
78. Zijng V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ: "Oral biofilm architecture on natural teeth", 2010, *PloS One* 24(5)2:e9321.

8 Publikationen

Kongressbeitrag Jahrestagung DGHM 2011

“Molecular analysis of population dynamics in microbial communities during oral biofilm formation”

Kurzvortrag Jahrestagung AfG 2011

„Molekularbiologische Analyse der Dynamik mikrobieller Populationen während der Biofilmbildung“

Eingereicht:

Kongressbeitrag Jahrestagung DGHM 2012

“Culture-independent evaluation of bacterial signatures of developing in situ dental biofilms”

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen herzlich danken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Professor Dr. med. Mathias Herrmann**, Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes, sowie Herrn **Privatdozent Dr. med. Lutz von Müller**, Oberarzt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes, für die Überlassung des Themas sowie die hervorragende Betreuung über die gesamte Zeit und die Unterstützung bei Analyse und Diskussion der Ergebnisse.

Mein weiterer Dank gilt Herrn **Privatdozent Dr. med. dent. Stefan Rupf**, Oberarzt an der Klinik für Zahnerhaltung Parodontologie u. Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, der mit seiner großen Fachkompetenz und konstruktiven Kritik eine große Unterstützung für mich war.

Ebenso danke ich Frau **Dr. Elke Heinzl** für die exzellente Mitbetreuung meiner Arbeit und die ständige Hilfsbereitschaft sowohl bei der Versuchsplanung als auch deren Durchführung- sogar über ihr Ausscheiden aus dem Institut hinaus.

Ich bin vor allem auch meiner Kommilitonin **cand. med. dent. Nastassja Kerth** zu Dank verpflichtet, die im Rahmen ihrer Doktorarbeit das dieser Arbeit zugrunde liegende *in situ* Biofilmprouben erstellte.

Ein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Angestellten des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, deren Freundlichkeit und große Hilfsbereitschaft ich sehr zu schätzen gelernt habe.

Mein Dank gilt zudem meiner Familie und meinen Freunden.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Werra
Vorname: Ursula Elisabeth Maria
Geburtsdatum: 11.08.1989
Geburtsort: Ludwigshafen am Rhein

Schulbildung

1995 Grundschule Baunatal/Hessen
1995-1998 Grundschule Limburgerhof/RP
1998-2002 Edith-Stein-Gymnasium Speyer
2002-2007 Friedrich-Magnus-Schwerd Gymnasium
Speyer
BEGYS-Klasse (Begabtenförderung am
Gymnasium mit Verkürzung der Schulzeit)
Abschluss: **Abitur**

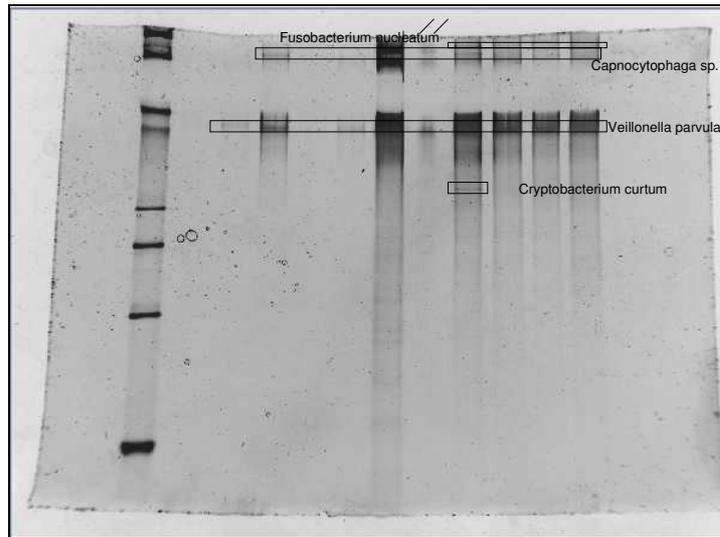
Studium

2007-2009 Vorklinischer Studienabschnitt an der
Universität des Saarlandes/Homburg
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

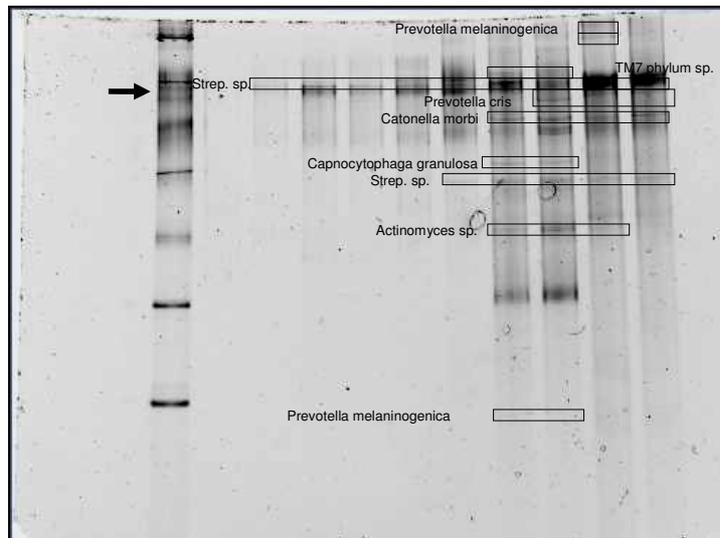
Seit 2009 Klinisches Studium an der Universität des
Saarlandes/Homburg
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
voraussichtlich WS 2013

11 Anhang

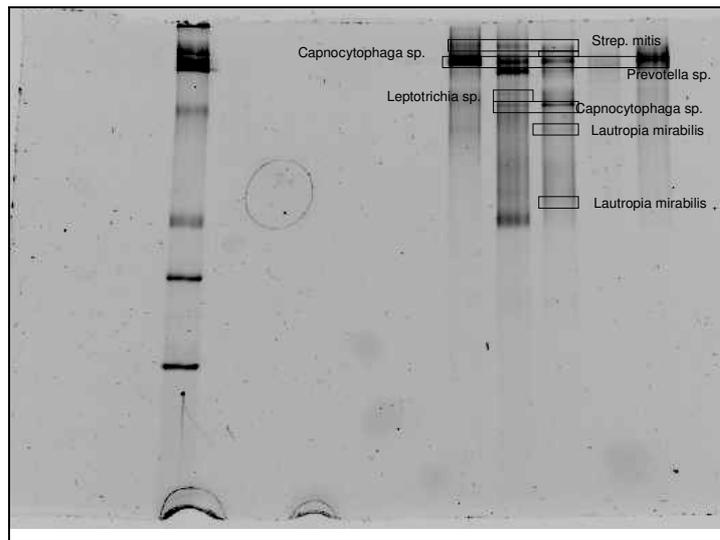
A Verkleinerte Darstellung der DGGE- Gele der 24 Probanden (Originale höher auflösend)



