

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

DISSERTATION

Die Beteiligung ausgewählter putativer Pathogene
an Parodontitis und boviner Dermatitis digitalis:
Molekulare Epidemiologie und räumliche Verteilung in Biofilmen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Schlafer
aus Würselen bei Aachen

Gutachter: 1. PD Dr. med. Annette Moter
2. Prof. Dr. sc. med. Wolfgang Presber
3. PD Dr. med. Dirk Theegarten

Datum der Promotion: 24.02.2012

INHALT

Zusammenfassung	4-15
Anteilsklärung	16
Publikation 1. <i>Filifactor alocis</i> - involvement in periodontal biofilms.....	17-30
Publikation 2. Molecular epidemiology and spatial distribution of <i>Selenomonas</i> spp. in subgingival biofilms	31-42
Publikation 3. Involvement of <i>Guggenheimella bovis</i> in digital dermatitis lesions of dairy cows	43-50
Curriculum vitae.....	51-53
Publikationsliste.....	54
Selbständigkeitserklärung.....	55
Danksagung	56

ZUSAMMENFASSUNG

Abstract

Parodontitis ist die bakteriell bedingte entzündliche Erkrankung aller Strukturen des Zahnhalteapparates und stellt im fortgeschrittenen Lebensalter die häufigste Ursache für Zahnverlust dar. Die Mikroflora parodontaler Läsionen ist der Zahnwurzel als komplexer, strukturell heterogener Biofilm aufgelagert und umfasst eine Vielzahl nicht oder nur schwer kultivierbarer Organismen, die erst durch die Einführung DNA-basierter Nachweisverfahren in den Blickpunkt der Forschung gerückt sind.

Filifactor alocis ist ein solches schwer zu kultivierendes Bakterium, das in den vergangenen Jahren wiederholt bei Patienten mit chronischer Parodontitis (CP) und generalisierter aggressiver Parodontitis (GAP) nachgewiesen werden konnte. In der ersten Studie der vorliegenden Arbeit wurde eine für *F. alocis* spezifische Oligonukleotidsonde entwickelt und die Prävalenz des Organismus mit Dot Blot Hybridisierungen in insgesamt 490 subgingivalen Proben von GAP-Patienten, CP-Patienten und Parodontitis-resistenten (PR) Patienten untersucht. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und anschließender Epifluoreszenzmikroskopie die räumliche Verteilung und strukturelle Anordnung von *F. alocis* in subgingivalen Biofilmen von GAP-Patienten analysiert.

In der zweiten Studie dieser Arbeit wurde, mit denselben Methoden, die Prävalenz oraler *Selenomonas* spp., die in der Vergangenheit ebenfalls oft mit Parodontalerkrankungen assoziiert worden sind, in 742 Proben von GAP-, CP- und PR Patienten bestimmt und ebenso die räumliche Anordnung dieser Organismen in GAP-Biofilmen studiert.

F. alocis erwies sich als hervorragender Markerkeim für parodontale Erkrankungen. Der Organismus konnte bei einem Großteil der CP- und GAP-Patienten detektiert werden und wies zugleich eine ausgesprochen niedrige Prävalenz in der PR Gruppe auf. Auch die mikroskopische Untersuchung subgingivaler Biofilme von GAP-Patienten ließ auf eine entscheidende Rolle von *F. alocis* bei der Pathogenese von Parodontalerkrankungen schließen. Der Organismus siedelte vornehmlich in der Tiefe der parodontalen Läsion in enger Nähe zur Wirtsabwehr und war, in Assoziation mit anderen Parodontalkeimen, an zahlreichen Formationen beteiligt, die eine strukturelle Organisation des Biofilms widerspiegeln.

Die Prävalenz von *Selenomonas* spp. dagegen war nicht signifikant mit dem Vorliegen von Parodontalerkrankungen korreliert. FISH und die anschließende epifluoreszenzmikroskopische Analyse von GAP-Biofilmen zeigten jedoch, dass *Selenomonas* spp., wenn sie in einer Probe dargestellt werden konnten, oft in großer Zahl auftraten und in diesen Fällen einen wichtigen Beitrag zur Biofilmarchitektur leisteten.

In der dritten Studie dieser Arbeit wurden Biopsien boviner Dermatitis digitalis (DD), einer entzündlich ulzerierenden Biofilmerkrankung der Rinderklaue, untersucht. *Guggenheimella bovis*, ein nur selten in DD-Läsionen nachzuweisendes Bakterium, konnte mit Hilfe von FISH tief im Gewebe, als Pionierkeim in einigem Abstand von der voranschreitenden bakteriellen Front, dargestellt werden.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht eindrucksvoll den Wert einer kombiniert epidemiologischen und mikroskopischen Analyse der Beteiligung putativer Pathogene für das Studium von Biofilmerkrankungen.

Einleitung und Zielstellung

Parodontitis ist die bakteriell bedingte entzündliche Erkrankung aller Strukturen des Zahnhalteapparates und durch fortschreitenden Abbau von Desmodontalfasern und dem die Zahnwurzel umgebenden Alveolarknochen gekennzeichnet. Chronische Verlaufsformen der Parodontitis weisen in der erwachsenen Bevölkerung Deutschlands eine hohe Prävalenz auf [1] und stellen im fortgeschrittenen Alter die häufigste Ursache für Zahnverlust dar [2]. Daneben existieren aggressive Verlaufsformen, die trotz hohem therapeutischen Aufwand und guter Mitarbeit des Patienten oft mit einer raschen Zerstörung des Zahnhalteapparates einhergehen.

