

**Aus der
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Klinik der Universität München**

Direktor: Prof. Dr. Reinhard Hickel

**Untersuchung von parodontalen Wildstämmen der Gattung
Prevotella, Fusobacterium und Parvimonas auf
charakteristische Virulenzfaktoren**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jacob Martin Zimmer
aus Starnberg

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Karin C. Huth, MME

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Barbara Stecher-Letsch

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Maximilian Kollmuß

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2023

Inhaltsverzeichnis:

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung..... | 3 |
| 1.1 | Definition und Epidemiologie der Parodontitis | 3 |
| 1.2 | Pathogenese der Parodontitis | 4 |
| 1.3 | Ätiologie der Parodontitis..... | 5 |
| 1.4 | Bakterielle Virulenzfaktoren bei Parodontitis | 6 |
| 1.5 | Virulenzfaktoren der Gattung <i>Prevotella</i> | 7 |
| 1.6 | Neutrophil extracellular traps (NETs) bei Parodontitis | 10 |
| 1.7 | DNase-Aktivität von <i>Prevotella</i> zur Umgehung der NETs..... | 11 |
| 1.8 | Virulenzfaktoren der Gattung <i>Fusobacterium</i> | 12 |
| 1.9 | <i>Fusobacterium</i> Adhäsion A (FadA) | 14 |
| 1.10 | Virulenzfaktoren der Spezies <i>P. micra</i> | 15 |
| 1.11 | Chymotrypsin und Elastase bei Parodontitis | 16 |
| 1.12 | Gegenüberstellung von Laborstämmen und Wildstämmen | 19 |
| 2 | Fragestellung und Studienziel..... | 20 |
| 3 | Material und Methoden | 21 |
| 3.1 | Verwendete Wildstämmen..... | 21 |
| 3.2 | Kultivierung der Wildstämmen | 22 |
| 3.3 | Arbeiten in der anaeroben Kammer | 24 |
| 3.4 | DNase-Aktivität von Wildstämmen der Gattung <i>Prevotella</i> auf DNA-Agarplatten | 25 |
| 3.4.1 | Herstellung der DNA-Agarplatten..... | 25 |
| 3.4.2 | Versuchsdurchführung | 26 |
| 3.4.3 | Visualisieren des DNA-Abbaus | 26 |
| 3.5 | DNase-Aktivität von Wildstämmen der Gattung <i>Prevotella</i> in DNA-Lösung 27 | |
| 3.5.1 | Herstellung der Bakterienproben aus Bakterienzellen und Kulturüberständen | 27 |
| 3.5.2 | Vorbereitung der DNA-Lösung und der positiven Kontrollproben | 28 |
| 3.5.3 | Versuchsdurchführung | 29 |
| 3.5.4 | Visualisieren des DNA-Abbaus mittels Gelelektrophorese | 30 |
| 3.6 | FadA-Gen bei Wildstämmen der Gattung <i>Fusobacterium</i> | 32 |
| 3.6.1 | Isolation bakterieller DNA mittels Magna pure LC..... | 32 |
| 3.6.2 | FadA-spezifische PCR..... | 35 |
| 3.6.3 | Nachweis des FadA-Gens mittels Agarose-Gel-Elektrophorese..... | 37 |
| 3.7 | Chymotrypsin- und Elastaseaktivität von Wildstämmen der Spezies <i>P. micra</i> | 39 |
| 3.7.1 | Herstellung der Bakterienproben aus Bakterienzellen und Kulturüberständen | 39 |
| 3.7.2 | Messung der Chymotrypsinaktivität mittels chromogenem Peptid | 39 |
| 3.7.3 | Messung der Elastaseaktivität mittels chromogenem Peptid | 42 |
| 3.8 | Statistische Auswertung der Ergebnisse | 43 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4 | Ergebnisse | 44 |
| 4.1 | DNase-Aktivität von Wildstämmen der Gattung <i>Prevotella</i> | 44 |
| 4.2 | FadA-Gen bei Wildstämmen der Gattung <i>Fusobacterium</i> | 49 |
| 4.3 | Chymotrypsin- und Elastaseaktivität von Wildstämmen der Spezies <i>P. micra</i> | 49 |
| 4.4 | Gesamtbilanz | 54 |
| 5 | Diskussion | 55 |
| 6 | Zusammenfassung | 66 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 69 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 78 |
| 9 | Tabellenverzeichnis | 80 |
| 10 | Abkürzungsverzeichnis | 80 |
| 11 | Danksagung | 81 |
| 12 | Anhang | 82 |
| 12.1 | Ethikvotum..... | 83 |
| 12.2 | Verwendete Wildstämme..... | 85 |
| 12.3 | Rezepte der Methodiken | 86 |
| 12.4 | Daten der statistischen Auswertung | 90 |
| 13 | Eidesstattliche Versicherung | 101 |