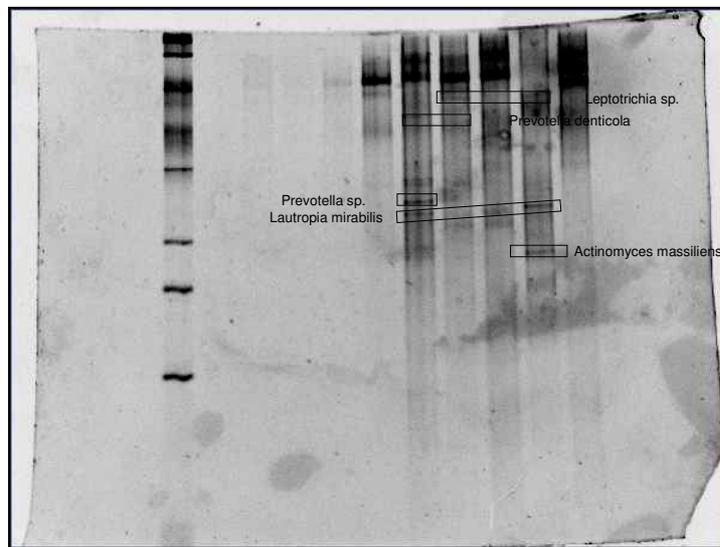
Proband 1



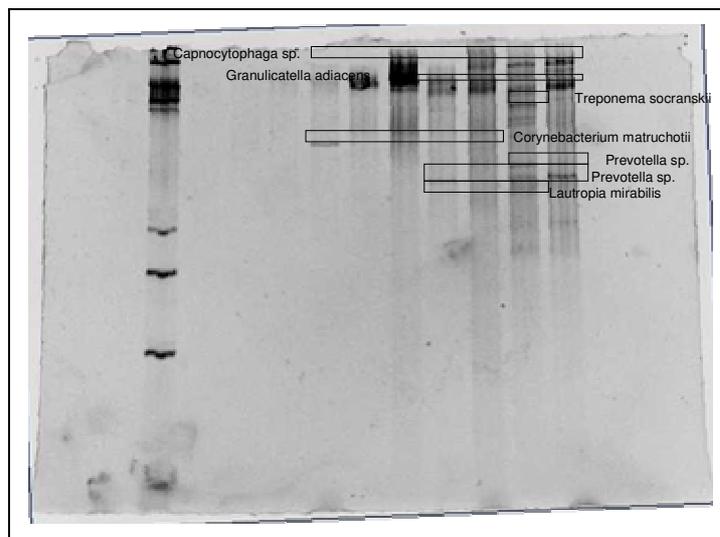
Proband 2



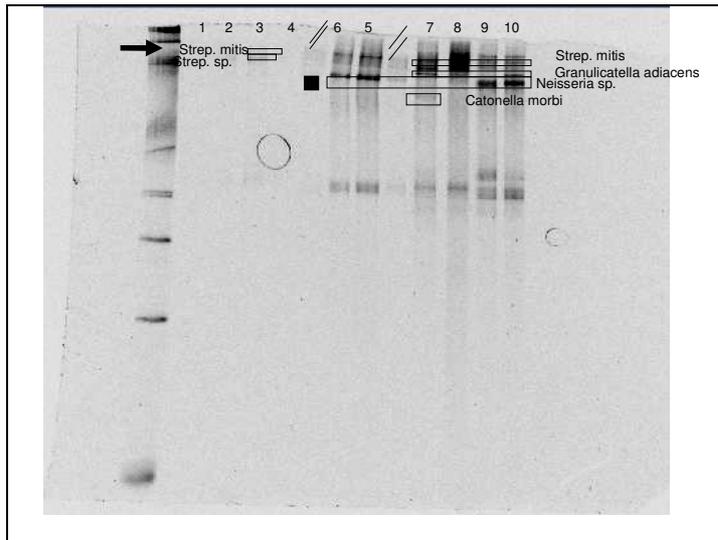
Proband 3



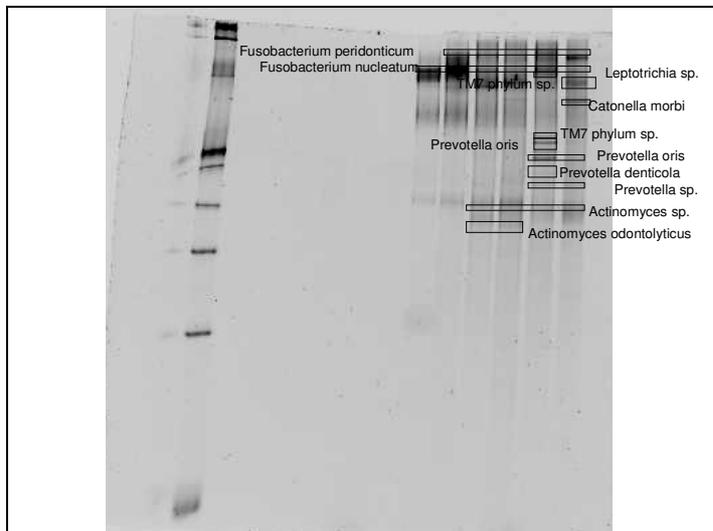
Proband 4



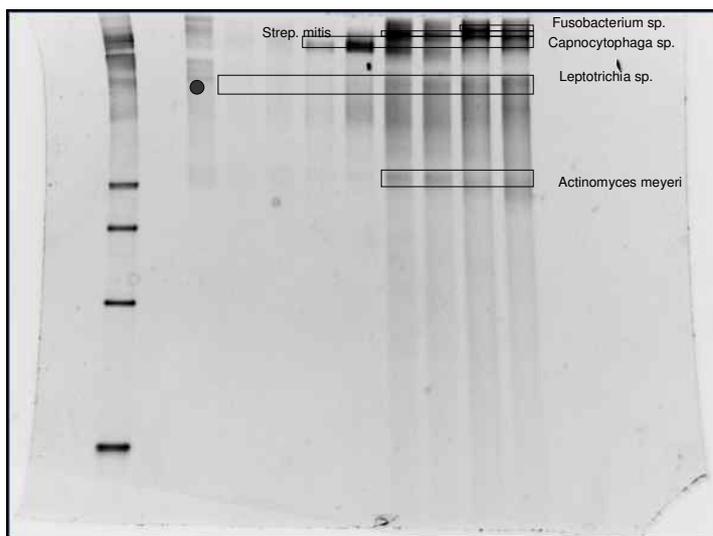
Proband 5



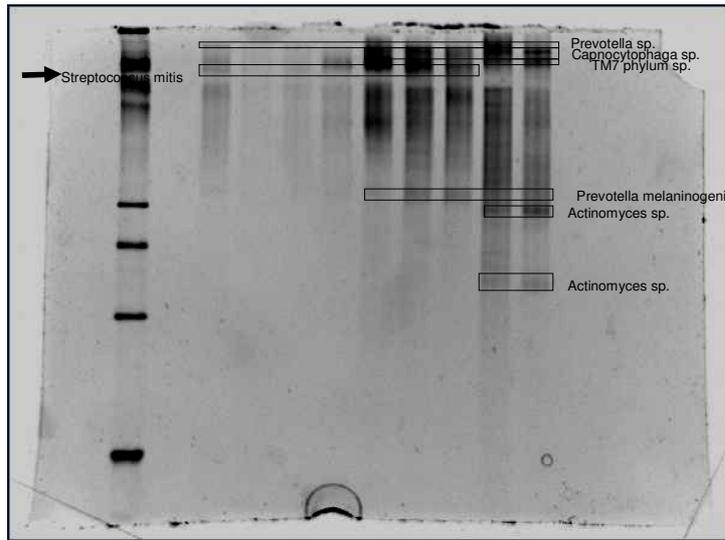
Proband 6



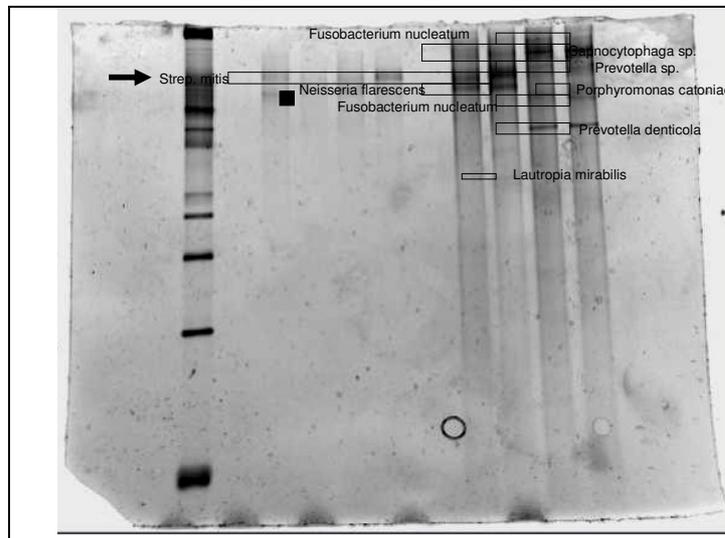
Proband 7



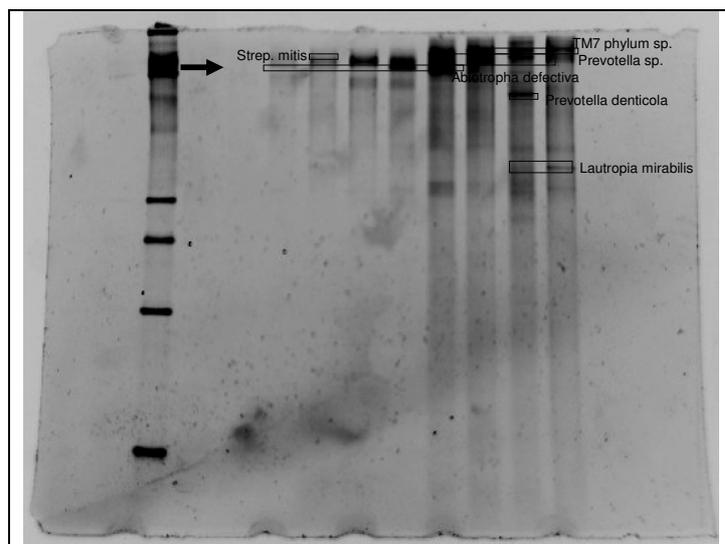
Proband 8