Die bakterielle Ätiologie der Parodontitis stellt die Forschung vor eine Herausforderung. Die subgingivale Mikroflora des Menschen umfasst mehrere hundert verschiedener Organismen, von denen ein Großteil nicht oder nur schwer kultivierbar ist und erst durch die Einführung DNA-basierter Nachweisverfahren detektiert werden konnte [3, 4]. Bis weit in die 90er Jahre hinein richtete sich jedoch das Hauptaugenmerk der Forschung auf das Studium einiger gut kultivierbarer Parodontalpathogene, darunter *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [5-8]. Erst im Laufe des zurückliegenden Jahrzehnts wurde die Assoziation vieler nicht oder nur schwer kultivierbarer subgingivaler Organismen mit parodontalen Erkrankungen eingehender untersucht [9-11]. Gleichzeitig wurden Zweifel an der Geeignetheit einiger der weithin akzeptierten gut kultivierbaren Parodontalpathogene als Marker für parodontale Erkrankungen erhoben [12].

Bakterien in parodontalen Läsionen leben als strukturell heterogene Gemeinschaften, die der Wurzeloberfläche als Biofilm aufgelagert sind und durch ein komplexes Wechselspiel zwischen mikrobiellen und Wirtsfaktoren, aber auch durch zahlreiche bakterielle Interaktionen gekennzeichnet sind [13]. Für unser Verständnis der Parodontitis und für ein gezieltes therapeutisches Eingreifen ist nicht nur die Untersuchung der Assoziation von Erregern mit dem Auftreten und Schweregrad der Erkrankung von großer Bedeutung, sondern auch das Studium der Architektur subgingivaler Biofilme und der Rolle einzelner Organismen darin.

Filifactor alocis ist ein Gram-positives, schwer kultivierbares Bakterium, das in den letzten Jahren wiederholt in subgingivalen Proben bei chronischer Parodontitis (CP) und generalisierter aggressiver Parodontitis (GAP) detektiert werden konnte [9, 11, 14, 15] und ebenfalls, in einer longitudinalen Studie, mit fortschreitendem parodontalen Stützgewebsverlust assoziiert worden ist [16]. Ziel der ersten Studie der vorliegenden Arbeit war es, eine für *F. alocis* spezifische Oligonukleotidsonde zu entwickeln und mit Hilfe von Dot Blot Hybridisierungen die Prävalenz des Organismus in subgingivalen Proben von GAP- und CP-Patienten sowie einer Parodontitis-resistenten (PR) Kontrollgruppe zu bestimmen. Darüber hinaus wurden mittels eines speziellen Trägersystems *in vivo* gewachsene subgingivale Biofilme von GAP-Patienten gesammelt. Mit Hilfe dieser Technik sollte *F. alocis* durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und

anschließende Epifluoreszenzmikroskopie erstmals im Biofilm dargestellt und die räumliche Anordnung und Verteilung des Organismus in der parodontalen Tasche untersucht werden.

In der zweiten Studie dieser Arbeit sollte, unter Verwendung derselben Methoden, die Prävalenz oraler *Selenomonas* spp. bei GAP- und CP-Patienten im Vergleich zur PR Gruppe bestimmt und ebenfalls eine Analyse der topographischen Verteilung dieser Organismen im Biofilm vorgenommen werden. Die Gruppe der oralen *Selenomonas* spp., die eine Vielzahl unkultivierbarer Organismen umfasst, ist in den vergangenen Jahrzehnten oft mit chronischer und aggressiver Parodontitis in Zusammenhang gebracht worden [11, 17, 18]. Ebenso häufig jedoch ist bei parodontal erkrankten Patienten nur eine geringe Prävalenz von *Selenomonas* spp. ermittelt worden [14, 19-21]. Die Ergebnisse der Epifluoreszenzmikroskopie sollten in diesem Teil der Arbeit durch elektronenmikroskopische Untersuchungen unterstützt werden.

Die dritte Studie der vorliegenden Arbeit befasste sich mit *Guggenheimella bovis*, einem vor wenigen Jahren erstmals beschriebenen Bakterium, das aus der Dermis von an Dermatitis digitalis (DD) erkrankten Rindern isoliert worden ist [22]. Bovine DD ist eine entzündlich-ulzerierende Rinderklauenerkrankung, die im Hinblick auf ihre bakterielle Ätiologie interessante Parallelen zur Parodontitis aufweist [23, 24]. Anders als bei der Parodontitis ist es bei DD jedoch möglich, das erkrankte Gewebe *in toto* zu exzidieren und die gesamte bakteriell infizierte Läsion mikroskopisch darzustellen. Ziel der Arbeit war es auch hier, eine spezies-spezifische Oligonukleotidsonde zu entwickeln und, ebenfalls gestützt von einer Dot Blot-basierten Epidemiologie, *G. bovis* im Gewebe darzustellen und in der bakteriellen Läsion zu verorten.

Methodik

Oligonukleotidsonden. Zur Detektion der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Organismen wurden spezifische, zur 16S rRNA komplementäre Oligonukleotidsonden auf der Basis vergleichender 16S rRNA Gensequenzanalyse entwickelt. Die Spezifität der Sonden FIAL, spezifisch für *F. alocis*, SELE, spezifisch für orale *Selenomonas* spp. und GUBO, spezifisch für *G. bovis*, wurde *in silico*, durch Vergleich mit allen in den Datenbanken GenBank, EMBL und Ribosomal Database Project II [25-27] deponierten 16S rRNA Gensequenzen überprüft. Darüber hinaus wurden bei allen FISH-Versuchen Kontrollhybridisierungen mit fixierten Kulturen der Zielorganismen und phylogenetisch eng benachbarter Bakterien durchgeführt. Bei allen Dot Blot Experimenten dienten PCR-Produkte der 16S rRNA entsprechender Bakterienkulturen als Positiv- und Negativkontrollen. Für die FISH wurde weiterhin das Programm daime [28] angewandt, um mit Hilfe digitaler Bildanalyse den für die jeweilige Sonde idealen Formamidgehalt des Hybridisierungspuffers zu bestimmen. Im Falle der Sonden FIAL und SELE wurden sowohl beim Dot Blot als auch bei der FISH zusätzlich Kontrollhybridisierungen mit einer Reihe ausgewählter parodontaler und phylogenetisch verwandter Organismen durchgeführt, um mögliche falsch positive Resultate auszuschließen. Zum Nachweis von *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *F. nucleatum* und *A. actinomycetemcomitans*

wurden darüber hinaus die bereits publizierten Sonden POGI, PRIN, TDEN, B(T)AFO, FUNU und ACAC verwendet [29].