1 Einleitung

Die parodontopathogenen Bakterien der Gattung *Prevotella*, *Fusobacterium* und *Parvimonas* tragen mittels ihrer krankmachenden Eigenschaften, den sog. Virulenzfaktoren, wesentlich zur Entstehung und dem Voranschreiten einer Parodontitis bei (Dahlen *et al.*, 2019; Socransky *et al.*, 1998). Eine dieser Eigenschaften der Gattung *Prevotella* ist ihre Fähigkeit, extrazellulär DNA abzubauen. Hierdurch können sie die DNA-Strukturen eines Abwehrmechanismus der Neutrophilen Granulozyten, namens Neutrophil extracellular Traps (NETs), abbauen und sich dieser Immunreaktion entziehen (Doke *et al.*, 2017). Für Bakterien der Gattung *Fusobacterium* wurde ein neuartiges Adhäsion namens *Fusobacterium* Adhäsion A (FadA) nachgewiesen. FadA scheint für die Keime eine zentrale Rolle bei der Kolonisierung der parodontalen Region zu spielen (Han *et al.*, 2005). Bakterien der Spezies *P. micra* besitzen proteolytische Eigenschaften, nämlich Chymotrypsinaktivität und Elastaseaktivität. Diese Proteasen können Bestandteile des parodontalen Gewebes abbauen (Grenier und Bouclin, 2006), was es den Bakterien ermöglicht die Schutzbarriere des Gingivaepithels zu durchdringen (Chi *et al.*, 2003). Allerdings wurden die drei genannten Virulenzfaktoren teils nur an wenigen Laborstämmen der jeweiligen Gattung getestet und nachgewiesen. Es ist bekannt, dass sich Laborstämme infolge häufiger Subkultivierung an Laborbedingungen adaptieren, so dass Unterschiede in ihrer Virulenz im Vergleich zu Wildstämmen entstehen können (Leiser *et al.*, 2018; Sjodin *et al.*, 2010). Daher ist unklar, in welchem Umfang die genannten Virulenzfaktoren auch bei den entsprechenden Wildstämmen vorhanden sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden in der vorliegenden Studie eine Vielzahl von Wildstämmen der Gattungen *Prevotella* auf ihre DNase-Aktivität, *Fusobacterium* auf FadA und die Spezies *P. micra* auf ihre Chymotrypsin- und Elastaseaktivität untersucht.

1.1 Definition und Epidemiologie der Parodontitis

Parodontitis definiert eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates. Die Entzündung ist mit einem dysbiotischen Biofilm assoziiert und führt zu einem Abbau von parodontalen Fasern und Alveolarknochen. Mit

fortschreitender parodontaler Zerstörung lockern sich die Zähne und gehen letztendlich verloren (Papapanou *et al.*, 2018).

