

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse mikrobieller Biofilme mittels innovativer molekularbiologischer Methoden

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Julia Drescher
aus Berlin

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Zusammenfassung | 3 |
| 1.1. Kurzbeschreibung | 3 |
| 1.1.1. Abstract | 4 |
| 1.2. Einleitung | 5 |
| 1.3. Methodik | 7 |
| 1.3.1. Dot Blot..... | 7 |
| 1.3.1.1. Patientenkollektive/Rinderbiopsien | 7 |
| 1.3.1.2. Oligonukleotidsonden | 8 |
| 1.3.1.3. PCR und Dot Blot Hybridisierung..... | 8 |
| 1.3.2. FISH | 9 |
| 1.3.2.1. Patientenkollektive/Rinderbiopsien | 9 |
| 1.3.2.2. Oligonukleotidsonden | 9 |
| 1.3.2.3. FISH | 10 |
| 1.4. Ergebnisse | 11 |
| 1.4.1. Dot Blot-Hybridisierung..... | 11 |
| 1.4.1.1. Selenomonas spp..... | 11 |
| 1.4.1.2. Filifactor alocis..... | 12 |
| 1.4.1.3. Guggenheimella bovis | 12 |
| 1.4.2. FISH | 12 |
| 1.4.2.1. Selenomonas spp..... | 12 |
| 1.4.2.2. Filifactor alocis..... | 13 |
| 1.4.2.3. Guggenheimella bovis | 14 |
| 1.5. Diskussion | 14 |
| 1.5.1. Ausblick | 17 |
| 1.6. Literaturverzeichnis | 17 |
| 2. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung | 19 |
| 3. Publikationen | 22 |
| 4. Lebenslauf | 53 |
| 5. Publikationsliste | 54 |
| 6. Danksagung | 55 |

Analyse mikrobieller Biofilme mittels innovativer molekularbiologischer Methoden

1. Zusammenfassung

1.1. Kurzbeschreibung

Neue molekularbiologische Methoden gewinnen bei der Untersuchung von Infektionskrankheiten zunehmend an Bedeutung. So stehen mit Nukleinsäureamplifikationstechniken (PCR) und der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) kulturunabhängige Verfahren zur Verfügung, die sich für die Diagnostik, Prävalenzstudien und für die Biofilmforschung eignen.

Bei der FISH binden fluoreszenz-markierte Oligonukleotidsonden spezifisch an komplementäre RNA Sequenzen. Sie gewährt -durch Visualisierung- Einblicke in die Morphologie, die Stoffwechselaktivitäten und die räumliche Verteilung von Bakterien und deren Beziehung zum umliegenden Gewebe.

Die beiden molekularbiologischen Verfahren (PCR und FISH) ergänzen damit die bisherigen konventionellen kulturellen Methoden und können somit unter anderem zu einer besseren Aufklärung der Ätiologie und der Pathogenese diverser Infektionskrankheiten beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Sie benutzt, um die Rolle von putativen pathogenen Spezies bei chronischen Infektionen, der Parodontitis beim Menschen und der Dermatitis Digitalis beim Rind, zu untersuchen. An beide Infektionen sind komplexe mikrobielle Biofilme beteiligt, von welchen bisher nicht kultivierte Bakterienspezies einen erheblichen Teil ausmachen. Parodontitis ist eine akut oder chronisch verlaufende bakterielle Infektionskrankheit des Zahnhalteapparates. Welche ätiologische Rolle *Selenomonas spp.* dabei spielen, konnte bisher aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in diversen Prävalenzstudien nicht geklärt werden. Während sich in unserer Studie anhand der Dot Blot Analyse kein signifikanter Zusammenhang zwischen *Selenomonas spp.* und Parodontitis aufzeigen ließ, konnte die FISH einen wertvollen Hinweis über ihre Rolle bei der Biofilmarchitektur liefern. Im Gegensatz dazu konnte mittels der Dot Blot Analyse die vorherrschende Rolle von *Filifactor alocis* bei der Parodontitis eindeutig bestätigt werden. Der Erreger befindet sich somit auf Augenhöhe mit den bisher bekannten Oralpathogenen wie z.B. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Fusobacterium nucleatum*. Die FISH konnte hierbei durch Visualisierung des distinkten Aufbaus des Biofilms und Kolo-kalisationen mit anderen Erregern, seine Rolle als diagnostischer Markerkeim untermauern.

In allen drei Arbeiten konnte durch die Kombination von PCR-basiertem Keimnachweis und FISH entscheidende Erkenntnisse zur Rolle der drei Bakterienspezies bei der Pathogenese dieser Biofilm-assoziierten Erkrankungen gewonnen werden.

Bei der Dermatitis digitalis bei Rindern handelt es sich um eine ulcerative akut oder chronisch verlaufende Entzündung der Klauen v.a. bei Milchkühen, welche in Bezug auf beteiligte Mikroorganismen der Parodontitis sehr ähnelt. *Guggenheimella bovis* wurde dabei in einer schweizer Studie als möglicher pathogener Keim vermutet und nachgewiesen. Während die Dot Blot Analyse von deutschen Rindern keine Beteiligung von *Guggenheimella bovis* ergab, konnte mit Hilfe der FISH von zwei schweizer Bioplaten exemplarisch ihre Relevanz und die Interaktion mit dem Wirt an der Grenzfläche zum Gewebe gezeigt werden.

1.1.1. Abstract

Recently, innovative molecular biological methods for diagnosing infectious diseases have been gaining importance. Culture independent methods like polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence in situ hybridization (FISH) provide promising opportunities for epidemiology and biofilm analysis.

In FISH-experiments specific oligonucleotide probes targeting complementary RNA-sequences allow a culture independent identification of microorganisms in their natural environment. By visualization this method provides an insight into morphology, metabolism and spatial distribution of bacteria and their relation to circumjacent tissue.

Both PCR and FISH add to conventional culture dependent methods and are able to improve understanding of aetiology and pathogenesis of different infectious diseases.

In this work FISH and dot blot hybridization were used to examine the role of potential pathogens in chronic mixed infections as human periodontitis and dermatitis digitalis in cattle.