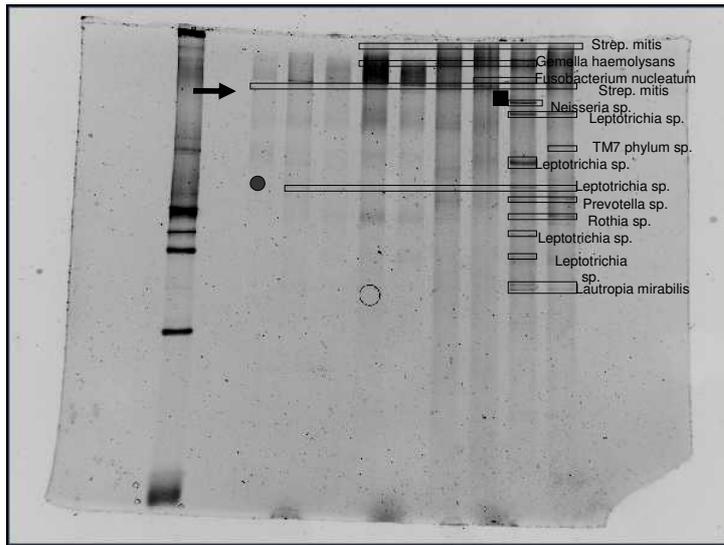
Proband 9



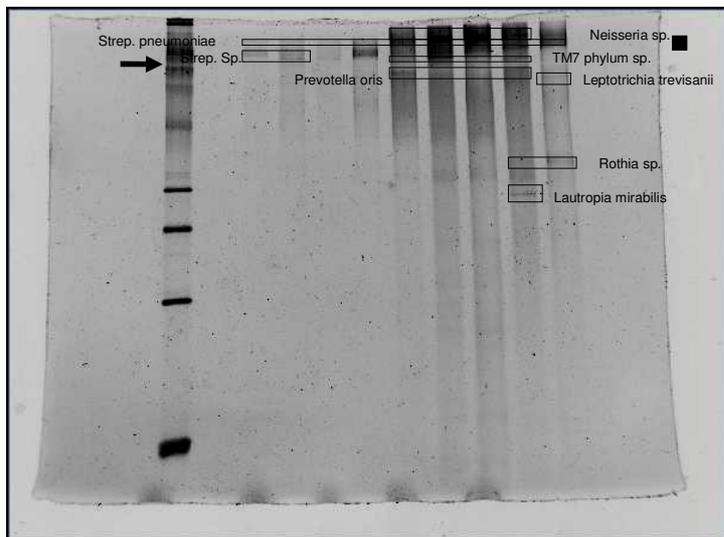
Proband 10



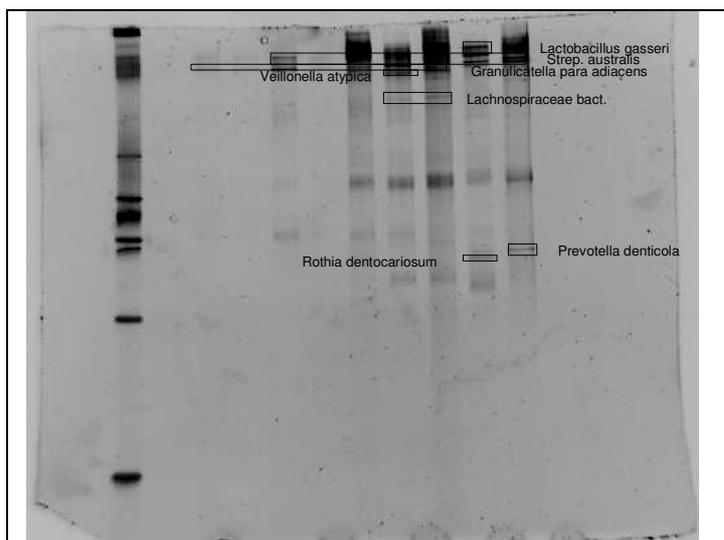
Proband 11



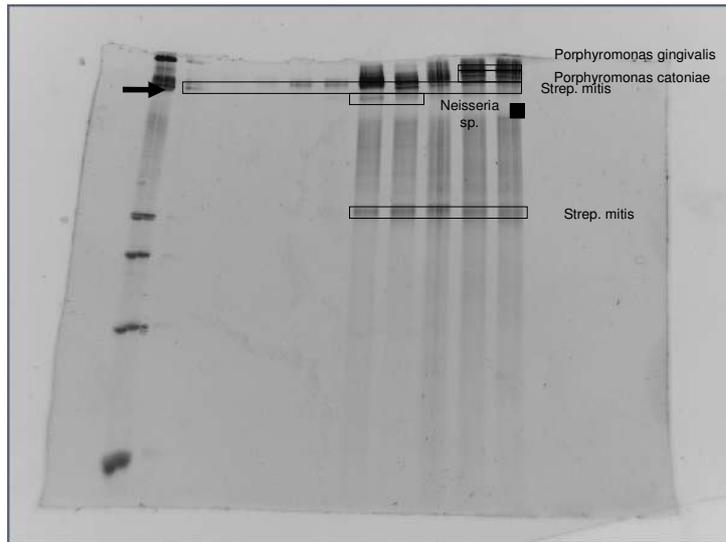
Proband 12



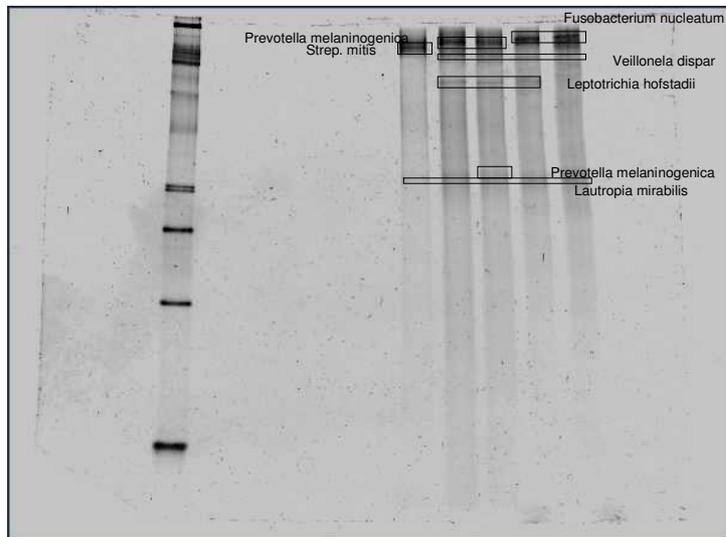
Proband 13



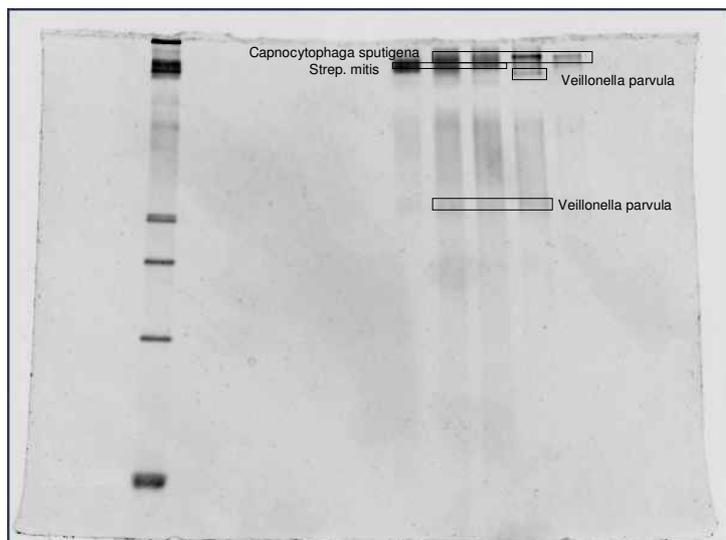
Proband 14



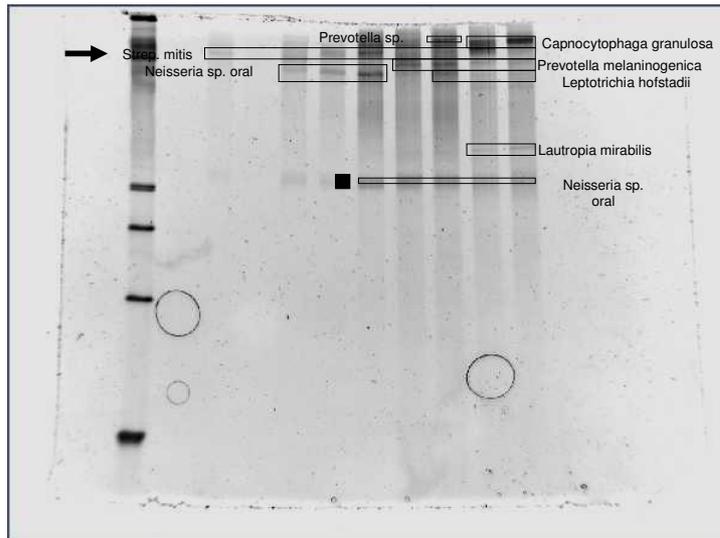
Proband 15



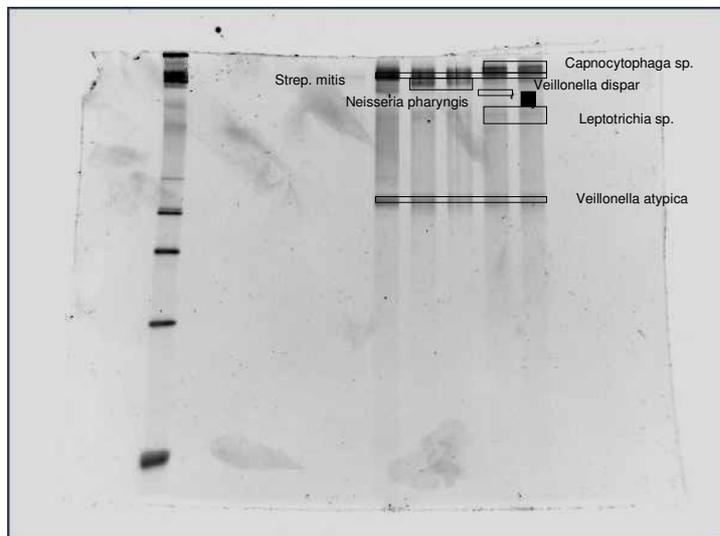
Proband 16