Parodontitis ist eine der häufigsten Erkrankungen der Welt (Kassebaum *et al.*, 2014). Weltweit ist statistisch bei 10% der Jugendlichen zwischen 15 und 19 Jahren eine Parodontitis diagnostizierbar, bei 37 % der Erwachsenen zwischen 35 und 44 Jahren und bei 49% der zwischen 65- und 74-Jährigen (Nazir *et al.*, 2020). Auch in Deutschland ist Parodontitis häufig. Während Parodontitis bei Kindern sehr selten vorkommt, ist bei jedem 10. Jugendlichen im Alter von 15 Jahren eine Parodontitis feststellbar. An einer schwereren Verlaufsform mit Taschensondierungstiefen von 6 mm oder größer leidet nur 1% der Jugendlichen (Micheelis und Schiffner, 2006). Die Prävalenz ist jedoch steigend mit dem Alter (Tonetti *et al.*, 2018). So hat im Schnitt jeder zweite Erwachsene Deutsche im Alter zwischen 35 und 44 eine Parodontitis, jeder Zehnte eine schwerere Verlaufsform mit Taschensondierungstiefen von 6 mm oder größer. Junge Senioren zwischen 65 und 74 Jahren leiden im Schnitt sogar zu 65% an einer Parodontitis, über 20% an einer schwereren Verlaufsform. Bei älteren Senioren verstärkt sich dieser Trend weiter. Männer sind häufiger von der Erkrankung betroffen als Frauen. Die Prävalenz der Parodontitis hat in Deutschland in den letzten Jahren zwar abgenommen, aufgrund der demografischen Entwicklung mit alternder deutscher Bevölkerung rechnet man jedoch für die Zukunft mit einem steigenden Behandlungsbedarf (Jordan und Micheelis, 2016).

1.2 Pathogenese der Parodontitis

Der Parodontitis geht eine Gingivitis voraus, die von dem bakteriellen Biofilm induziert wird. Der Biofilm verursacht eine reversible Entzündung der Gingiva, die auf das gingivale Gewebe beschränkt ist. Bei der Gingivitis kommt es noch zu keinem Abbau von parodontalem Attachment, auch muss sie nicht zwangsläufig in eine Parodontitis übergehen (Murakami *et al.*, 2018). Wenn eine Gingivitis zu einer Parodontitis fortschreitet, geht das mit irreversiblen destruktiven Prozessen des Zahnhalteapparates einher. Dabei werden parodontale Haltefasern apikal der Schmelz-Zement-Grenze zerstört und das Saumepithel wandert nach apikal (Page und Schroeder, 1976). Als Folge entsteht eine parodontale Tasche. Auch der angrenzende Alveolarknochen wird bei der Destruktion abgebaut. Gleichzeitig breitet

sich der bakterielle Biofilm in der parodontalen Tasche auf der Wurzeloberfläche nach apikal aus (Papapanou *et al.*, 2018).

Der destruktive Abbau des Parodontiums ist die Folge eines komplexen Wechselspiels zwischen einem mikrobiellen Angriff und der entzündlichen Wirtsabwehr (Meyle und Chapple, 2015). Der Wirt versucht, den bakteriellen Angriff abzuwehren, indem er seine unspezifische Immunabwehr aus neutrophilen Granulozyten und dem Komplementsystem und seine spezifische Immunabwehr aus B- und T-Lymphozyten sowie Immunglobulinen aktiviert (Hajishengallis und Korostoff, 2017; Yucel-Lindberg und Båge, 2013). Dabei schüttet die Wirtsabwehr eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren aus, die auch körpereigenes Gewebe zerstören. Dazu zählen Zytokine, wie Interleukine und Tumor-Nekrose-Faktoren. Sie werden von Entzündungszellen und von Zellen der parodontalen Gewebe freigesetzt und führen zum Abbau von parodontalem Ligament und Alveolarknochen (Yucel-Lindberg und Båge, 2013). Eine weitere Gruppe proinflammatorischer Mediatoren sind die Matrix-Metalloproteinasen. Auch diese Enzyme werden bei der Entzündung von parodontalen Zellen des Wirtes freigesetzt und tragen zur Gewebszerstörung bei (Sapna *et al.*, 2014). All das zerstört zunehmend die parodontalen Verankerungsfasern und den Alveolarknochen des Zahnhalteapparates. Als Folge lockert sich der erkrankte Zahn und geht letztendlich verloren (Papapanou *et al.*, 2018).