Complex microbial biofilms are involved in both these infections including a majority of fastidious or yet uncultured species.

Periodontitis is an inflammatory bacterial infection of the periodontium. As of yet various studies have been unable to reveal the aetiological relevance of *Selenomonas* spp. in periodontitis. In our dot blot examination we did not find any significant correlation between *Selenomonas* spp. and periodontitis. However, FISH showed high numbers and the spatial distribution and network of this microorganism. Therefore *Selenomonas* spp. are suspected to have an influence on biofilm formation and structure.

In contrast dot blot experiments for *F. alocis* corroborate suspicion that this microorganism plays an important role in this infection, being highly prevalent in periodontitis samples as compared to healthy controls. *Filifactor* was on the same level with other widely accepted periodontal pathogens, for example *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and

Fusobacterium nucleatum. In this case, FISH confirmed *F. alocis* as an excellent marker organism for diagnostic assays, visualizing distinct structure of biofilm and co-localization phenomena.

Dermatitis digitalis in cattle is an ulcerative acute or chronic inflammatory disease affecting the claws which is similar to periodontitis considering the mixed aerob-anaerob microflora. *Guggenheimella bovis* seemed to be a putative pathogen in a swiss study. While dot blot analysis in German cattle did not show any involvement of *G. bovis*, FISH could show in two Swiss biopsies their relevance and interaction with host being present deep in the tissue of infected sites.

All three investigations, outlined above were able to give insights into the role of the three bacterial species in pathogenesis of biofilm associated diseases by combining PCR-based bacterial detection and FISH.

1.2. Einleitung

Seit Mitte der 80iger Jahre gewinnen neue molekularbiologische Methoden zur Diagnostik von Infektionskrankheiten zunehmend an Bedeutung. So stehen mit Nukleinsäureamplifikationstechniken und der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) kulturunabhängige Verfahren zur Verfügung, die sich durch eine vergleichsweise hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnen [Schweickert 2004]. Dieses gilt insbesondere für anspruchsvolle, schwer oder bisher nicht kultivierte Spezies, wie sie bei aerob-anaeroben Mischinfektionen zu finden sind.

Die Nukleinsäureamplifikationstechniken, wie z. B. die Polymerase Kettenreaktion (PCR-polymerase chain reaction) mit anschließender Dot Blot Hybridisierung ist eine der sensitivsten Untersuchungsmethoden und eignet sich unter anderem für Prävalenzstudien, da mit ihr eine große Anzahl von DNA-Proben analysiert werden kann. Sie ist somit von unschätzbarem Wert für die Epidemiologie schwer oder bisher nicht kultivierbarer Mikroorganismen.

Bei der FISH binden fluoreszenz-markierte Oligonukleotidsonden spezifisch an komplementäre RNA Sequenzen. Sie erlaubt somit die Visualisierung und gleichzeitig kulturunabhängige Identifikation von Mikroorganismen in ihrem natürlichen Habitat [Wagner 2003].

Es hat sich dabei gezeigt, dass die FISH eine schnelle, kostengünstige und präzise Methode zur Identifikation und Quantifizierung von Mikroorganismen ist. Zusätzlich gewährt sie Einblicke in die Morphologie, die Stoffwechselaktivitäten und die räumliche Verteilung von Bakterien und deren Beziehung zum umliegenden Gewebe. Daher bietet sich die FISH insbesondere für die Analyse von Mischinfektionen und Biofilmen an. Biofilme sind sessile Lebensgemeinschaften von Bakterien. Diese Lebensform bringt für die Mikroorganismen entscheidende Vorteile, z.B. sind sie durch eine Matrix, die von ihnen selbst produziert wird, vor Angriffen des Immunsystems der Wirtsorganismen geschützt. Durch hochorganisierte Netzwer-

ke verschiedener Bakterienspezies bilden sich Nahrungsketten innerhalb der Biofilme und damit ökologische Nischen für anspruchsvolle Mikroorganismen.

Die beiden molekularbiologischen Verfahren (Dot Blot Hybridisierung und FISH) ergänzen damit die bisherigen konventionellen kulturellen Methoden und können somit zu einem besseren Verständnis der Ätiologie und der Pathogenese diverser Infektionskrankheiten beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Sie benutzt, um die Rolle von putativen pathogenen Spezies bei chronischen Infektionen, der Parodontitis und der Dermatitis Digitalis, zu untersuchen. An beide Infektionen sind komplexe mikrobielle Biofilme beteiligt, von welchen bisher nicht kultivierte Bakterienspezies einen erheblichen Teil ausmachen.

Parodontitis, die allein im Jahre 2010 deutschlandweit einen finanziellen Schaden von 363 Mio. Euro verursacht hat, ist eine akut oder chronisch verlaufende bakterielle Infektionskrankheit des Zahnhalteapparates hoher Prävalenz, die unbehandelt zu entzündlichem Abbau sowohl des parodontalen Ligamentes als auch des Knochens führt und damit vorzeitigen Zahnverlust verursachen kann. Sicher ist, dass es sich um eine Mischinfektion [Socransky 1998] handelt, wobei bei der Vielzahl der in den parodontalen Taschen bereits nachgewiesenen Mikroorganismen immernoch nicht fest steht, welche Erreger ursächlich und welche lediglich als Kommensalen beteiligt sind.

Dermatitis digitalis bei Rindern ist eine ulzerative akut oder chronisch verlaufende Entzündung der Klauen v.a. bei Milchkühen, wobei vornehmlich die Fesselbeuge der Hinterläufe am Übergang von der Haut zum Ballenhorn betroffen ist [Blowey 1988]. Die Infektion kann zu Lahmheit und einem Abfall der Milchproduktion führen und ist somit auch aus ökonomischer Sicht von Bedeutung.

Sie ähnelt dem Krankheitsbild „Parodontitis“ beim Menschen, da auch hier die Vielzahl der beteiligten noch teilweise unbekanntem bakteriellen Spezies eine massive Gewebedestruktion zur Folge hat. Bei beiden Infektionen stehen insbesondere die Treponemen in Verdacht, eine große Rolle bei der Ätiologie der Erkrankung zu spielen. Neuerdings ist bei der Dermatitis digitalis eine bisher unbekannte Spezies, die *Guggenheimella bovis* [Wyss 2005], aufgrund ihres Nachweises in den Läsionen und ihrer proteolytischen Aktivität, ins Visier der Mikrobiologen geraten.