Patientenproben. Patienten mit CP und solche mit GAP wurden anhand der Kriterien des internationalen Workshops zur Klassifikation parodontaler Erkrankungen im Jahr 1999 [30] diagnostiziert und für die Studien selektiert. Als Kontrollgruppe diente ein Kollektiv von Parodontitis-resistenten (PR) Patienten, die, obwohl sie das Alter von 65 Jahren überschritten und zeitlebens keine systematische Parodontaltherapie erhalten hatten, über 20 oder mehr Restzähne verfügten und keine Taschentiefe über 5 mm sowie an keiner Stelle einen klinischen Attachmentverlust von mehr als 2 mm aufwiesen. Patienten mit chronischen systemischen Erkrankungen sowie schwangere und in der Stillzeit befindliche Frauen waren von den Studien ausgeschlossen. Für die epidemiologischen Untersuchungen wurden bei allen Patienten subgingivale Proben mit Hilfe dreier steriler Papierspitzen aus den jeweils tiefsten parodontalen Taschen entnommen und der PCR-Amplifikation und anschließenden Dot Blot Hybridisierung zugeführt. In der Untersuchung zu *F. alocis* wurden insgesamt 490, in der zu oralen *Selenomonas* spp. insgesamt 742 subgingivale Proben ausgewertet.

Für die mikroskopische *in situ* Darstellung und Analyse der räumlichen Verteilung der Organismen wurden weiterhin *in vivo* gewachsene subgingivale Biofilme von GAP-Patienten gesammelt. Zu diesem Zweck wurden Membranen aus expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) um die Längsachse dünner Kunststoffspitzen gelegt und mit Cyanoacrylat befestigt. Die auf diese Weise gewonnenen Träger konnten in die parodontale Tasche eingeführt und am Zahn befestigt werden [31]. Dort wurden sie für die Dauer von 7 bis 14 Tagen belassen und von der subgingivalen Flora besiedelt, bevor sie entfernt, fixiert und für die FISH aufbereitet wurden. In der Untersuchung zu oralen *Selenomonas* spp. wurden zusätzlich in schmale Streifen geschnittene Thermanox-Deckgläser aus Kunststoff als Träger verwendet. Um einen Vergleich der auf künstlichen Oberflächen gewachsenen Biofilme mit natürlichen, im Gewebe entstandenen subgingivalen Biofilmen vornehmen zu können, wurden darüber hinaus einige Zahnfleischbiopsien von Parodontitispatienten gesammelt, fixiert und mit Hilfe von FISH untersucht.

Rinderklauenproben. Stanzbiopsien typischer DD-Läsionen von 58 brandenburgischen Rindern wurden entnommen und geteilt. Eine Hälfte jeder Biopsie wurde zur Bestimmung der Prävalenz von *G. bovis* mit Hilfe von Dot Blot Hybridisierungen verwendet, die andere der FISH und anschließenden mikroskopischen Analyse zugeführt. Zusätzlich wurden zwei DD-Biopsien von Schweizer Rindern, die in einer vorausgegangenen Studie positiv auf *G. bovis* getestet worden waren [32], für die FISH aufbereitet.

Dot Blot Hybridisierung. Aus allen subgingivalen Patientenproben und ebenso allen Rinderklauenbiopsien wurden nach Extraktion der DNA Fragmente bakterieller 16S rRNA Gene mit Hilfe von pan-bakteriellen Primern amplifiziert, die an einen hochkonservierten Bereich des 16S rRNA Gens binden [33]. Die PCR-

Produkte wurden auf Nylonmembranen pipettiert und durch UV-Strahlung fixiert. Für alle Dot Blot Versuche wurden am 3'-Ende mit Digoxigenin markierte Sonden verwendet. Nach Hybridisierung der Membranen und anschließenden Waschschritten wurden die gebundenen Sonden mit Hilfe von Anti-Digoxigenin-Antikörpern und einer anschließenden Chemilumineszenzreaktion detektiert und auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Spezifische Hybridisierungsbedingungen wurden durch die Wahl der Hybridisierungs- und Waschtemperaturen sowie die Zusammensetzung des Waschpuffers gesichert und durch geeignete bakterielle Positiv- und Negativkontrollen bestätigt. Auf diese Weise wurde einerseits die Prävalenz von *G. bovis* in den DD-Biopsien, andererseits die von *F. alocis* und den von SELE detektierten Organismen in den Zahntaschenproben bestimmt. In den subgingivalen Proben wurde weiterhin das Vorliegen statistisch signifikanter Prävalenzunterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen sowie der Einfluss der Taschentiefe auf die Prävalenz in den jeweiligen Gruppen untersucht. Zusätzlich wurden die Prävalenzen einiger häufig mit Parodontalerkrankungen assoziierter Organismen, darunter *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* und *F. nucleatum*, in denselben Proben mit identischen Methoden ermittelt und mit den Prävalenzen von *F. alocis* und den von SELE detektierten Organismen verglichen.