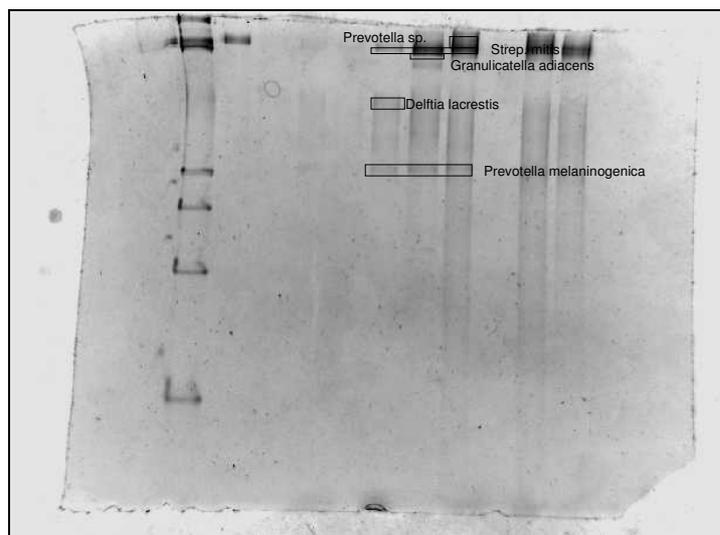
Proband 17



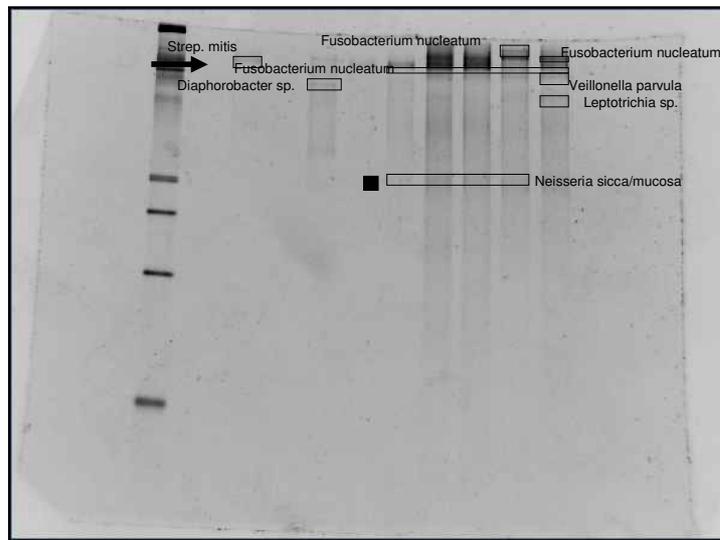
Proband 18



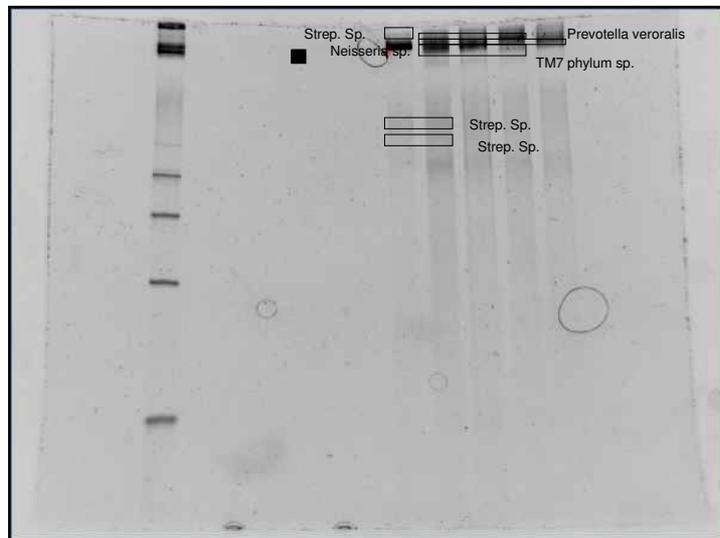
Proband 19



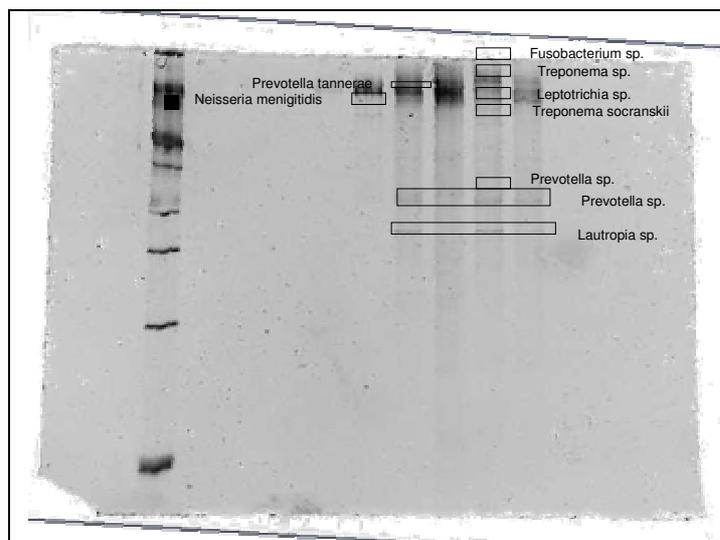
Proband 20



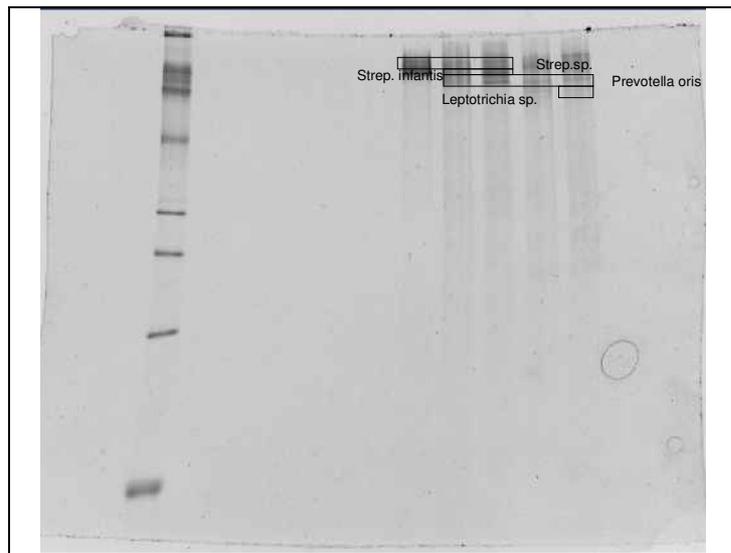
Proband 21



Proband 22



Proband 23



Proband 24

B Relative Häufigkeiten der T-RFs (%) für die *In-Situ*- Biofilm-, Speichel- und Plaque-Proben der 24 Probanden