Ziel der Studien war es, mittels PCR und nachfolgender Dot Blot Hybridisierung und FISH die Prävalenz und die räumliche Verteilung im Biofilm von *Selenomonas* spp., *Filifactor alocis* und *Guggenheimella bovis* zu untersuchen, und damit zur Aufklärung ihrer ätiologischen Rolle bei der Parodontitis bzw. der Dermatitis digitalis beizutragen.

1.3. Methodik

1.3.1. Dot Blot

1.3.1.1. Patientenkollektive/Rinderbiopsien

1.3.1.1.1. Probenentnahme von Parodontitispatienten

Zum molekularbiologischen Nachweis der potentiellen parodontalen Pathogene *Selenomonas* spp. wurden von drei verschiedenen Patientenkollektiven (CP = chronic periodontitis, n = 62, GAP = generalized aggressive periodontitis, n = 82 und PR = periodontitis resistant, n = 19) 742 subgingivale Plaqueproben entnommen. Für die Untersuchungen für *Filifactor alocis* entnahm man insgesamt 490 subgingivale Proben (CP = 30, GAP = 72, PR = 19).

Die Einteilung der Kollektive basierte auf den Kriterien des internationalen Workshops für die Klassifizierung von Parodontalerkrankungen von 1999 [Armitage 2000].

Dabei wiesen die Probanden mit chronischer Parodontitis an wenigstens 30% der verbliebenen Zähne eine Taschentiefe von ≥ 4 mm auf und die Probanden mit generalisierter aggressiver Parodontitis an mehr als drei Zähnen (ausgenommen Inzisivi und 6 Jahr-Molaren, Krankheitsbeginn vorm 30. Lebensjahr) eine Taschentiefe von ≥ 6 mm.

Das dritte Kollektiv bildete die Kontrollgruppe. Diese Probanden waren mindestens 65 Jahre alt, hatten noch wenigstens 20 natürliche Zähne ohne Anzeichen einer aktiven Parodontitis, bis zu diesem Zeitpunkt noch nie eine Parodontistherapie erhalten, und wiesen einen Attachmentverlust von höchstens 2mm und Taschentiefen von < 5 mm auf.

Ausschlusskriterien waren chronisch systemische Erkrankungen, antientzündliche oder antimikrobielle Therapie innerhalb der letzten sechs Monate, Schwangerschaft und Stillzeit.

Bei allen Probanden wurden die Plaqueproben nach supragingivaler Reinigung aus den jeweils tiefsten Taschen mittels drei steriler Papierspitzen entnommen.

1.3.1.1.2. Dermatitis digitalis-Proben

Zum Nachweis von *Guggenheimella bovis* wurden von 58 erkrankten brandenburgischen Milchkühen Stanzbiopsien von ca. 0,7cm im Durchmesser entnommen und zweigeteilt. Die Hälften wurden jeweils für die Dot Blot Hybridisierung und die FISH verwendet. Zusätzlich wurden noch zwei weitere vormals *Guggenheimella*-positiv getestete Proben von schweizer Rindern -ausschließlich für die FISH- in die Studie einbezogen.

1.3.1.2. Oligonukleotidsonden

Die spezifischen Oligonukleotidsonden SELE (5'-TCGGAATGTTGTCCCCATCC-3') für *Selenomonas* spp., FIAL (5'-TCTTTGTCCACTATCGTTTTGA-3') für *F. alocis* und GUBO1 (5'-CCAGTGGCTATCCCTGTGTGAAGG-3') für *G. bovis* wurden mit Hilfe der Datenbanken GenBank, EMBL und Ribosomal Database Projekt II [Maidak 2001] in silico durch vergleichende Sequenzanalyse erstellt. Dabei wurden die Sonden so konfiguriert, dass maximal ein bis zwei Fehlbasenpaarungen schon keine ausreichende Bindung mehr ermöglichten, um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen.

Zur Detektion wurden alle Oligonukleotidsonden (EUB 338=panbakterielle Sonde, SELE, FIAL und GUBO1) nonisotopisch mit Digoxigenin markiert.

1.3.1.3. PCR und Dot Blot Hybridisierung

Es erfolgte die DNA-Extraktion und Amplifizierung mittels der panbakteriellen Primer TPU1 (korrespondierend zur Position 8 bis 27 des 16S rRNA Genes von *E. coli*) und RTU3 (korrespondierend zur komplementären Position 519 bis 536 des 16S rRNA Genes von *E. coli*) Der Nachweis der erfolgreichen Amplifizierung erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese [Moter 1998].

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf Nylonmembranen pipettiert und mit UV-Licht fixiert.

Um die Spezifität der Sonden zu evaluieren und optimieren wurde zusätzlich eine weitere Membran nach gleichem Schema mit PCR-Produkten nah verwandter Mikroorganismen und 35 diversen anderen Oralpathogenen angefertigt, die als Positivkontrollen (*Selenomonas sputigena* DSM 20758^T, *Selenomonas noxia* DSM 19578^T und *Centipeda periodontii* DSM 2778^T für SELE, *Filifactor alocis* ATCC 35896^T für FIAL und *Guggenheimella bovis* DSM 15657^T für GUBO1) oder Negativkontrollen (*Selenomonas lactificifex* DSM 20757^T und *Selenomonas ruminatum* subsp. *ruminantium* DSM 2150^T für SELE, *Filifactor villosus* ATCC 33388^T für FIAL und *Tindallia magadiensis* DSM 10318^T für GUBO1) fungierten.

Die Oligonukleotidsonde EUB338 [Amann1990], die an einem konservierten Genabschnitt der 16S rRNA in Bakterien bindet, wurde eingesetzt, um eine erfolgreiche PCR-Amplifikation sicherzustellen.