FISH und mikroskopische Analyse. Die für die mikroskopische Analyse gesammelten parodontalen Träger und ebenso die Gingiva- und Rinderklauenbiopsien wurden mit Formamid fixiert und anschließend in Kunststoff eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden 2-5 µm dünne Schnitte der Kunststoffblocks angefertigt und auf silanierte Glasobjektträger aufgebracht. Für die FISH wurden die verwendeten spezifischen Sonden wie auch die Sonde EUB338, die die Mehrzahl aller bakteriellen 16S rRNA Sequenzen bindet [34], am 5'-Ende mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, was eine gleichzeitige getrennte Darstellung der untersuchten Organismen und der übrigen Bakterienflora in den Biofilmen ermöglichte. Im Anschluss an die Hybridisierung und einen Waschvorgang zum Entfernen ungebundener Sondenmoleküle wurden Träger- und Gewebsschnitte mit DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid) gefärbt, einem unspezifischen DNA-Farbstoff, der neben der Mikroflora auch die Kerne eukaryotischer Zellen darstellt.

Schließlich wurden die Zell- und Koloniemorphologie sowie die räumliche Verteilung der untersuchten Organismen in den Biofilmen mit einem Epifluoreszenzmikroskop analysiert und durch Mikrographien mit einer hochauflösenden Mikroskopie-Kamera dokumentiert. In der Untersuchung zu oralen *Selenomonas* spp. wurde zusätzlich ein Träger aus einer auf *Selenomonas* spp. positiv getesteten parodontalen Tasche rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Ergebnisse

Die für die Studien entwickelten Oligonukleotidsonden detektierten sowohl bei den Dot Blot Hybridisierungen als auch bei den FISH Experimenten unter den gewählten Versuchsbedingungen zuverlässig alle bakteriellen Positivkontrollen, nicht aber die jeweiligen Negativkontrollen (Publikation 1, Figures 1,3; Pub. 2, Fig. 1, S3; Pub. 3, Fig. 1,2).

F. alocis konnte in den aus parodontalen Taschen gewonnenen Proben bei 77,8% der GAP-Patienten und 76,7% der CP-Patienten detektiert werden, zugleich aber nur bei 15,8% der PR-Patienten (Pub. 1, Fig. 2a). In der jeweils tiefsten Tasche eines Patienten lag mit 68,1% bei GAP und 66,7% bei CP in beiden parodontal erkrankten Gruppen eine signifikant höhere Prävalenz von *F. alocis* vor als in der PR Kontrollgruppe (5,3%) (Pub. 1, Fig. 2b). Die nach Taschentiefen aufgeschlüsselte Analyse zeigte, dass auch in flacheren Taschen von 4-6 mm Sondierungstiefe die Prävalenz von *F. alocis* bei beiden erkrankten Patientengruppen signifikant höher war als bei der Kontrollgruppe (Pub. 1, Fig. 2c). *F. alocis* wies in den untersuchten GAP- und CP-Proben eine höhere Prävalenz als *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* und *T. denticola* auf und war somit nach *F. nucleatum* und *T. forsythia* der am häufigsten detektierte Keim. Zugleich wurde *F. alocis* von allen untersuchten Organismen am seltensten in der Gruppe der PR-Patienten nachgewiesen (Pub. 1, Fig. 2b).

In der Mehrzahl der auf parodontalen Trägern gewachsenen subgingivalen Biofilme konnte *F. alocis* mit Hilfe von FISH dargestellt werden. Der Organismus trat bisweilen vereinzelt, zumeist aber in großen Gruppen als 1-2 µm, gelegentlich auch mehrere µm langes Stäbchen auf (Pub. 1, Fig. 5a) und konnte vornehmlich in den Bereichen der Biofilme nachgewiesen werden, die in der Tiefe der parodontalen Taschen gewachsen waren. Darüber hinaus befand sich *F. alocis* zumeist auf der zum Taschenepithel weisenden Seite der parodontalen Träger (Pub. 1, Fig. 4). *F. alocis* fand sich stets in enger räumlicher Nähe zu anderen Organismen und war an der Bildung verschiedener bakterieller Formationen, die eine strukturelle Organisation innerhalb der Biofilme erkennen ließen, beteiligt. So konnten Zellen von *F. alocis* in pilzförmigen Ausstülpungen der Biofilme, in konzentrischen, kugelförmigen, sowie in länglichen, oft als ‚Reagenzglasbürsten‘ bezeichneten bakteriellen Aggregaten nachgewiesen werden (Pub. 1, Fig. 5b-d). Auch in den untersuchten Gingivabiopsien konnte *F. alocis* in hoher Zahl und in ähnlich gearteten Formationen dargestellt werden (Pub. 1, Fig. 6).

Die epidemiologische Untersuchung zur Gruppe der oralen *Selenomonas* spp. brachte ein anderes Ergebnis. Die Prävalenz der von der Sonde SELE detektierten Organismen lag bei 27,3% in der Gruppe der GAP-Patienten, bei 10,3% in der Gruppe der CP-Patienten und zugleich bei 24,3% in der PR Kontrollgruppe. (Pub. 2, Fig. 2b). In flachen Taschen von 1-3 mm und ebenso in Taschen von 4-6 mm war darüber hinaus die Prävalenz in der PR Gruppe deutlich höher als in beiden erkrankten Patientengruppen (Pub. 2, Fig. 2c). Im direkten Vergleich mit anderen putativen Parodontalpathogenen wiesen die von SELE detektierten Organismen sowohl bei GAP- als auch bei CP-Patienten die geringste Prävalenz auf (Pub. 2,

Fig. 2b). Wenn jedoch auf einem der parodontalen Träger mit Hilfe der FISH SELE-positive Organismen nachgewiesen werden konnten, so traten sie stets in großer Zahl und in vielen Bereichen der Biofilme auf und wiesen eine für *Selenomonas* spp. typische halbmondförmige Morphologie auf (Pub. 2, Fig. 3). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen eines SELE-positiv getesteten Trägers zeigten ebenfalls eine Vielzahl *Selenomonas*-artiger Morphotypen und ließen ein netzartiges Geflecht der an den konkaven Seiten der Zellen entspringenden Geißeln erkennen (Pub. 2, Fig. 5).