Proband 1

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> - Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36			2,29		8,31	
37						
64	Actinomyces	6,80	2,36		8,71	
68-69	Nocardia		1,73			
116					2,18	
176				0,55		
179					1,16	
193-194					2,23	
197	Lautropia					
200	Acinetobacter/Bordetella				1,96	
203-204	Burkholderia	9,32	5,96	5,34	1,64	
205-207	Neisseria / Hämophilus	16,55	8,74	28,79	1,47	
208					4,67	
211-212	Veillonella parvula/dispar	18,30		2,23	32,34	
214-215	Treponema				0,78	
219	Alcaligenes				2,96	
222-223	Actinobaculum				1,16	
231-233	Rothia/Actinobaculum	15,33	11,86	2,31	1,67	
234-237	Actinomyces				2,89	
239-24	Catonella				0,58	
249-252	Acinetobacter				3,94	
256					4,48	
258-26	Actinobacillus			1,40	0,54	
261-265	Bacteroides		2,42		31,54	
267-268	Prevotella		3,33	29,79	0,58	
270-272	Fusobacterium				3,46	
273				0,56		
276-277	Granulicatella				2,50	
283-285	Fusobacterium				15,67	
307-310	Streptococcus		55,28	22,53	9,56	
313-315			1,90	3,20		
317-318	Streptococcus mutans			1,43		
323					0,52	
389-391					3,67	
408				1,25		
411					1,24	

Proband 2

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36		1,84			1,43	3,78
64	Actinomyces	2,15				1,32
81					0,55	
113						0,70
159					0,93	7,37
162-164	Prevotella				2,47	
172		1,70				
193/194						0,74
200	Acinetobacter/Bordetella				0,58	3,70
203-204	Burkholderia			6,87		1,94
205-207	Neisseria / Hämophilus	27,70	29,85	29,71	3,51	4,35
211-212	Veillonella parvula/dispar	6,77	2,89		12,55	9,29
231-233	Rothia/Actinobaculum	25,63	15,96	5,28	2,56	11,23
234-237	Actinomyces					0,76
239-24	Catonella				0,65	1,47
258-26	Actinobacillus	1,24				2,37
261-265	Bacteroides	1,78			21,29	5,73
266	Prevotella			1,34		1,28
267-268	Prevotella	4,36	7,40	1,34	1,12	2,19
270-272	Fusobacterium	2,88	1,84		3,36	1,44
273		1,63	3,29			1,25
276-277	Granulicatella				0,99	2,27
282	Leptotrichia					
283-285	Fusobacterium				0,68	9,64
286		1,63				
307-310	Streptococcus	11,16	29,59	54,30	8,34	1,30
313-315		1,18	1,88			
317-318	Streptococcus mutans					0,83
323						0,63
326		1,11	1,31	1,94		
328					3,37	
411					2,86	2,94

Proband 3

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36		8,38	4,17		2,59	3,98
37						1,37
64	Actinomyces	7,95	1,55		0,92	5,82
68-69	Nocardia	5,57	1,17			
74						5,71
81					2,17	
127				1,58		
159					0,55	
162-164	Prevotella				1,94	
184						1,29
198						0,83
200	Acinetobacter/Bordetella					0,76
203-204	Burkholderia	13,52	9,89	19,86	1,35	3,12
205-207	Neisseria / Hämophilus	26,59	23,98	35,49	25,70	5,73
211-212	Veillonella parvula/dispar	5,74			15,59	13,32
214-215	Treponema					1,78
219	Alcaligenes					0,96
222-223	Actinobaculum					0,59
228-229						2,13
231-233	Rothia/Actinobaculum	4,87	1,37	3,65	2,63	0,92
234-237	Actinomyces					2,19
239-24	Catonella				1,19	2,38
249-252	Acinetobacter					6,79
256						0,50
258-26	Actinobacillus				0,85	
261-265	Bacteroides				6,39	3,21
267-268	Prevotella				1,68	
270-272	Fusobacterium				2,71	1,62
276-277	Granulicatella				1,71	0,88
279						1,14
283-285	Fusobacterium				0,76	
286		6,47				
307-310	Streptococcus		37,32	38,59	19,43	16,42
313-315					1,82	
323					1,22	
326			2,36		0,97	
397						0,55
411						0,67

Proband 4

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36		2,63		2,75	0,53	1,17
64	Actinomyces					6,70
66		2,72				
68-69	Nocardia			1,47		1,63
74				1,16		2,25
81					0,73	
159				2,29		
162-164	Prevotella				2,16	
184						0,54
198						1,36
203-204	Burkholderia	3,49				
205-207	Neisseria / Hämophilus	18,25	28,42	5,97	9,22	27,98
208				1,54		
211-212	Veillonella parvula/dispar	8,19	2,37	9,25	12,59	5,12
214-215	Treponema					0,63
231-233	Rothia/Actinobaculum	9,61	7,12	3,75	2,99	1,94
234	Actinomyces / Treponema			1,64		
234-237	Actinomyces			1,64		1,49
238				3,77		2,36
249-252	Acinetobacter				1,30	4,52
253	Leptotrichia					0,58
258-26	Actinobacillus			3,54	0,62	2,13
261-265	Bacteroides	4,61	2,16	14,58	25,19	1,46
267-268	Prevotella	1,80	4,98		0,73	3,48
270-272	Fusobacterium	3,60	3,41	13,58	2,81	1,91
274			1,47			
276-277	Granulicatella	1,48		1,60	1,87	1,57
283-285	Fusobacterium			2,84		
297						0,89
304			1,23			
307-310	Streptococcus	13,48	41,70	16,87	19,99	7,44
313-315			1,41			0,82
317-318	Streptococcus mutans			2,20	0,66	0,57
323		1,15			0,67	
326		1,68	2,56		1,14	1,76
328					1,19	
411					5,12	
412	Treponema				0,75	
499					1,52	

Proband 5

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36		2,60			2,77	8,25
64	Actinomyces	18,76				1,62
74						3,12
159						0,56
179						1,11
185						0,81
200	Acinetobacter/Bordetella		4,71	1,63		
205-207	Neisseria / Hämophilus	5,94	95,29	9,84	9,98	3,15
208					0,54	
211-212	Veillonella parvula/dispar	3,40			2,58	22,73
214-215	Treponema				2,24	0,81
219	Alcaligenes				1,15	
222-223	Actinobaculum					1,55
225						1,28
228-229						2,52
231-233	Rothia/Actinobaculum	19,22		9,65	3,17	3,93
234	Actinomyces / Treponema	8,61				
234-237	Actinomyces	8,61				2,76
249-252	Acinetobacter				1,29	1,72
256						3,35
258-26	Actinobacillus				1,71	5,31
261-265	Bacteroides				27,95	8,64
266	Prevotella			4,94		
267-268	Prevotella			1,72	0,94	
269						
270-272	Fusobacterium	16,48		5,95	2,73	3,41
273					0,55	
276-277	Granulicatella				3,11	2,50
282	Leptotrichia	5,10				
283-285	Fusobacterium				0,90	6,58
288	Enterokokken	7,84				
304				1,38		
307-310	Streptococcus	1,15		56,13	15,81	2,45
312				1,59		
313-315				1,23		
317-318	Streptococcus mutans			1,47		1,72
323					0,55	0,72
324					1,15	
326				1,37	0,66	
408				1,48		
410					0,92	

Proband 6

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36		1,20	2,11			
37			1,96			
64	Actinomyces	1,18				
74		1,83	2,65			
81				2,19	4,87	
179					0,87	
203-204	Burkholderia	3,91				
205-207	Neisseria / Hämophilus	27,79	56,87	17,82	4,90	24,95
211-212	Veillonella parvula/dispar	4,87		14,73	6,33	
214-215	Treponema	1,41	1,77			
222-223	Actinobaculum		1,42			
224		1,40	1,47			0,55
231-233	Rothia/Actinobaculum	7,20	11,22	2,48	3,54	1,14
239-24	Catonella				1,58	
249-252	Acinetobacter				0,92	
258-26	Actinobacillus	1,34	2,78	1,86	1,44	0,62
261-265	Bacteroides	1,15		11,54	1,35	
266	Prevotella			1,52	0,51	
267-268	Prevotella	5,39	1,17	6,88	3,55	
270-272	Fusobacterium		2,53	3,26	2,84	2,44
273		1,44			2,22	
274				1,19		
276-277	Granulicatella	1,50		2,11	1,47	
283-285	Fusobacterium		1,68			
288	Enterokokken			1,13	0,77	
293					0,73	
307-310	Streptococcus	25,80	7,54	26,26	18,28	16,99
313-315		2,40		3,66	3,45	
317-318	Streptococcus mutans		1,73			
319	Catonella				0,64	
323				1,71		
324					0,84	
326		2,20	2,44	2,78	1,86	1,13