Nach erfolgter Hybridisierung wurde mit anschließenden Waschschritten ungebundene Sonde entfernt. Die mit Digoxigenin markierte gebundene Sonde wurde mittels Antikörpern detektiert. Nach Entfernung von überflüssigen Antikörpern wurde das Substrat CSPD (Disodium 3 - (4 - methoxyspiro{1,2 – dioxetane - 3,2' - (5' - chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan} - 4 -yl) phenyl phosphate) hinzugefügt. Beim enzymatischen Abbau des CSPDs durch den Digoxi-

geninantikörper kommt es zur Chemilumineszenz, die zur Schwärzung von Röntgenfilmen führt.

Daher konnten die Membranen auf herkömmliche Röntgenfilme gelegt, und nach 1-30 stündiger Exposition entwickelt werden.

1.3.2. FISH

1.3.2.1. Patientenkollektive/Rinderbiopsien

1.3.2.1.1. Probenentnahme von Parodontitispatienten und Aufarbeitung für die FISH

Für die FISH wurden den GAP Patienten mittels speziell hergestellter Trägersysteme die in vivo gewachsenen Biofilme entnommen [Wecke 2000].

Dabei wurden Polytetrafluorethylenmembranen um kleine Plastikspitzen gewickelt und mit Cyanoacrylatkleber fixiert. Die Träger wurden in die parodontalen Taschen von Parodontitispatienten eingebracht, fixiert und für 7 Tage dort belassen. Nach Entnahme und Formalinfixierung [Moter 1998] wurden sie in Technovit, einem Methacrylat-Kunstharz, eingebettet, mit einem Rotationsmikrotom geschnitten und als 3µm starke Schnitte auf silanisierte Objektträger aufgebracht [Wecke 2000].

Zusätzlich wurden für die *Selenomonas* Versuchsreihe in Streifen geschnittene Thermanox-deckgläser aus Kunststoff -für den direkten Vergleich zwischen FISH und Elektronenmikroskopie- simultan in einer parodontalen Tasche belassen.

Die Biopsien gewann man während eines parodontalchirurgischen Eingriffes. Nach Entnahme erfolgte die Verarbeitung nach dem oben genannten Procedere.

1.3.2.1.2. Dermatitis digitalis-Proben

Zum Nachweis von *Guggenheimella bovis* wurde die Hälfte Stanzbiopsien, der von den 58 erkrankten einheimischen und der zwei schweizer Milchkühen, nach identischem Muster verarbeitet.

1.3.2.2. Oligonukleotidsonden

Die spezifischen FISH-Sonden SELE für *Selenomonas* spp., FIAL für *F. alocis* und GUBO1 für *G. bovis* hatten die identische Sequenz, wie die oben beschriebenen Dot Blot-Sonden. Für die FISH wurden die Sonden mit den unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen Fitc (Flu-

oresceinisothiocyanat), Cy3 (Indocarbocyanin) und Cy5 (Indodicarbocyanin) markiert, was eine simultane Anwendung ermöglichte.

1.3.2.3. FISH

Um die FISH-Sonden zu optimieren und evaluieren wurden die bereits erwähnten Bakterienstämme als Positiv- und Negativkontrollen fixiert, auf Kontrollobjektträger aufgetropft und mit den FISH-Sonden hybridisiert. Für jede Sonde wurde unter Zuhilfenahme des Programmes daime (digital image analysis in microbial ecology) [Daims 2006] die optimale Formamidpufferkonzentration der Hybridisierungslösung, bei der die maximale Stringenz und damit Spezifität der Sonde erreicht ist, ermittelt. Dabei ergab sich für die Oligonukleotidsonde SELE (für *Selenomonas* spp.) eine optimale Formamidkonzentration von 30%, für FIAL (für *F. alocis*) von 20% und für GUBO1 (für *G. bovis*) von 30%.

Kontrollobjektträger mit den entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen wurden bei jeder FISH-Untersuchung mitgeführt.

Die Technovitschnitte wurden in abgedunkelten, feuchten Kammern für 2-3h bei 50°C hybridisiert. Überflüssige Hybridisierungslösung wurde mit Waschpufferlösung entfernt. Nach Trocknung wurden die Schnitte mit Eindeckmedium zur Vermeidung von Fluoreszenzverlusten und Deckglas versehen. Das Eindeckmedium enthielt den unspezifischen Nukleinsäurefarbstoff DAPI = 4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid zur sequenzunabhängigen Darstellung von Mikroorganismen und eukaryonten Zellkernen.

Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mittels eines Epifluoreszenzmikroskops (AxioPlan II), welches mit Schmalbandfiltersets zur überlappungsfreien Detektion der Fluoreszenzsignale und einer Digitalkamera (AxioCam HRC) ausgestattet war.

Die Thermanoxträgernschnitte wurden rasterelektronenmikroskopisch von unserem Kooperationspartner Christoph Schaudinn, Ashmanson Center for Advanced Electron Microscopy and Imaging, House Ear Institute, Los Angeles, CA, USA, ausgewertet.

1.4. Ergebnisse

1.4.1. Dot Blot-Hybridisierung

Die Hybridisierungen mit der panbakteriellen Sonde EUB338 konnten aufgrund der Signalstärke für alle entnommenen Proben, sowie für die Negativ- als auch Positivkontrollen eine erfolgreiche Amplifikation belegen.

1.4.1.1. *Selenomonas* spp.

Die Oligonukleotidsonde SELE, erfasste wie erwartet die Positivkontrollen *Selenomonas sputigena*, *Selenomonas noxia* und *Centipeda periodontii*.

Die Negativkontrollen *Selenomonas lactificex* und *Selenomonas ruminantium* subsp. *ruminantium* sowie alle 35 weiteren Oralpathogene wurden von der Sonde nicht markiert.

Von 742 einbezogenen Proben waren 140 SELE-positiv, bzw. von den 163 Probanden wurden 62 SELE-positiv getestet.

Die Prävalenz, d.h. wenigstens eine SELE-positive Zahnfleischtasche pro Proband, war mit 51,6% im GAP-Kollektiv am höchsten, gefolgt von dem PR-Kollektiv mit 47,4%.

Die geringste Prävalenz mit 25,6% wies das CP-Kollektiv auf.

Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen SELE-positiven Probanden und deren Alter oder Geschlecht.