In der epidemiologischen Untersuchung bei an DD erkrankten brandenburgischen Rindern konnte *G. bovis* mit Hilfe von Dot Blot Hybridisierungen in keiner der 58 Biopsien nachgewiesen werden (Pub. 3, Fig. 1,3). Die FISH und anschließende epifluoreszenzmikroskopische Untersuchung der brandenburgischen Bioplate zeigte einen von Spirochäten dominierten Biofilm (Pub. 3, Fig. 4). In den zwei zusätzlich untersuchten Schweizer Biopsien konnte *G. bovis* jedoch mit Hilfe der FISH zahlreich im Gewebe dargestellt werden. Die kleinen, kokkoiden Organismen bildeten zumeist kugelförmige Kolonien, teils in enger räumlicher Nähe zu anderen Bakterien, oft jedoch tief im Gewebe und in beträchtlichem Abstand zur voranschreitenden bakteriellen Infektion (Pub. 3, Fig. 5).

Diskussion

Die Einführung kulturunabhängiger Nachweisverfahren hat unser Verständnis der Mikroflora parodontaler Läsionen verändert. Durch PCR-Amplifikation und anschließende Sequenzierung bakterieller DNA aus subgingivalen Proben ist es gelungen, eine große Zahl von Organismen zu identifizieren, die in kulturbasierten Untersuchungen gar nicht oder nur höchst selten nachgewiesen werden konnten [3, 4]. *F. alocis* ist ein solcher schwer zu kultivierender Organismus, der erstmals im Jahre 1985 beschrieben wurde [35] und bis 1999 aufgrund einer fehlerhaften Sequenzierung fälschlicherweise dem Genus *Fusobacterium* zugeordnet war [36].

In der vorliegenden Arbeit konnte *F. alocis* bei der großen Mehrzahl der an GAP und ebenso der an CP erkrankten Patienten nachgewiesen werden (Pub. 1; Fig. 2a). Allein in der jeweils tiefsten Tasche eines jeden Patienten wies der Organismus eine Prävalenz von 68,1% bei GAP und 66,7% bei CP auf (Pub. 1, Fig. 2b). Da eine jede epidemiologische Untersuchung in hohem Maße von der Sensitivität des zugrundeliegenden Nachweisverfahrens abhängt, wurden zum Vergleich die Prävalenzen einiger eingehend untersuchter putativer Parodontalpathogene mit identischen Methoden in denselben Patientenproben bestimmt. Im Vergleich mit diesen Organismen wies *F. alocis* in der Gruppe der GAP-Patienten die drittgrößte und in der Gruppe der CP-Patienten sogar die zweitgrößte Prävalenz auf (Pub. 1, Fig. 2b). Er konnte dort häufiger detektiert werden als *P. gingivalis*, *T. denticola* und *T. forsythia*, drei Organismen, die in der Literatur als ‚roter Komplex‘ beschrieben sind und in höchstem Maße mit Parodontalerkrankungen assoziiert werden [37, 38].

Ebenso wichtig wie die hohe Prävalenz von *F. alocis* in den erkrankten Patientengruppen ist die außerordentlich niedrige in der Gruppe der PR Patienten. Sie stellt eine strenge Kontrollgruppe dar, da die Patienten zu keinem Zeitpunkt ihres Lebens eine systematische Parodontaltherapie erhalten hatten und trotz ihres fortgeschrittenen Alters von über 65 Jahren nur geringen Stützgewebsverlust und Taschen von maximal 5 mm Sondierungstiefe aufwiesen. Wenngleich neben mikrobiellen eine Vielzahl von Wirtsfaktoren an der Pathogenese der Parodontitis beteiligt ist, so ist doch davon auszugehen, dass die Patienten der Kontrollgruppe über eine Parodontalflora von geringer Pathogenität verfügten. In dieser Gruppe war *F. alocis* von allen untersuchten Organismen der am seltensten detektierte und neben *F. nucleatum* überhaupt der einzige, dessen Prävalenz im Vergleich zu beiden erkrankten Gruppen signifikant geringer war (Pub. 1, Fig. 2b).

Das gesamte bakterielle Biovolumen ist in einer tiefen parodontalen Tasche naturgemäß größer als in einer flachen. Da die Gruppe der GAP-Patienten, aber auch die der CP-Patienten eine im Vergleich zur PR Gruppe deutlich erhöhte durchschnittliche Taschentiefe aufwies (GAP: 7,8 mm; CP: 7,1 mm; PR: 3,6 mm), ist anzunehmen, dass dort bei der Probenentnahme größere Mengen bakterieller DNA mit den Papierspitzen gewonnen wurden. Die in der Arbeit durchgeführte, nach Taschentiefen aufgeschlüsselte statistische Analyse zeigt aber, dass die erhöhte Prävalenz in den erkrankten Patientengruppen nicht ausschließlich auf diese größere bakterielle Biomasse zurückzuführen ist, denn auch in Taschen von nur 4-6 mm Tiefe konnte *F. alocis* signifikant häufiger bei GAP- und CP-Patienten nachgewiesen werden (Pub. 1, Fig. 2c).