Proband 7

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36						3,42
37						0,56
64	Actinomyces					0,81
65					0,54	
79		1,18				
84		1,20				
139						0,55
159						2,67
162-164	Prevotella					2,20
175					0,69	
200	Acinetobacter/Bordetella	1,57				
203-204	Burkholderia					1,78
205-207	Neisseria / Hämophilus		22,33	37,45	16,49	3,95
208						3,99
210	Actinobacillus / 'Treponema					0,55
211-212	Veillonella parvula/dispar			1,36	8,30	5,48
214-215	Treponema				0,65	
219	Alcaligenes				2,66	
222-223	Actinobaculum					0,66
23	Rothia / Tropheryma				0,75	
231-233	Rothia/Actinobaculum	4,23	8,24	3,73	5,52	2,56
234-237	Actinomyces				1,22	2,44
243						1,23
249-252	Acinetobacter		1,18		1,34	5,41
256						1,36
258-26	Actinobacillus				2,89	0,65
261-265	Bacteroides				18,27	5,65
266	Prevotella	3,51	1,12	1,39	0,56	
267-268	Prevotella	3,51	1,12	1,39	2,41	
270-272	Fusobacterium				0,78	14,45
273					0,94	
274					0,55	
276-277	Granulicatella				0,64	1,29
281						0,67
283-285	Fusobacterium					1,26
288	Enterokokken					0,74
293					1,54	
302						0,69
303					0,67	
304			1,20			
307-310	Streptococcus	85,60	55,25	43,73	3,00	11,13
312		1,98				
317-318	Streptococcus mutans		1,71			6,33
319	Catonella					
323					0,73	

Proband 8

T-RF	Erreger	In-situ Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
35		38,10				
37						9,98
64	Actinomyces					5,35
68-69	Nocardia					0,82
98			2,00			
99			2,98			
100			7,99			
102			32,34			
162-164	Prevotella				1,39	2,19
172						0,55
184						1,96
193/194						0,67
198						1,79
18.07.00	Acinetobacter/Bordetella		2,33			
205-207	Neisseria / Hämophilus	61,90		33,76	8,48	4,75
208						0,58
210	Actinobacillus / 'Treponema		2,55			
211-212	Veillonella parvula/dispar			1,19	5,58	8,42
219	Alcaligenes					0,52
222-223	Actinobaculum					0,58
227						0,61
231-233	Rothia/Actinobaculum				1,98	4,95
234-237	Actinomyces					5,76
238						0,70
243						0,67
249-252	Acinetobacter					1,59
256						1,95
258-26	Actinobacillus				0,83	1,76
261-265	Bacteroides			1,23	1,79	5,63
267-268	Prevotella			2,94		
270-272	Fusobacterium				0,65	3,33
273					0,90	
276-277	Granulicatella				0,74	1,60
283-285	Fusobacterium					18,99
307-310	Streptococcus			57,34	1,58	7,60
313-315				1,58		
317-318	Streptococcus mutans		2,63			
323					0,77	
324						0,56
326				2,24	0,84	0,61
363			35,63			
372			6,48			
411					3,20	
468			5,80			

Proband 9

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36					1,72	2,24
81					0,94	
94		1,23				
99		5,65	3,23			
100		4,62	19,18			
101		23,85				
102			1,25			
160					1,72	
162-164	Prevotella				2,16	5,56
185			4,51			
191						0,52
198		4,12	13,79			
203-204	Burkholderia	1,12			0,68	
205-207	Neisseria / Hämophilus			44,89	1,52	0,73
208		4,59				
210	Actinobacillus / 'Treponema		9,32			4,93
211-212	Veillonella parvula/dispar		2,33	2,16	15,90	0,59
214-215	Treponema		3,16		0,65	2,50
226						3,26
231-233	Rothia/Actinobaculum			3,48	3,36	0,86
239-24	Catonella				0,56	
249-252	Acinetobacter				1,45	6,56
256						2,35
258-26	Actinobacillus			1,35	2,79	1,66
261-265	Bacteroides			1,26	14,99	0,98
267-268	Prevotella				2,79	
270-272	Fusobacterium				5,66	4,47
274					1,94	
276-277	Granulicatella				1,78	1,34
283-285	Fusobacterium				3,99	0,64
294					0,69	
307-310	Streptococcus			38,60	15,00	2,47
313-315					1,67	
317-318	Streptococcus mutans		5,59		0,64	5,55
323					1,25	
326				2,53	0,89	
333					0,51	
362		39,38				
363			19,56			
371		9,68				
412	Treponema				2,24	
462			5,41			
490		2,66				
498			4,34			

Proband 10

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36					0,93	14,84
37		1,13				
64	Actinomyces					1,74
74					0,67	
81					0,54	
100			5,46			
162-164	Prevotella				1,30	3,38
191						2,55
193/194						1,12
18.07.00	Acinetobacter/Bordetella		12,36			1,82
203-204	Burkholderia	16,43		39,21		2,68
205-207	Neisseria / Hämophilus	15,59			33,46	
208						2,66
211-212	Veillonella parvula/dispar	4,63			4,38	3,14
214-215	Treponema		7,96		0,50	
224						1,19
231-233	Rothia/Actinobaculum	1,19			1,48	
234-237	Actinomyces					1,39
239-24	Catonella				0,65	0,76
244		1,96				
249-252	Acinetobacter	1,53				
256						2,15
258-26	Actinobacillus	4,91		1,13	0,71	2,43
261-265	Bacteroides	3,69		1,49	13,00	19,27
267-268	Prevotella			9,99	2,63	0,73
270-272	Fusobacterium	18,89			8,42	15,84
274					2,22	
276-277	Granulicatella	2,49				
278					0,96	
282	Leptotrichia					1,44
283-285	Fusobacterium				1,88	6,82
289		2,85				
307-310	Streptococcus	23,55		41,61	21,66	4,84
313-315				1,92		
317-318	Streptococcus mutans		18,94			
326		2,36			0,51	
362			29,15			
372			9,68			
397						2,32
409				1,31		
411					0,74	
468			16,49			1,98
500						0,64

Proband 11

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36			1,22	1,28	1,91	2,84
64	Actinomyces					7,30
68-69	Nocardia					2,24
74						2,47
143		6,83				
160						1,00
162-164	Prevotella				0,86	2,74
198		5,61				1,85
205-207	Neisseria / Hämophilus		34,47	3,16	34,77	3,74
208		11,77				
211-212	Veillonella parvula/dispar	8,45		1,65	13,26	1,18
214-215	Treponema				0,51	1,82
224			5,40	1,48	2,17	9,81
225						0,75
228-229						1,90
231-233	Rothia/Actinobaculum		2,71	21,23	5,40	8,47
234-237	Actinomyces					3,49
247						0,60
249-252	Acinetobacter					1,19
256						1,17
258-26	Actinobacillus				0,76	2,62
261-265	Bacteroides				11,98	12,48
267-268	Prevotella		1,53		0,58	
269			1,48	16,78		
270-272	Fusobacterium				3,15	1,76
274						0,53
276-277	Granulicatella				0,58	
283-285	Fusobacterium					4,87
294					3,24	
304			1,30	1,27		
307-310	Streptococcus		29,45	16,82	11,98	8,24
313-315				3,64		
317-318	Streptococcus mutans	13,60		1,25		1,16
326			1,45	1,53	1,22	
362					0,58	
371		53,79				
389-391						0,86
500					0,89	

Proband 12

T-RF	Erreger	In-situ Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36				1,48		4,95
64	Actinomyces					3,97
74						1,45
159						1,36
162-164	Prevotella				1,49	2,53
188						1,14
192						3,37
198		7,71				
200	Acinetobacter/Bordetella					1,17
203-204	Burkholderia			8,56		
205-207	Neisseria / Hämophilus		2,89	17,48	13,51	3,88
208		8,82				1,89
210	Actinobacillus / Treponema					2,61
211-212	Veillonella parvula/dispar				21,95	0,96
214-215	Treponema				1,29	1,00
219	Alcaligenes				0,56	3,53
222-223	Actinobaculum					0,92
224						0,53
231-233	Rothia/Actinobaculum		13,16	13,35	4,39	3,57
234	Actinomyces / Treponema				0,46	
234-237	Actinomyces				0,46	1,64
239-24	Catonella					0,84
243					0,53	0,60
248						1,64
249-252	Acinetobacter					9,45
253	Leptotrichia					1,14
256						1,35
258-26	Actinobacillus				2,69	1,16
261-265	Bacteroides				25,53	4,44
266	Prevotella		4,56	5,64		
267-268	Prevotella		12,16	1,36		1,25
270-272	Fusobacterium				2,97	6,94
273					3,25	0,68
275						1,35
276-277	Granulicatella				1,28	0,69
279						1,40
283-285	Fusobacterium					9,25
293					1,53	
304			1,42	2,13		
307-310	Streptococcus		48,36	5,00	13,31	6,86
312			1,79	1,82		
313-315			1,88	1,28		
317-318	Streptococcus mutans					1,97
326			1,53			
362		58,34				