1.3 Ätiologie der Parodontitis

Parodontitis ist eine Erkrankung mit multifaktorieller Genese. Der primäre ätiologische Faktor ist der bakterielle Biofilm (Madianos *et al.*, 2005). Die entzündliche Erkrankung entsteht hierbei aus einer komplexen Interaktion zwischen dem dysbiotischen Biofilm und der Immunabwehr des Körpers (Meyle und Chapple, 2015). Der dentale Biofilm ist eine polymikrobielle Lebensgemeinschaft, bei der Bakterien auf der Zahnoberfläche in einer Matrix aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren organisiert sind (Berezow und Darveau, 2011). Der Begriff Dysbiose bezeichnet eine Veränderung der ursprünglich benefiziellen mikrobiellen Gemeinschaft, die zur Erkrankung des Wirts führt. Die Dysbiose ist gekennzeichnet durch eine Abnahme benefizieller Spezies und eine Zunahme pathogener Spezies (Kumar, 2021). Entsprechend ist bei Parodontitis der Anteil parodontalpathogener

Bakterien im dysbiotischen Biofilm erhöht (Berezow und Darveau, 2011). Die bekanntesten und am besten charakterisierten parodontalpathogenen Spezies sind *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* und *Parvimonas micra* (Socransky *et al.*, 1998). Diese vorwiegend gramnegativen Arten besitzen eine Vielzahl von Virulenzfaktoren. Diese werden in den folgenden Kapiteln charakterisiert.

Neben dem Biofilm als primärer ätiologischer Faktor sind weitere Faktoren für die Entstehung einer Parodontitis von Bedeutung. So kann eine genetische Disposition den Entzündungsprozess des Wirtes beeinflussen und seine Anfälligkeit für Parodontitis erhöhen. Die genetische Disposition zeigt sich als familiäre Häufung der Erkrankung (Michalowicz *et al.*, 2000). Auch Rauchen stellt einen Risikofaktor für Parodontitis dar. Toxine im Zigarettenrauch verringern die Mikrozirkulation im parodontalen Gewebe, schädigen die Funktion der Neutrophilen Granulozyten und steigern die Produktion proinflammatorischer Mediatoren. All das fördert die Entstehung einer Parodontitis (Genco und Borgnakke, 2013). Ein weiterer Risikofaktor ist Diabetes mellitus. Bei schlecht eingestelltem Diabetes ist die Konzentration proinflammatorischer Mediatoren in den parodontalen Geweben erhöht (Emrich *et al.*, 1991; Genco und Borgnakke, 2013). Weitere Risikofaktoren sind Osteoporose, Fettleibigkeit und psychischer Stress (Genco und Borgnakke, 2013).

1.4 Bakterielle Virulenzfaktoren bei Parodontitis

Virulenzfaktoren definieren die molekularen Eigenschaften krankmachender Mikroorganismen, die für die Kolonisierung und Infektion des Wirts verantwortlich sind (Lantz, 1997). Diese Faktoren ermöglichen es den pathogenen Keimen, die parodontale Region zu besiedeln, Entzündungen zu initiieren und weiter voranzutreiben. Damit tragen sie zum Abbau des Zahnhalteapparates bei Parodontitis bei (Malik *et al.*, 2015).

Als Virulenzfaktoren wirken Zellwandbestandteile der gramnegativen Bakterien. Sie lösen Entzündungen aus und befähigen die Keime, in Wirtszellen einzudringen. So können sie über Fimbrien an Zellen der Gingiva binden und in die Zellen einzudringen. Fimbrien bezeichnen Zellanhänge auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien (Lamont *et al.*, 1995). Ein weiterer Bestandteil der äußeren Zellmembran

gramnegativer Bakterien sind Lipopolysaccharide (LPS), organische Verbindungen aus Fett- und Zuckermolekülen. LPS binden an Rezeptoren der Gingivazellen und regen die Zellen zur Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) an (Dahlen *et al.*, 2019). Als weitere Virulenzfaktoren besitzen zahlreiche parodontalpathogene Spezies Proteasen. Diese Enzyme liegen entweder zellgebunden vor oder werden in sekretorischen Vesikeln in die Umgebung abgegeben (Potempa *et al.*, 1995). Proteasen dienen einerseits der Nährstoffbeschaffung (Potempa *et al.*, 2000). Andererseits befähigen sie die Bakterien, proinflammatorische Mediatoren des Wirts zu spalten und so die Wirtsabwehr zu unterlaufen (Sundqvist *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 1999). Außerdem können bakterielle Proteasen Bestandteile des parodontalen Gewebes abbauen, was es den Keimen ermöglicht weiter ins Gewebe einzudringen (Fenno *et al.*, 1998; Grenier *et al.*, 1990). Ein weiterer Virulenzfaktor parodontopathogener Bakterien sind Exotoxine. Sie werden von den Bakterien sezerniert (Kato *et al.*, 2002) und wirken zytotoxisch auf Immunzellen des Wirts (Vega *et al.*, 2019). Sie können die Immunzellen durch osmotische Lyse zerstören oder Apoptose induzieren (Lally *et al.*, 1999). In den folgenden Kapiteln werden die Virulenzfaktoren der Gattungen *Prevotella*, *Fusobacterium* und der Spezies *P. micra* genau beschrieben.