Vergleichende Analysen derselben Proben aus vorherigen Dot-Blot-Hybridisierungen mit anderen Sonden, spezifisch für die putativ oralpathogenen Spezies *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* und *Fusobacterium nucleatum* ergab, dass *Selenomonas* spp. eine niedrigere Prävalenz sowohl im GAP (27,3%) als auch im CP-Kollektiv (10,3%) aufwies.

In der Kontrollgruppe (PR) wurden für die etablierten parodontalen Spezies *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *F. nucleatum* ähnlich hohe Prävalenzen wie für *Selenomonas* spp. (24,3%) festgestellt. Lediglich die Oralpathogene *T. forsythia* und *T. denticola* wiesen eine höhere bzw. niedrigere Prävalenz auf als *Selenomonas* spp.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Selenomonas* spp. unterschieden sich die Prävalenzen von *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola* und *T. forsythia* signifikant zwischen den GAP und den PR Kollektiven.

P. gingivalis, *P. intermedia*, *T. denticola* und *F. nucleatum* wurden im CP Kollektiv signifikant häufiger nachgewiesen als in der Kontrollgruppe.

Setzte man die Taschentiefen der Probanden ins Verhältnis, ergab sich für flache Taschen (1-3mm) eine höhere Prävalenz von *Selenomonas* spp. in der Kontrollgruppe als in beiden erkrankten Kollektiven.

In tiefen Taschen(>5mm) wurden *Selenomonas* spp. signifikant häufiger bei GAP als bei CP Patienten detektiert.

In Taschen mittlerer Tiefe wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

1.4.1.2. Filifactor alocis

Die Oligonukleotidsonde FIAL, erfaßte die Positivkontrolle *Filifactor alocis*.

Die Negativkontrolle *Filifactor villosus* sowie 43 weitere Oralpathogene wurden von der Sonde nicht markiert.

Nach Probenanalyse ergab sich daraus eine Prävalenz von *F. alocis* im GAP-Kollektiv von 68,1%, im CP-Kollektiv von 66,7% und 5,3% im PR-Kollektiv. Das Vorkommen von *F. alocis* im GAP und im CP-Kollektiv war damit signifikant häufiger als im PR-Kollektiv. Gleiches gilt nach Analyse der Daten für *T. forsythia* und *F. nucleatum*, wobei auch die Prävalenz von *F. nucleatum* im CP-Kollektiv signifikant höher war als in der Kontrollgruppe (PR). *F. alocis* war damit nach *T. forsythia* und *F. nucleatum* der am häufigsten gefundene Mikroorganismus.

Setzte man die Taschentiefen der Probanden ins Verhältnis ergab sich für Taschen von 4-6 mm und 7-9 mm eine höhere Prävalenz von *F. alocis* in beiden erkrankten Kollektiven als in der Kontrollgruppe. Zwischen den beiden Parodontitisgruppen wurden bezüglich der Taschentiefe keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden.

1.4.1.3. Guggenheimella bovis

Die Oligonukleotidsonde GUBO1, erfaßte keine der klinischen Proben aus dem deutschen Kollektiv, sondern lediglich die Positivkontrolle *G. bovis*.

1.4.2. FISH

1.4.2.1. Selenomonas spp.

Sowohl die Positiv- (*S. sputigena*, *S. noxia*, *C. periodontii*) als auch die Negativkontrollen (*S. lactificex*, *S. ruminantium* subsp. *ruminantium*) wurden mit der panbakteriellen Sonde EUB338 erfolgreich erfasst.

Die Hybridisierungen mit der spezifischen Sonde SELE markierte erwartungsgemäß nur die Positivkontrollen. Die Negativkontrollen, *S. lacticifex* und *S. ruminantium* subsp. *ruminantium* - als phylogenetisch nächste Verwandte - und weitere Oralpathogene wurden nicht erfasst. Mit der panbakteriellen Sonde EUB338 war die Visualisierung der in vivo gewachsenen Biofilme sowohl an den Trägern als auch in den Gingivabiopsien möglich. In einigen Trägern aus dem GAP-Kollektiv und in einer Biopsie konnten mit der Sonde SELE Mikroorganismen aus dem Genus *Selenomonas* markiert werden. Waren *Selenomonaden* vorhanden, so erschienen sie meist zahlreich, dicht angeordnet und wiesen die typische halbmondförmige Morphologie auf [Moore 1987]. Die *Selenomonaden* bevorzugten weder ein bestimmtes Taschenareal (apikal, mittig, zervikal) noch eine bestimmte Membranseite (dem Zahn oder der Gingiva zugewandt). Erfolgte zusätzlich eine Hybridisierung mit einer Sonde spezifisch für Fusobakterien, konnte eine enge räumliche Anordnung der beiden Spezies beobachtet werden. In der FISH der Biopsie erschienen die Morphologie und das Erscheinungsbild der *Selenomonaden* ähnlich derer aus den Biofilmen der Träger. Mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden die Biofilme der aus den zeitgleich inserierten Thermanoxträgern optisch dargestellt, dabei wiesen zahlreiche Mikroorganismen die für *Selenomonas* spp. typische Struktur auf.

1.4.2.2. Filifactor alocis

Die Positiv- (*F. alocis*) als auch die Negativkontrolle (*F. villosus*) wurden mit der panbakteriellen Sonde EUB338 erfasst.

Bei der Hybridisierung mit der spezifischen Sonde FIAL wurde nur die Positivkontrolle gefärbt.

Sowohl in der Biopsie als auch in 9 von 11 GAP-Patienten konnte *F. alocis* detektiert werden.

F. alocis wurde vornehmlich in den tieferen Regionen der Zahnfleischtasche gefunden, weniger im Zahnhalsbereich. Dabei besiedelte er vorwiegend die dem Gewebe zugewandte Seite des Biofilms.

Während der Organismus in einigen Bereichen des Biofilms ohne erkennbare Anordnung auftrat, zeigte er in anderen Bereichen wiederum einen höheren Grad an Organisation. So wurde er in dicht angeordneten Ansammlungen vorgefunden, die konzentrische Strukturen ausbildeten.