DNA-basierte Nachweisverfahren erlauben es, die Prävalenz eines Organismus in einem Habitat zu bestimmen, unabhängig von seiner Fähigkeit, unter Laborbedingungen zu wachsen. Doch auch die in dieser Arbeit verwendeten Methoden sind gewissen Fehlerquellen unterworfen. Die DNA-Extraktion gelingt bei verschiedenen Organismen unterschiedlich gut, die Zahl der Kopien des 16S rRNA Gens kann variieren, und schließlich können Unterschiede in der Affinität der verwendeten pan-bakteriellen Primer zu den verschiedenen 16S rRNA Genen vorliegen [39]. Die Ergebnisse der vorliegenden epidemiologischen Untersuchung werden jedoch von anderen Studien gestützt. In parodontalen Läsionen sind für *F. alocis* Prävalenzen von bis zu 90% ermittelt worden [15], und der Organismus wurde bereits in einer longitudinalen Studie mit voranschreitendem parodontalen Stützgewebsverlust assoziiert [16].

Wenngleich *F. alocis* nicht dazu beitragen kann, zwischen GAP und CP zu differenzieren, so lassen die Daten dieser Arbeit doch schließen, dass es sich, und dies mehr noch als bei den Organismen des roten Komplexes, um einen exzellenten Markerorganismus für Parodontalerkrankungen handelt.

Die epifluoreszenzmikroskopische Analyse *in vivo* gewachsener Biofilme von GAP-Patienten konnte der epidemiologischen Untersuchung weitere wertvolle Informationen hinzufügen. Es gelang nicht nur, *F. alocis* erstmals im subgingivalen Biofilm darzustellen, es konnte darüber hinaus auch untersucht werden, welche Bereiche des Biofilms der Organismus vornehmlich kolonisiert. Die verwendeten parodontalen Träger erstreckten sich über die gesamte Tiefe der Tasche und erlaubten, den dort gewachsenen Biofilm weitgehend intakt und ohne Verlust der räumlichen Zuordnung zu entfernen und der mikroskopischen Analyse zuzuführen. *F. alocis* fand sich, ähnlich wie es bereits für Treponemen der Gruppe I gezeigt werden

konnte [31], vornehmlich in den Regionen des Biofilms, die dem mittleren oder gar apikalen Teil der Tasche entstammten (Pub. 1, Fig. 4). Die ökologischen Bedingungen schienen demnach dort für eine Besiedlung durch *F. alocis* am günstigsten zu sein.

Natürlich schafft das Einführen eines Trägers in eine parodontale Läsion eine künstliche Situation. Der für die mikroskopische Untersuchung zur Verfügung stehende Biofilm bildet sich nicht direkt auf der Zahnwurzel, sondern auf einer ePTFE-Membran. Bald nach der Insertion wird die Membran jedoch vollständig vom Taschenexsudat benetzt, und es hat sich wiederholt gezeigt, dass die Konditionierung der Oberfläche von größerer Bedeutung für die anschließende Besiedelung ist als die Oberfläche selbst [31, 40]. Gleichzeitig stellt der parodontale Träger in der Tasche auch eine Barriere dar, die möglicherweise den Zugriff der Wirtsabwehr auf die zum Zahn weisende Seite des Biofilms hindert. Auf der dem Zahn abgewandten Seite des Trägers aber wächst der Biofilm in direktem Kontakt zum Taschenepithel, und gerade dort kolonisierte *F. alocis* bevorzugt (Pub. 1, Fig. 4).

Bemerkenswert ist, dass *F. alocis* stets eng verflochten mit anderen parodontalen Organismen und, oft palisadenartig angeordnet, in Formationen dargestellt werden konnte, die eine strukturelle Organisation des Biofilms reflektieren (Pub. 1, Fig. 5). Dies lässt ein enges Wechselspiel oder gar eine Abhängigkeit zwischen *F. alocis* und anderen subgingivalen Organismen vermuten und mag die erschwerte Kultivierbarkeit von *F. alocis* zum Teil erklären. Dass sich der Organismus in den untersuchten Gingivabiopsien in morphologisch gleichartigen Strukturen nachweisen ließ (Pub. 1, Fig. 6), legt einerseits nahe, dass die auf Trägern gewachsenen Biofilme natürlichen subgingivalen Biofilmen ähnlich sind und ist darüber hinaus weiteres Indiz dafür, dass sich *F. alocis* nicht nur häufig im parodontalen Biofilm findet, sondern auch maßgeblich zu dessen Architektur beiträgt. *F. alocis* ist nicht nur ein hervorragender Marker für parodontale Erkrankungen, sondern auch ein Organismus, dessen ökologische Rolle im subgingivalen Biofilm es eingehender zu untersuchen gilt.

Demgegenüber sprechen die Ergebnisse der epidemiologischen Untersuchung zu *Selenomonas* spp. gegen eine Verwendung dieser Organismen als Marker parodontaler Erkrankung. Zu gering war die Prävalenz bei CP-Patienten (10,3%) und auch bei GAP-Patienten (27,3%), und zu häufig konnten *Selenomonas* spp. in der PR-Kontrollgruppe detektiert werden (24,3%). Zudem wiesen alle anderen, zu Vergleichszwecken untersuchten parodontalen Organismen in beiden erkrankten Patientengruppen eine höhere Prävalenz auf (Pub. 2, Fig. 2b). Die Entwicklung weiterer Oligonukleotidsonden, um die Prävalenz einzelner *Selenomonas* Phylotypen in den Patientenproben bestimmen zu können, erschien vor diesem Hintergrund nicht zweckmäßig.