1.5 Virulenzfaktoren der Gattung *Prevotella*

Die Bakterien der Gattung *Prevotella* sind gramnegative, schwarz-pigmentierte Stäbchen (Ruan *et al.*, 2015). Sie leben obligat anaerob und sind Teil der Flora der Mundhöhle, der oberen Atemwege, des Gastrointestinaltraktes (Iljazovic *et al.*, 2021) und des Urogenitaltraktes (Eiring *et al.*, 1998). Den Bakterien der Gattung *Prevotella* wird eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Parodontitis zugeschrieben. *P. intermedia*, *P. nigrescens* und *P. melaninongenic*a wirken parodontalpathogen und zahlreiche Studien haben die drei Spezies in erhöhten Zahlen in der subgingivalen Flora von Parodontitispatienten nachgewiesen (Papapanou *et al.*, 1997; Socransky und Haffajee, 2005; Uzel *et al.*, 2011). Auch die Spezies *P. denticola* (Kumar *et al.*, 2003), *P. disiens* und *P. corporis* werden mit Parodontitis in Verbindung gebracht (Salari und Kadkhoda, 2004). Der Großteil wissenschaftlicher *Prevotella*-Studien fokussiert auf die Spezies *P. intermedia* und *P. nigrescens*, denen eine bedeutsame Rolle bei Parodontitis zugeschrieben wird. In einer Studie analysierten Socransky und Kollegen 13.261 subgingivale Plaqueproben und fanden in tiefen Zahnfleischtaschen

vermehrt *P. intermedia* und *P. nigrescens*. Socransky und Mitarbeiter ordneten beide dem sog. orangen Bakterienkomplex zu (Socransky *et al.*, 1998). In der Folge wurden zahlreiche Virulenzfaktoren von *P. intermedia* und *P. nigrescens* untersucht.

P. intermedia kann in orale Epithelzellen seines Wirtes eindringen, was einen wichtigen Schritt bei der Initiierung der parodontalen Entzündung darstellt (Ji *et al.*, 2015). Eine in-vitro Studie, die das Eindringen von *P. intermedia* in orale Epithelzellen untersuchte, stellte fest, dass für die Invasion Fimbrien vom Typ C notwendig waren. Außerdem veränderte das Zytoskelett der Epithelzellen bei der Invasion seine Struktur (Dorn *et al.*, 1998). In einer anderen Studie, bei der *P. intermedia* zunächst in die Mundhöhle von Ratten eingebracht worden war, konnte der Keim anschließend im parodontalen Gewebe der Ratten nachgewiesen werden (Allenspach-Petrzilka und Guggenheim, 1982). Auch die parodontopathogene Bakterienspezies *P. gingivalis* hat die Fähigkeit, in Gingivaepithelzellen einzudringen. Dazu docken seine Fimbrien am Rezeptor β 1-Integrin an der Zelloberfläche an (Yilmaz *et al.*, 2002). Das Andocken löst eine Signalkaskade aus, bei der sich das Zytoskelett der Epithelzelle verändert, so dass *P. gingivalis* in die Zelle gelangt (Yilmaz *et al.*, 2003). In der Zelle repliziert sich das Bakterium und kann sich dann weiter im Gewebe ausbreiten (Madianos *et al.*, 1996; Yilmaz *et al.*, 2006). Die bakterielle Invasion des parodontalen Gewebes gilt als wichtiger Schritt bei der Initiation von Parodontitis. Man nimmt an, dass die lokal ansässigen Keime den chronischen Entzündungsprozess im Wirtsgewebe fördern (Ji *et al.*, 2015).