Eine ähnliche Anordnung konnte auch bei der Gingivabiopsie beobachtet werden, wobei er auch zweigähnliche Strukturen innerhalb des erkrankten Gewebes ausbildete.

1.4.2.3. *Guggenheimella bovis*

Während die panbakterielle Sonde EUB338 sowohl *G. bovis* (Positivkontrolle) als auch *T. magadiensis* (Negativkontrolle) erfolgreich erfasste, detektierte die Sonde GUBO1 erwartungsgemäß nur die Positivkontrolle.

Alle untersuchten Proben zeigten unter der EUB338 den charakteristischen Aufbau von DD-Ulzera, mit großen Ansammlungen diverser Mikroorganismen, wobei fusiforme Bakterien und Spirochäten die vorderste Front bildeten.

Guggenheimella bovis konnte in keiner der Biopsien der 58 deutschen Rinder nachgewiesen werden, weder in den oberflächlichen oder tieferen Schichten der Ulzera noch an der Grenzfläche zum gesunden Gewebe.

Lediglich in den zwei schweizer Biopaten gelang die Visualisierung von *G. bovis*, wobei diese Spezies vorwiegend kugelförmige Mikrokolonien bildete und weniger vereinzelt auftrat. Die Mikrokolonien kamen sowohl in gesunden als auch in erkrankten Regionen der Biopsien vor, die Mehrzahl davon in gesunden Gewebeabschnitten.

Dabei unterschieden sich die *Guggenheimella*-positiven Biopsien in der Biofilmstruktur und bei den beteiligten Morphotypen der Bakterien erheblich von den von Spirochäten dominierten Ulzera der deutschen Rinder.

1.5. Diskussion

Sowohl die humane Parodontitis als auch die Dermatitis digitalis beim Rind sind nach heutigem Wissensstand bakterielle Mischinfektionen mit anschließender Gewebedestruktion, wobei sich immer noch nicht klar abzeichnet, welche Erreger ursächlich bzw. nur als Kommensalen beteiligt sind.

So ist allein die Zusammensetzung der Mundflora (humanes orales Mikrobiom), noch nicht hinreichend geklärt. Nach aktuellen molekularbiologischen Analysen können etwa 1200 Taxa im menschlichen Mund unterschieden werden. Hiervon sind ca. 68% der mutmaßlichen Phylotypen nicht kultiviert [Dewhirst 2010, Griffen 2011].

Problematisch ist vor allem in diesem Zusammenhang der Fakt, dass die Mikroorganismen nicht planktonisch vorkommen, sondern in einem Biofilm als sessile, - oftmals an einer Oberfläche adhären - Lebensgemeinschaft hoch organisiert sind. Sie schützen sich vor Angriffen des Immunsystems mit einer eigens synthetisierten extrazellulären polymeren Substanzschicht (EPS-matrix), die aus Nukleinsäuren, Proteinen, Polysacchariden und Fetten besteht [Hall-Stoodley 2012]. Innerhalb dieser Aggregate profitieren sie von Nahrungsketten und sind in der Lage über das sogenannte „quorum sensing“ speziesübergreifend miteinander zu

kommunizieren. Dabei wird über biochemische Verbindungen, sogenannte Autoinducer, die Genexpression der Population gesteuert und die Dichte derselben, bzw. deren Wachstum überwacht [Claiborne Fuqua 1994].

All diese Eigenschaften erschweren zusätzlich einen kulturellen Nachweis, wenn es ihn nicht sogar unmöglich macht und führen so, vermutlich auch über eingeschränkte Diffusion oder unterschiedliche Teilungsgeschwindigkeiten der Mikroorganismen innerhalb der Biofilme, zu einer erhöhten Antibiotikatoleranz. Diese wäre bei einem rein planktonischem Vorkommen so wahrscheinlich nicht gegeben und ist für die Kliniker von besonderem Interesse, da die zügige Auswahl eines geeigneten Antibiotikums therapieentscheidend ist.

Die damit gerade zur Notwendigkeit werdende eingehendere Analyse der Biofilmarchitektur wird u. a. durch die FISH realisiert, die, mit geringem Zeitaufwand, den molekularbiologischen kulturunabhängigen Nachweis mit der Mikroskopie kombiniert und somit die räumliche Auflösung und die Menge der potentiellen Pathogene, wobei eine Unterscheidung zwischen Besiedlung und Kontamination möglich wird.

Auch die PCR für sich genommen hat nur eine qualitative und sehr bedingt quantitative Aussagekraft, zumal bei der Parodontitis in tieferen Zahnfleischtaschen insgesamt mehr Bakterien vorhanden sind und damit eher über der Nachweisgrenze der PCR-Nachweise liegen, ohne dabei zwischen pathogenen und opportunistischen Erregern zu differenzieren.

In dieser Arbeit gelang mit Hilfe der PCR und anschließender Dot Blot Hybridisierung eine kulturunabhängige Prävalenzstudie diverser potentiell pathogener Mikroorganismen.

Die Dot Blot Hybridisierung ergab im Falle von *Selenomonas* spp. keinen entscheidenden Hinweis auf ihre Beteiligung an der Entstehung bzw. Progression der Parodontitis, zumal streng genommen- alle positiv markierten Felder auch *Centipeda periodontii*, einem phylogenetisch nah verwandtem und vormals bereits mit Parodontitis assoziiertem Mikroorganismus [Lai 1983] zugeordnet werden könnten.

Lediglich die FISH konnte einen möglichen Zusammenhang herstellen, da sie *Selenomonas* spp. wenn vorhanden, in hoher Zahl und in allen Bereichen des Biofilmes nachwies.

Mit Hilfe der FISH war eine klare morphologische Unterscheidung zwischen *Selenomonas* spp. und *Centipeda periodontii* möglich.

Die elektronenmikroskopischen Bilder der Träger aus SELE-positiv getesteten parodontalen Taschen verglichen mit den Bildern der FISH derselben Taschen unterstützen die Annahme, dass zumindest *Selenomonas*-artige Mikroorganismen aufgrund ihres strukturellen Aufbaus, v.a. mit den an der konkaven Seite inserierenden Flagellen, eine wichtige Rolle in der Biofilmarchitektur einnehmen und damit indirekt einen negativen Verlauf der Erkrankung bewirken könnten.