FISH mit der Sonde SELE und die anschließende mikroskopische Analyse der auf Trägern gewachsenen GAP-Biofilme ließen jedoch erkennen, dass Organismen auch bei insgesamt geringer Prävalenz in den Fällen, in denen sie eine parodontale Läsion besiedeln, von Bedeutung sein können. Wenn nämlich auf einem der Träger *Selenomonas* spp. nachgewiesen werden konnten, traten sie stets in hoher Zahl und zudem in vielen verschiedenen Bereichen des Biofilms auf (Pub. 2, Fig. 3). Es liegt nahe zu vermuten,

dass eine Gruppe von Organismen, die numerisch einen großen Anteil der Mikroflora ausmacht, auch entscheidend zum bakteriellen Zusammenspiel und zum Fortbestehen der Läsion beiträgt. Auch wiesen *Selenomonas* spp. eine enge räumliche Assoziation zu anderen parodontalen Organismen und insbesondere zu *Fusobacterium* spp. auf (Pub. 2, Fig. 3c,d). Die in Kulturversuchen beobachtete ausgeprägte Koaggregation zwischen Spezies beider Genera ist also möglicherweise auch für das subgingivale Biofilmwachstum von Bedeutung [41]. Ebenfalls von Interesse waren die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen, die auf einem Träger aus einer mit Hilfe der FISH auf *Selenomonas* spp. positiv getesteten Tasche eine Vielzahl von *Selenomonas*-artigen Morphotypen erkennen ließen (Pub. 2, Fig. 5). Die von der konkaven Seite dieser Organismen entspringenden Geißeln vermittelten den Eindruck eines verflochtenen Netzwerkes, und wenn auch nicht auszuschließen ist, dass es sich dabei um ein Fixierungsartefakt handelt, so lädt diese Beobachtung doch ein zu vermuten, dass das Netzwerk aus zahlreichen Geißeln eine strukturelle Funktion im Biofilm erfüllt.

Die Summe all dieser Observationen verdeutlicht, welchen Wert die mikroskopische Analyse *in vivo* gewachsener Biofilme für unser Verständnis möglicher pathogenetischer Zusammenhänge haben kann. Und genau das macht auch in Sonderheit die Untersuchung zu *G. bovis* deutlich. Der Organismus konnte in keiner einzigen der im Rahmen dieser Arbeit analysierten brandenburgischen Rinderbiopsien nachgewiesen werden (Pub. 3, Fig. 1), und auch die in einer Studie bei Schweizer Rindern ermittelte geringe Prävalenz [32] legte nahe, dass der Keim für die Pathogenese der DD keine entscheidende Rolle spielt und möglicherweise sogar nichts anderes als eine Kontaminante war. Erst die mikroskopische Untersuchung zweier auf *G. bovis* positiv getesteter Schweizer Biopsien zeigte, dass der Organismus eventuell doch in einigen Fällen von entscheidender Bedeutung sein kann. *G. bovis* konnte mit Hilfe der entwickelten spezifischen Sonde erstmals im Gewebe in kleinen, zumeist kugelförmigen Kolonien dargestellt werden und fand sich nicht nur inmitten des bakteriellen Biofilms, sondern auch in augenscheinlich gesunden Gewebsbereichen, die von der voranschreitenden bakteriellen Front noch nicht erreicht worden waren (Pub. 3, Fig. 5). Es ist also durchaus denkbar, dass *G. bovis*, wenn an der Infektion beteiligt, eine Art Vorreiterrolle einnimmt und das Eindringen anderer in die Pathogenese involvierter Organismen fördert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-basierte epidemiologische Untersuchung subgingivaler Patientenproben mit der mikroskopischen Analyse *in vivo* gewachsener Biofilme kombiniert, um so die Beteiligung von einerseits *Filifactor alocis*, andererseits von oralen *Selenomonas* spp. an Parodontalerkrankungen zu studieren. *F. alocis* erwies sich nicht nur als ein exzellenter Markerorganismus für CP und GAP, sondern war auch maßgeblich an der bakteriellen Architektur subgingivaler Biofilme von GAP-Patienten beteiligt und verdient somit höchste Aufmerksamkeit als mögliches Parodontalpathogen. *Selenomonas* spp. waren dagegen nicht signifikant mit dem Auftreten parodontaler Erkrankungen korreliert. Die strukturelle Analyse von Biofilmen zeigte jedoch sowohl für *Selenomonas* spp. als auch für *G. bovis*, dass auch Organismen, die nicht häufig mit einer Erkrankung assoziiert sind, in einigen Fällen eine gewichtige Rolle in der Biofilmarchitektur spielen können.

Referenzen

1. Schiffner U, Hoffmann T, Kerschbaum T, Micheelis W: Oral health in German children, adolescents, adults and senior citizens in 2005. *Community Dent Health* 2009, 26(1):18-22.
2. Reich E, Hiller KA: Reasons for tooth extraction in the western states of Germany. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993, 21(6):379-383.
3. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE: Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001, 183(12):3770-3783.
4. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG: The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010, 192(19):5002-5017.
5. Dahlen GG: Black-pigmented gram-negative anaerobes in periodontitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993, 6(2-3):181-192.
6. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C: Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000* 1999, 20:136-167.
7. Sela MN: Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001, 12(5):399-413.
8. Tran SD, Rudney JD, Sparks BS, Hodges JS: Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *J Periodontol* 2001, 72(1):1-10.
9. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ: New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003, 82(5):338-344.
10. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ: Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol* 2005, 43(8):3944-3955.
11. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst F *et al.*: Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2009, 80(9):1421-1432.
12. Riep B, Edesi-Neuss L, Claessen F, Skarabis H, Ehmke B, Flemmig TF, Bernimoulin JP, Gobel UB, Moter A: Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol* 2009, 47(6):1705-1711.
13. Kuboniwa M, Lamont RJ: Subgingival biofilm formation. *Periodontol 2000* 2010, 52(1):38-52.
14. Hutter G, Schlagenhauf U, Valenza G, Horn M, Burgemeister S, Claus H, Vogel U: Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology* 2003, 149(Pt 1):67-75.
15. Dahlen G, Leonhardt A: A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2006, 21(1):6-11.
16. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL: Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J Clin Microbiol* 2006, 44(10):3665-3673.
17. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL, Jr.: Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998, 25(2):85-98.
18. Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ: Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2008, 79(4):637-646.
19. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS: Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998, 25(5):346-353.
20. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS: Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000, 27(9):648-657.
21. Tanner AC, Paster BJ, Lu SC, Kanasi E, Kent R, Jr., Van Dyke T, Sonis ST: Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. *J Dent Res* 2006, 85(4):318-323.