P. intermedia induziert nachweislich entzündliche Reaktionen im parodontalen Gewebe. In-vitro-Studien zeigten, dass Oberflächenbestandteile von *P. intermedia* Gingivafibroblasten (Tamura *et al.*, 1992), gingivale Epithelzellen (Sugiyama *et al.*, 2002) und parodontalen Ligamentzellen zur Sekretion von IL-8 anregen (Yamamoto *et al.*, 2006). Das Zytokin Interleukin-8 (IL-8) ist ein Entzündungsmediator, der neutrophile Granulozyten chemotaktisch anlockt und ihre Degranulierung anregt. Daraufhin setzen die Neutrophilen ihre entzündlichen Granula ins parodontale Gewebe frei (Tamura *et al.*, 1992). Außerdem lockt IL-8 mittels Chemotaxis weitere Entzündungszellen an (Hammond *et al.*, 1995). Ebenso wurde die Expression weiterer proinflammatorischer Entzündungsmediatoren, wie Interleukin-1 β , Interleukin-6, und Tumornekrosefaktor- α in parodontalen Ligamentzellen in vitro nachgewiesen (Yamamoto *et al.*, 2006).

Des Weiteren wird *P. intermedia* ein Beitrag bei der Zerstörung von körpereigenem Gewebe durch Matrix-Metalloproteinasen zugesprochen. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass LPS von *P. intermedia* Osteoblasten dazu anregt, IL-6 und Vorstufen der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 auszuschütten (Pelt *et al.*, 2002). Der Entzündungsmediator Interleukin-6 (IL-6) regt Osteoklasten zum Knochenabbau an und stimuliert Osteoblasten zur Bildung von Matrix-Metalloproteinasen (Kusano *et al.*, 1998). Die Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 stimulieren ebenfalls die Knochenresorption (Pelt *et al.*, 2002). Auch in parodontalen Ligamentzellen induzierte *P. intermedia* in vitro die Expression von MMP-9 (Guan *et al.*, 2008) und erhöhte die Expression von MMP-1 und MMP-8 (Guan *et al.*, 2009). Matrix-Metalloproteinasen sind Enzyme, die Bestandteile des parodontalen Gewebes abbauen können. Ihre Produktion durch den Wirt wird bei Parodontitis mit der Zerstörung des Halteapparats in Verbindung gebracht (Sorsa *et al.*, 2006).

Neben der Förderung der parodontalen Entzündungsreaktion besitzen *Prevotella*-Bakterien außerdem die Fähigkeit, sich bei Parodontitis der Abwehrreaktion des Wirts zu entziehen. So produzieren *P. intermedia*, *P. denticola* und *P. melaninogenica* extrazelluläre DNasen und können damit die Strukturen von Neutrophil extracellular traps (NETs) abbauen. NETs ist ein Abwehrmechanismus der neutrophilen Granulozyten (Doke *et al.*, 2017). Das folgende Kapitel befasst sich explizit mit diesem Thema. Außerdem bilden *P. intermedia*, *P. nigrescens* und *P. melaninogenica* Proteasen, die Immunglobuline abbauen können. Studien wiesen in vitro den Abbau des Immunglobulins IgG durch diese drei Spezies nach (Jansen *et al.*, 1995; Kilian, 1981). Man nimmt an, dass sich die Keime damit bei Parodontitis der Wirtsabwehr mittels IgG entziehen können. IgG ist Teil der spezifischen Immunabwehr bei Parodontitis (Kulshrestha *et al.*, 2013). Dabei heften sich die Antikörper an Bakterien, die anschließend phagozytiert und abgetötet werden können (Ebersole und Taubman, 1994). Die Proteasen von *P. intermedia* und *P. nigrescens* können außerdem Proteine des Parodontiums wie Kollagen und Fibronectin abbauen. Allerdings ist deren Proteaseaktivität im Vergleich zu parodontopathogenen Spezies anderer Gattungen schwach (Eley und Cox, 2003). Auch bei weiteren Spezies der Gattung *Prevotella* konnte Proteaseaktivität nachgewiesen werden. So zeigten Stämme von *P. melaninogenica*, und *P. denticola* in vitro proteolytische Aktivität. Allerdings war diese noch geringer als die von *P. intermedia* und *P. nigrescens* (Yanagisawa *et al.*, 2006).