Sogar die These über mögliche Koaggregationsphänomene mit anderen Oralpathogenen, wie z.B. *F. nucleatum* spp. konnte visuell untermauert werden [Kolenbrander 1989].

Im Gegensatz dazu konnte für *F. alocis*, verglichen mit anderen bisher weit verbreitet akzeptierten Oralpathogenen, eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung und Progression der Parodontitis abgeleitet werden.

So könnte er deren Platz als diagnostischer Marker [Riep 2009] für Parodontitis einnehmen, da seine Prävalenz sowohl im GAP als auch im CP-Kollektiv, unabhängig von der Tiefe der Zahnfleischtasche, signifikant gegenüber den gesunden Probanden erhöht war.

Unterstützung findet die These auch durch die FISH, bei der die Visualisierung von *F. alocis*, organisiert in einem Biofilm, gelang. Die enge räumliche Beziehung zu anderen Mikroorganismen lässt dabei auf symbiontisches, und damit u.U. das Krankheitsbild negativ beeinflussendes, Verhalten schließen. Es konnte sogar gezeigt werden, dass er vornehmlich apikale und mittlere Bereiche der parodontalen Taschen besiedelt und dabei, auf der gewebezugewandten Seite, die Wirtsabwehr möglicherweise stark bestimmen könnte.

Daher sollte generell über eine Korrektur bzw. Neu-Evaluierung der diagnostischen Markerkeime bei Parodontitis nachgedacht werden.

Im Falle der Dermatitis Digitalis konnte für *G. bovis* mit beiden Methoden keine ätiologische Rolle bestätigt werden [Wyss 2005]. Es gelang aber mit der FISH auszuschließen, dass frühere Detektionen von *G. bovis* auf einer reinen Kontamination beruhten. Auch seine gelungene Darstellung in gesunden Bereichen der Ulzera und seine gewebeinvasiven Eigenschaften lassen durchaus den Schluss zu, dass dieser Mikroorganismus, so vorhanden, durchaus das Feld für die bakterielle Invasion ebnet. So fand sich eine sehr unterschiedliche Biofilmarchitektur. Bei den deutschen Fällen dominierten vornehmlich Treponemen die tieferen Gewebeschichten, während bei den schweizer Rinderklauen die Guggenheimella an vorderster Front der Gewebeinvasion war. So kann man darüber spekulieren, ob es grundsätzlich verschiedene Formen der Dermatitis digitalis gibt.

Die Kombination von PCR-basierten Nachweisverfahren PCR mit FISH ist ein viel versprechendes Verfahren für die Untersuchung der pathogenetischen Bedeutung, v.a. von schwer oder nicht kultivierbaren Mikroorganismen.

Da die reine Prävalenz (PCR, Dot Blot) die Pathogenität eines Mikroorganismus noch nicht beweist, kann seine Visualisierung mit Hilfe der FISH wichtige Indizien für seine Rolle im Biofilm oder seine Invasivität liefern. Das gilt ebenfalls für schwer kultivierbare und bisher nicht kultivierte Spezies.

In den drei vorgestellten arbeiten wurden sie erfolgreich zur Analyse von Biofilm assoziierten Erkrankungen eingesetzt.

1.5.1. Ausblick

Auch die momentan auf dem Vormarsch befindliche Mikrobiomanalyse ist bis dato lediglich eine Bestandsaufnahme und zurzeit noch nicht geeignet, einen direkten Zusammenhang zwischen gesundheitsfördernden und krankheitsauslösenden Mikroorganismen herzustellen. Auch hier kann die Kombination mit FISH wertvolle Informationen für die Infektionsbiologie liefern.

Weiterhin kann sie für funktionelle Analysen, wie Bakterium-Wirt Interaktionen eingesetzt werden.

Da die FISH unter anderem über den rRNA Gehalt von bakteriellen Zellen Auskunft geben kann, und somit ihrer Aktivität in situ, wäre es somit möglich, Vitalitätsmessungen von Bakterien in Biofilmen vorzunehmen. Dies würde neue Perspektiven in der in situ Analyse von Biofilmregulationen eröffnen und eine gezieltere Auswahl und Verordnung von Antibiotika ermöglichen.

1.6. Literaturverzeichnis

- [1] Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA: Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 1990, 56: 1919-1925
- [2] Armitage GC: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest Dent* 2000, 79(6):31-35.
- [3] Blowey RW, Sharp MW: Digital dermatitis in dairy cattle. *Vet Rec* 1988, 122:505-508.
- [4] Daims H, Lucker S, Wagner M: daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environ Microbiol* 2006, 8(2):200-213.
- [5] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, Lakshmanan A, Wade WG: The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010 October, 192(19):5002-5017.
- [6] Fuqua W C, Winans S C, Greenberg E P: Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *Journal of Bacteriology* 1994, 176(2):269-275
- [7] Griffen AL, Beall CJ, Firestone ND, Gross EL, DiFranco JM, Hardman JH, Vriesendorp B, Faust RA, Janies DA, Leys EJ: A phylogenetically – curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. *PLOS ONE* 2011, 6(4):e19051