Proband 13

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
37		1,99				1,42
64	Actinomyces					1,58
74						0,59
81					0,55	
140						1,12
159						1,29
161						1,42
162-164	Prevotella					0,70
179						1,39
187						0,68
193/194						2,48
203-204	Burkholderia	1,97				4,23
205-207	Neisseria / Hämophilus	32,34	3,74	76,28	23,30	9,57
211-212	Veillonella parvula/dispar	8,99			18,24	4,19
231-233	Rothia/Actinobaculum	3,69	8,17	2,68	6,65	4,98
234-237	Actinomyces					1,19
239-24	Catonella					2,14
248						1,24
256						1,55
258-26	Actinobacillus				1,54	0,66
261-265	Bacteroides	1,23			3,79	1,57
266	Prevotella	1,97			0,73	0,68
267-268	Prevotella	4,24			3,67	1,61
270-272	Fusobacterium	9,74			3,26	7,36
273					5,22	
276-277	Granulicatella	1,45			2,16	0,59
283-285	Fusobacterium					19,92
288	Enterokokken				0,46	
289		1,75				
296						1,55
302						1,66
304		1,52			1,65	
307-310	Streptococcus	21,59	33,17	1,13	19,50	3,11
312		1,73				0,62
313-315					0,51	
317-318	Streptococcus mutans					14,30
324		2,25			2,34	0,63
326		3,36		2,23	2,24	
327						0,98
387						0,97
408		1,48	27,92	8,68	3,78	1,61

Proband 14

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
37				1,99		
64	Actinomyces					4,22
68-69	Nocardia					1,30
81					0,63	
179						0,75
203-204	Burkholderia		1,27			
205-207	Neisseria / Hämophilus			25,72	1,98	0,98
210	Actinobacillus / 'Treponema			55,88		
211-212	Veillonella parvula/dispar				24,15	32,75
214-215	Treponema				3,14	
219	Alcaligenes				4,25	1,95
231-233	Rothia/Actinobaculum		22,27	6,40	4,42	8,92
238			9,14			
241			1,17			
244						1,54
249-252	Acinetobacter				0,73	
258-26	Actinobacillus				2,30	
261-265	Bacteroides				33,72	4,89
267-268	Prevotella		2,82	26,89	0,92	0,85
270-272	Fusobacterium		17,98			
273				1,13	2,96	3,54
274				1,12		
276-277	Granulicatella				1,38	1,68
278					1,25	
293					2,26	
297					1,48	
303			4,25			
304				1,87	0,86	
307-310	Streptococcus		36,92	25,72	11,63	12,92
313-315			2,34	4,52		
317-318	Streptococcus mutans		1,61			2,47
322				1,63		
324					1,49	2,77
325						1,48
326				2,45		
331			27,79			7,35
361					0,77	
387			16,33			

Proband 15

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36						8,22
37					1,80	
159						2,13
162-164	Prevotella				1,12	
200	Acinetobacter/Bordetella		8,20			
205-207	Neisseria / Hämophilus	14,56		41,48	22,88	
208						2,88
211-212	Veillonella parvula/dispar				1,66	
214-215	Treponema	1,00	43,62			
216						1,57
222-223	Actinobaculum					1,42
227						3,81
231-233	Rothia/Actinobaculum				1,57	
234-237	Actinomyces					2,13
239-24	Catonella					2,93
243					0,65	
258-26	Actinobacillus				2,27	4,84
261-265	Bacteroides	1,50			2,29	4,47
266	Prevotella	1,26				
267-268	Prevotella	9,35		12,38	1,93	
270-272	Fusobacterium	4,95			6,89	17,73
273					2,37	
276-277	Granulicatella				1,88	5,65
283-285	Fusobacterium					33,78
288	Enterokokken	1,76			0,74	
293					0,66	
307-310	Streptococcus	56,62		39,46	17,79	4,27
313-315		3,15		3,88		
317-318	Streptococcus mutans		7,29			
324					0,68	
326		3,13		2,88	1,83	
328					2,27	
331		1,46				
363			22,57			
372			6,33			
389-391						4,24
411					1,16	
462			12,00			

Proband 16

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
37		4,57			0,76	7,88
64	Actinomyces	1,22				1,34
74						0,63
81					1,87	
139						0,68
141						0,98
162-164	Prevotella				4,29	3,19
187		2,27				
193/194						1,11
203-204	Burkholderia	5,16				0,59
205-207	Neisseria / Hämophilus	2,82	63,63	44,53	7,84	5,66
208						2,40
211-212	Veillonella parvula/dispar	8,18		3,64	17,44	4,75
214-215	Treponema	3,12			3,50	3,58
228-229						2,34
231-233	Rothia/Actinobaculum	2,17				
243					0,80	
244					0,78	
246						2,38
249-252	Acinetobacter				8,43	3,36
256						2,45
258-26	Actinobacillus				1,65	1,11
261-265	Bacteroides	3,14			23,77	16,47
266	Prevotella	1,70		3,57		
267-268	Prevotella	1,70		3,57		
270-272	Fusobacterium	4,73		1,38	5,67	6,86
276-277	Granulicatella	1,85			1,69	1,46
280		1,98				
283-285	Fusobacterium	1,84			0,78	16,35
289		1,48				
293					2,56	
297						0,53
307-310	Streptococcus	24,86	36,38	41,18	5,14	8,77
312				2,49		
317-318	Streptococcus mutans	3,64				
323					0,64	
324		2,89		1,22	0,63	
326		4,54			1,43	0,55
327				1,94		
328					1,54	
410						2,86
411					3,37	
499					3,23	

Proband 17

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
37		7,13			2,68	2,39
64	Actinomyces					1,15
162-164	Prevotella				1,70	
188		4,25				
189			2,42			
193/194						1,57
197	Lautropia	4,92				
203-204	Burkholderia	17,86		4,86		
205-207	Neisseria / Hämophilus	11,68	8,77	14,56	25,62	2,57
208						0,79
211-212	Veillonella parvula/dispar	8,57			6,35	2,47
214-215	Treponema	3,79				
216			1,22			
222-223	Actinobaculum					4,90
228-229						1,72
23	Rothia / Tropheryma				1,64	
231-233	Rothia/Actinobaculum			3,14	2,82	5,66
234	Actinomyces / Treponema		2,79			
234-237	Actinomyces		2,79			
258-26	Actinobacillus			1,36	2,57	2,93
261-265	Bacteroides				8,97	1,24
266	Prevotella			1,55		
267-268	Prevotella		15,62	13,60	0,60	1,57
269						
270-272	Fusobacterium		1,23		1,46	12,25
273					1,30	
276-277	Granulicatella				1,87	1,91
283-285	Fusobacterium	5,28			3,85	1,55
288	Enterokokken				1,22	1,99
303					0,79	
304				1,15		1,12
307-310	Streptococcus	24,66	61,53	46,19	18,60	1,61
312					0,60	
313-315			2,75	3,11		
319	Catonella					1,95
324					1,43	1,74
326		8,88			2,39	1,19
327			2,58			
333					0,52	
354				3,62		
408				9,76	0,67	
411					4,17	
499						1,24

Proband 18

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36						1,52
37						6,29
64	Actinomyces					0,88
74						0,77
162-164	Prevotella	1,18			1,75	0,51
203-204	Burkholderia					3,95
205-207	Neisseria / Hämophilus	35,68	49,47	53,19	31,39	7,23
208						0,52
211-212	Veillonella parvula/dispar	13,83	3,94		14,97	6,48
214-215	Treponema				0,89	0,66
224						1,18
231-233	Rothia/Actinobaculum	3,39	4,78	3,28	1,72	0,58
239-24	Catonella					2,00
243						0,55
249-252	Acinetobacter					4,27
256						3,44
258-26	Actinobacillus	2,82	1,13		2,96	3,35
261-265	Bacteroides	11,27	3,17		18,64	5,63
266	Prevotella		1,38	1,36		
267-268	Prevotella		1,38	1,36		
270-272	Fusobacterium	6,27			2,40	4,53
273					0,84	
276-277	Granulicatella	2,40			1,94	1,29
283-285	Fusobacterium				0,64	7,25
288	Enterokokken	1,79				
293					0,79	0,91
303		1,53				
304			1,53			
307-310	Streptococcus	11,78	32,23	28,87	8,83	21,22
317-318	Streptococcus mutans					1,42
324		2,24			1,44	0,66
326		3,87	2,30		1,67	
396						0,77
408				11,48	0,50	
411		2,63			5,41	
499						1,51