22. 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.
23. Choi BK, Nattermann H, Grund S, Haider W, Gobel UB: Spirochetes from digital dermatitis lesions in cattle are closely related to treponemes associated with human periodontitis. *Int J Syst Bacteriol* 1997, 47(1):175-181.
24. Edwards AM, Dymock D, Jenkinson HF: From tooth to hoof: treponemes in tissue-destructive diseases. *J Appl Microbiol* 2003, 94(5):767-780.
25. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM *et al.*: The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2009, 37(Database issue):D141-145.
26. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW: GenBank. *Nucleic Acids Res* 2011, 39(Database issue):D32-37.
27. Leinonen R, Akhtar R, Birney E, Bower L, Cerdeno-Tarraga A, Cheng Y, Cleland I, Faruque N, Goodgame N, Gibson R *et al.*: The European Nucleotide Archive. *Nucleic Acids Res* 2011, 39(Database issue):D28-31.
28. 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.
29. Loy A, Maixner F, Wagner M, Horn M: probeBase--an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res* 2007, 35(Database issue):D800-804.
30. Armitage GC: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest Dent* 2000, 79(6):31-35.
31. Wecke J, Kersten T, Madela K, Moter A, Gobel 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.
32. Strub S, van der Ploeg JR, Nuss K, Wyss C, Luginbuhl A, Steiner A: Quantitation of Guggenheimella bovis and treponemes in bovine tissues related to digital dermatitis. *FEMS Microbiol Lett* 2007, 269(1):48-53.
33. Moter A, Hoenig C, Choi BK, Riep B, Gobel UB: Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J Clin Microbiol* 1998, 36(5):1399-1403.
34. 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(6):1919-1925.
35. Cato EP, Moore LVH, Moore WEC: Fusobacterium alocis sp. nov. and Fusobacterium sulci sp. nov. from the human gingival sulcus. *Int J Syst Bacteriol* 1985, 35:475-477.
36. Jalava J, Eerola E: Phylogenetic analysis of Fusobacterium alocis and Fusobacterium sulci based on 16S rRNA gene sequences: proposal of Filifactor alocis (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and Eubacterium sulci (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999, 49 Pt 4:1375-1379.
37. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998, 25(2):134-144.
38. Holt SC, Ebersole JL: Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000* 2005, 38:72-122.
39. de Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG: Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol* 2006, 21(1):61-68.
40. Luppens SB, ten Cate JM: Effect of biofilm model, mode of growth, and strain on streptococcusmutans protein expression as determined by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteome Res* 2005, 4(2):232-237.
41. 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.

Anteilerklärung:

Ich, Sebastian Schlafer hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

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 Mar 1;10:66.

60 Prozent

Ich habe am Studiendesign mitgearbeitet, die Oligonukleotidsonde FIAL entwickelt und optimiert, bei der Aufbereitung der Patientenproben mitgewirkt, die Dot Blot und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungsexperimente durchgeführt, die Analyse der Daten vorgenommen und das Manuskript verfasst.

Publikation 2:

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 Sci. 2010 Oct;118(5):466-74.

20 Prozent

Ich habe bei der Aufbereitung der Patientenproben sowie bei der Durchführung der Dot Blot Experimente, der Analyse und Diskussion der Daten und der Erstellung des Manuskriptes mitgewirkt.

Publikation 3:

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 Apr 1;128(1-2):118-25.

40 Prozent

Ich habe am Studiendesign mitgearbeitet, die Oligonukleotidsonde GUBO entwickelt und optimiert, bei der Aufbereitung der Gewebsproben mitgewirkt, die Dot Blot und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungsexperimente durchgeführt, die Analyse der Daten vorgenommen und das Manuskript entworfen.

Sebastian Schlafer

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 Mar 1;10:66.

doi: 10.1186/1471-2180-10-66

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 Sci. 2010 Oct;118(5):466-74.

doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00765.x

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 Apr 1;128(1-2):118-25.

doi: 10.1016/j.vetmic.2007.09.024

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationsliste

- 06/2011** Dige I, **Schlafer S**, Nyvad, B.
Difference in initial dental biofilm accumulation between night and day.
Act Odontol Scand. 2011; Manuskript akzeptiert und im Druck.
-
- 10/2010** 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 Sci. 2010 Oct;118(5):466-74.
-
- 04/2010** **Schlafer S**, Vaeth M, Hørsted-Bindslev P, Frandsen EV.
Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an *in vitro* and *ex vivo* study.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Apr;109(4):634-41.
-
- 03/2010** **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 Mar 1;10:66.
-
- 04/2008** **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 Apr 1;128(1-2):118-25.
-

Erklärung

Ich, Sebastian Schlafer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Beteiligung ausgewählter putativer Pathogene an Parodontitis und boviner Dermatitis digitalis: Molekulare Epidemiologie und räumliche Verteilung in Biofilmen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 24. Juni 2011

Sebastian Schlafer

DANKSAGUNG

Ich danke meiner Betreuerin, Annette Moter, sowie den Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene und hierbei insbesondere Christian Mallmann und Annett Petrich für Ihre Unterstützung.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für ihren Rat und ihre Hilfe.