- [8] Hall-Stoodley L, Stoodley P, Sandeep K, Hoiby N, Moser C, Costerton J W, Moter A, Bjarnsholt T: Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012, 65:127-145
- [9] Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV: Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia* and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect Immun* 1989, 57(10):3194-3203.
- [10] Lai C-H, Males BM, Dougherty A, Berthold P, Listgarten MA: *Centipeda periodontii*, gen. nov., sp. nov. from Human Periodontal Lesions. *Int J Syst Bacteriol* 1983, 33: 628-635
- [11] Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Jr., Saxmann PR, Farris RJ, Garrity GM, Olsen GJ, Schmidt TM, Tiedje JM: The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 2001, 29(1): 173-174.
- [12] Moore LVH, Johnson JL, Moore WEC: *Selenomonas noxia* sp. nov., *Selenomonas flueggei* sp. nov., *Selenomonas infelix* sp. nov., *Selenomonas dianae* sp. nov. and *Selenomonas artemidis* sp. nov., from the Human Gingival Crevice. *Int J Syst Bacteriol* 1987, 36(3): 271-280
- [13] Moter A, Hoenig C, Choi BK, Riep B, Göbel UB: Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J Clin Microbiol* 1998, 36(5): 1399-1403
- [14] Riep B, Edesi-Neuss L, Claessen F, Scarabis H, Ehmke B, Flemming TF, Bernimoulin JP, Göbel UB, Moter A: Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol* 2009, 47(6): 1705-1711
- [15] Schweickert B, Moter A, Lefmann M, Göbel UB: Let them fly or light them up: matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and fluorescence in situ hybridisation (FISH). *APMIS* 2004, 112: 856-885
- [16] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998, 25(2):134-144.
- [17] Wagner M, Horn M, Daims H: Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* 2003, 6: 302-309
- [18] Wecke J, Kersten T, Madela K, Moter A, Göbel UB, Friedmann A, Bernimoulin J: A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol Lett* 2000, 191(1): 95-101.
- [19] Wyss C, Dewhirst FE, Paster BJ, Thurnheer T, Luginbuhl A: *Guggenheimella bovis* gen. nov., sp. nov., isolated from lesions of bovine dermatitis digitalis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, 55(Pt 2):667-671.

2. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

„Ich, Julia Drescher, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „ Analyse mikrobieller Biofilme mittels innovativer molekularbiologischer Methoden“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

20.02.2013

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Julia Drescher hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Drescher J, Schlafer S, Schaudinn C, Riep B, Neumann K, Friedmann A, Petrich A, Göbel UB, Moter A.

Molecular epidemiology and spatial distribution of *Selenomonas* spp. in subgingival biofilms.

Eur J Oral Sciences 2010; 118: 466-474

60 Prozent

- Etablierung, Optimierung und Evaluation der Oligonukleotidsonde SELE
- Optimierung und Durchführung der Dot Blot Experimente
- Analyse der Daten
- Gewebeprobenentnahme
- Aufbereitung des Patientenmaterials und Anfertigung von Methakrylatschnitten für die FISH
- Optimierung und Durchführung der Fluoreszenz in situ Hybridisierungsexperimente
- Mikroskopische Analyse der Fish Experimente und digitale Bildverarbeitung
- Erstellung des Manuskriptes

Publikation 2:

Schlafer S, Nordhoff M, Wyss C, Strub S, Hübner J, Gescher DM, Petrich A, Göbel UB, Moter A.

Involvement of *Guggenheimella bovis* in digital dermatitis lesions of dairy cows

Vet Microbiol. 2008; 128: 118-125

30 Prozent

- Diskussion des Studiendesigns
- Mitarbeit an der Aufarbeitung der Gewebeproben
- Mikroskopie und Bilddokumentation

Publikation 3:

Schlafer S, Riep B, Griffen AL, Petrich A, Hübner J, Berning M, Friedmann A, Göbel UB, Moter A.

Filifactor alocis – involvement in periodontal biofilms

BMC Microbiol. 2010; 10:66

20 Prozent

- Gewebeprobenentnahme und Fixierung des Patientenmaterials
- Mitarbeit bei den Hybridisierungsexperimenten
- Diskussion der Daten
- teilweise Bilddokumentation

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

3. Publikationen

Drescher J, Schlafer S, Schaudinn C, Riep B, Neumann K, Friedmann A, Petrich A, Göbel UB, Moter A.

Molecular epidemiology and spatial distribution of *Selenomonas* spp. in subgingival biofilms.

Eur J Oral Sciences 2010; 118: 466-474

doi : 10.1111/j.1600-0722.2010.00765.x

Schlafer S, Riep B, Griffen AL, Petrich A, Hübner J, Berning M, Friedmann A, Göbel UB, Moter A.

Filifactor alocis – involvement in periodontal biofilms

BMC Microbiol. 2010; 10:66

doi: 10.1186/1471-2180-10-66

Schlafer S, Nordhoff M, Wyss C, Strub S, Hübner J, Gescher DM, Petrich A, Göbel UB, Moter A.

Involvement of *Guggenheimella bovis* in digital dermatitis lesions of dairy cows

Vet Microbiol. 2008; 128: 118-125

doi: 10.1016/j.vetmic.2007.09.024

4. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

5. Publikationsliste

Publikation 1:

Drescher J, Schlafer S, Schaudinn C, Riep B, Neumann K, Friedmann A, Petrich A, Göbel UB, Moter A.

Molecular epidemiology and spatial distribution of *Selenomonas* spp. in subgingival biofilms.

Eur J Oral Sciences 2010; 118: 466-474

Impact factor : 1,890

Publikation 2:

Schlafer S, Nordhoff M, Wyss C, Strub S, Hübner J, Gescher DM, Petrich A, Göbel UB, Moter A.

Involvement of *Guggenheimella bovis* in digital dermatitis lesions of dairy cows

Vet Microbiol. 2008; 128: 118-125

Impact factor: 2,960

Publikation 3:

Schlafer S, Riep B, Griffen AL, Petrich A, Hübner J, Berning M, Friedmann A, Göbel UB, Moter A.

Filifactor *alocis* – involvement in periodontal biofilms

BMC Microbiol. 2010; 10:66

Impact factor : 2,370

6. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Frau Dr. Annette Moter, meiner fachlichen Betreuerin, bedanken, die mir die Möglichkeit der Promotion eröffnet und meine wissenschaftliche Denkweise maßgeblich beeinflusst hat. Sie hat mich stets unerschütterlich und konstruktiv auf dem akademischen Pfad gehalten und begleitet.

Insbesondere möchte ich mich bei Annett Petrich bedanken, die mit herausragendem Engagement meine rudimentären Fähigkeiten im Umgang mit Personalcomputern ausgefeilt hat.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, den Mitautoren und den Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene bin ich wegen der angenehmen und kollegialen Atmosphäre und der fachlichen Unterstützung dankbar.

Ich danke meinem Mann und meinen Eltern für das Interesse an meiner Arbeit, den Rat und die Ermutigungen sowie den großen und kleinen organisatorischen Hilfestellungen.