Proband 19

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36						
37		2,69	9,33	2,10	3,55	12,63
64	Actinomyces					1,85
81					0,77	
139						0,57
140						0,75
161						1,12
162-164	Prevotella				3,94	1,24
195				1,90		
202						1,96
203-204	Burkholderia	2,15	2,55			1,32
205-207	Neisseria / Hämophilus	4,42	4,82	21,79	8,94	2,31
210	Actinobacillus / 'Treponema					1,15
211-212	Veillonella parvula/dispar	1,13	6,40	1,57	21,73	4,44
222-223	Actinobaculum			25,53	1,23	1,47
231-233	Rothia/Actinobaculum	6,44	5,63	5,59	2,68	2,94
249-252	Acinetobacter	1,56			1,19	0,90
256						1,17
258-26	Actinobacillus			1,51	2,74	2,15
261-265	Bacteroides	7,35	4,59		15,85	7,99
266	Prevotella		3,14			
267-268	Prevotella	4,51	5,21	2,89	2,69	3,36
270-272	Fusobacterium	1,61	5,40	3,26	5,74	8,19
276-277	Granulicatella	2,38			2,28	0,94
283-285	Fusobacterium	1,34	2,29		1,25	6,58
289		1,25				
293					2,59	
298						0,66
302						0,73
304		2,43				
307-310	Streptococcus	34,14	54,24	31,27	16,57	21,78
311						1,58
312					0,53	
313-315		1,76				0,52
317-318	Streptococcus mutans	1,53				
323					0,96	
324		2,98			1,34	
326		2,54			2,54	
406						0,69
498					0,58	

Proband 20

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
37		3,59	1,65	2,70		12,63
64	Actinomyces					3,33
81					0,75	
139						1,50
159						0,56
162-164	Prevotella				0,93	1,35
172		1,28				
173			2,95			
178					0,60	
197	Lautropia	47,82	42,95	1,55		
200	Acinetobacter/Bordetella					1,35
203-204	Burkholderia	1,41				1,84
205-207	Neisseria / Hämophilus	2,52	4,93	5,45	12,68	4,26
208						2,24
211-212	Veillonella parvula/dispar	2,94			14,90	9,62
214-215	Treponema	5,55			1,17	
222-223	Actinobaculum					0,63
23	Rothia / Tropheryma				2,87	
231-233	Rothia/Actinobaculum				0,76	
249-252	Acinetobacter	6,58				0,79
256						4,51
258-26	Actinobacillus				2,39	
261-265	Bacteroides	4,74			32,95	16,81
266	Prevotella		7,40			
267-268	Prevotella		7,40			
270-272	Fusobacterium	2,99		5,85	1,73	9,65
276-277	Granulicatella				1,39	
283-285	Fusobacterium					7,47
289		1,24				
297						1,30
307-310	Streptococcus	12,43	35,80	24,66	18,97	12,37
312			1,19			
313-315					0,80	0,69
316		3,93			0,68	
317-318	Streptococcus mutans			7,33		4,85
319	Catonella			1,60		
322						1,24
324		1,13				
408			4,69	6,34	2,14	0,94
411					3,65	
498					1,47	
499						1,85

Proband 21

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36						3,29
37					3,98	
64	Actinomyces					1,11
133		9,80				
139						2,58
159						1,14
161						1,49
162-164	Prevotella					3,43
186						1,20
193/194						4,67
203-204	Burkholderia	25,74				1,75
205-207	Neisseria / Hämophilus		8,24		3,24	1,48
211-212	Veillonella parvula/dispar			6,23	11,97	4,96
214-215	Treponema	17,46		27,83		2,88
216						1,28
257						2,32
261-265	Bacteroides				5,32	9,80
270-272	Fusobacterium				2,14	2,78
283-285	Fusobacterium				1,94	43,49
302						1,55
307-310	Streptococcus	46,99			54,89	7,34
313-315						1,74
326			9,99	3,89		
331					12,85	
362				14,76		
363			1,91			
372				22,22		
408					4,91	
461				25,81		
462			71,86			

Proband 22

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
37		9,50			0,76	3,68
74					0,79	3,89
81					0,85	
179						2,26
193/194						1,47
200	Acinetobacter/Bordetella		4,73			
203-204	Burkholderia	7,33			1,79	3,24
205-207	Neisseria / Hämophilus	13,42		26,90	28,26	22,85
211-212	Veillonella parvula/dispar	4,92	1,92		7,97	2,15
214-215	Treponema	11,79	4,77			1,95
218						0,59
222-223	Actinobaculum					0,58
224					1,19	
225		1,91				
228-229						0,86
231-233	Rothia/Actinobaculum				2,19	
249-252	Acinetobacter	2,59				
256						0,54
258-26	Actinobacillus	1,73			2,75	1,53
261-265	Bacteroides	1,53			6,44	4,64
267-268	Prevotella			23,95	4,57	3,53
270-272	Fusobacterium	8,33			9,73	2,36
276-277	Granulicatella	1,49			1,79	
278						0,64
280		1,88				
283-285	Fusobacterium	3,29				12,72
288	Enterokokken	2,54			2,94	
303					1,15	
304					1,53	
307-310	Streptococcus	16,75		45,73	14,49	15,38
311		1,42				
313-315				2,37	1,52	0,92
317-318	Streptococcus mutans	2,93	9,89			
319	Catonella					2,22
323					1,79	
324		1,82			1,44	
326		2,73	11,89		5,74	1,22
327				1,60		
359						1,87
363			44,13			
372			18,39			
411					1,35	8,75
460			4,28			

Proband 23

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36						4,25
37		5,60				1,48
64	Actinomyces				1,21	5,66
74					2,37	4,25
100			9,14			
102			17,29			
139						2,74
162-164	Prevotella				0,86	1,14
193/194						0,57
198			11,14			
203-204	Burkholderia	1,92	9,98	8,25		
205-207	Neisseria / Hämophilus	7,89		9,34	17,75	4,94
211-212	Veillonella parvula/dispar	8,32			12,83	3,43
214-215	Treponema	8,65			0,49	
225		1,45				
227						0,99
228-229					0,95	8,46
23	Rothia / Tropheryma				0,76	
231-233	Rothia/Actinobaculum	1,33		4,57	4,20	4,12
249-252	Acinetobacter	2,64				
256						1,55
258-26	Actinobacillus	1,78			0,87	
261-265	Bacteroides	19,48			22,58	13,17
266	Prevotella			5,96		
267-268	Prevotella			7,44		
270-272	Fusobacterium	5,35			3,54	1,32
276-277	Granulicatella	2,22			1,16	
280		1,16				
283-285	Fusobacterium				5,56	3,92
289		1,43				
293		1,20			1,34	
303					0,72	
304				1,76		
307-310	Streptococcus	16,27		66,58	2,91	11,69
311				2,55		
317-318	Streptococcus mutans	2,77				
324		2,28			0,87	
326		2,38			0,82	
363			22,80			
411		2,37			1,67	
462			29,82			

Proband 24

T-RF	Erreger	<i>In-situ</i> Biofilm			Speichel	Plaque
		2h	6h	24h		
36						3,12
37		7,29				6,65
64	Actinomyces					3,63
65			2,58			
68-69	Nocardia					1,28
80			5,55			
98			1,66			
100			3,85			
102			4,14			
139						4,18
198			4,56			
203-204	Burkholderia	3,17	35,20			1,86
205-207	Neisseria / Hämophilus	1,64	2,62	3,42	2,18	6,67
208						3,46
211-212	Veillonella parvula/dispar	7,96			27,74	12,38
214-215	Treponema	5,39				
225			1,58			
231-233	Rothia/Actinobaculum	2,72		5,18		1,29
249-252	Acinetobacter	7,25				5,18
256						2,78
261-265	Bacteroides	5,80			19,27	21,69
267-268	Prevotella			4,54	1,28	
270-272	Fusobacterium	5,36			2,55	6,58
273					1,84	
276-277	Granulicatella	4,39			2,43	
288	Enterokokken	2,33				
297						2,94
304				2,72		
307-310	Streptococcus	38,87		84,95	17,48	1,96
317-318	Streptococcus mutans	2,30	2,86			1,12
324		3,73			5,32	
326		2,82			2,84	
363			3,94			
456			6,32			
462			14,92			