1.6 Neutrophil extracellular traps (NETs) bei Parodontitis

Im Jahr 2004 wurde ein bis dato unbekannter Abwehrmechanismus der neutrophilen Granulozyten entdeckt, der auch bei der Pathogenese von Parodontitis eine Rolle spielt. So wurde gezeigt, dass Neutrophile bei Entzündungsreaktionen neben Phagozytose und Sekretion antimikrobieller Peptide einen weiteren Mechanismus besitzen, um Bakterien abzutöten. Dieser Mechanismus ist das Freisetzen von Neutrophil extracellular traps (NETs). NETs sind netzartige Strukturen aus dekondensiertem Chromatin und antimikrobiellen Komponenten, die bei Freisetzung durch die Neutrophilen Granulozyten Bakterien binden und abtöten können (White *et al.*, 2016). Diese NETs wurden 2004 bei Patienten mit Appendizitis, einer entzündlichen Darmerkrankung, erstmalig beschrieben (Brinkmann *et al.*, 2004). In den folgenden Jahren wurden NETs auch in der Mundhöhle bei Parodontitispatienten nachgewiesen und eine Verbindung zur Parodontitis hergestellt. So wurden NETs in großen Mengen in parodontalen Taschen nachgewiesen (Vitkov *et al.*, 2009). Andere Studien bestätigten, dass NETs bei Parodontitis vermehrt freigesetzt werden (Fine *et al.*, 2016; Kaneko *et al.*, 2018).

Neutrophile Granulozyten können durch Bakterien oder körpereigene Entzündungsmediatoren zur NET-Bildung angeregt werden. Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien wie LPS triggern dabei die Bildung von NETs (Clark *et al.*, 2007). Auch Komponenten grampositiver Bakterien können die NET-Bildung induzieren (White *et al.*, 2016). Außerdem sind auch proinflammatorische Komponenten des Wirts, wie die Zytokine IL-1 β , IL-8 und TNF- α in der Lage, neutrophile Granulozyten zur Bildung von NETs anzuregen (Keshari *et al.*, 2012).

Bei der NET-Bildung werden die Neutrophilen zunächst über Oberflächenrezeptoren stimuliert. Nachfolgend dekondensiert ihr nukleäres Chromatin und verbindet sich mit antimikrobiellen Komponenten von Granulaproteinen des Zytosols. Die entstehenden Komplexe, die NETs, werden nach Ruptur der Zellmembran des Granulozyten extrazellulär freigesetzt. Der neutrophile Granulozyt geht dabei zugrunde (White *et al.*, 2016). Auch ein Mechanismus von NET-Sekretion in Vesikeln wurde beschrieben, bei dem die Neutrophilen überleben (Pilszczek *et al.*, 2010).

Die NETs wirken antimikrobiell, indem sie die Bakterien immobilisieren und lysieren. Das Binden der Bakterien verhindert deren Eindringen in angrenzende Gewebe

(Brinkmann *et al.*, 2004). Als Bindungsmechanismus vermutet man elektrostatische Anziehung zwischen den kationischen Komponenten der NETs und der anionischen Bakterienoberfläche (Brinkmann und Zychlinsky, 2007). Mit Hilfe ihrer antimikrobiellen Komponenten, den Histonen und Myeloperoxidasen können die NETs Bakterien abtöten (Magan-Fernandez *et al.*, 2020). Myeloperoxidase ist ein Enzym aus der Gruppe der Peroxidasen. Sie reagiert zu hypochloriger Säure (HOCl) und tötet dabei Bakterien durch Oxidation ab (Parker *et al.*, 2012). Außerdem können proteolytische Proteine der NETs Virulenzfaktoren der Bakterien wie Adhesine und Toxine spalten (Brinkmann *et al.*, 2004).

1.7 DNase-Aktivität von *Prevotella* zur Umgehung der NETs

Bakterien sind jedoch in der Lage, sich diesem Abwehrmechanismus zu entziehen, indem sie Desoxyribonukleasen (DNasen) produzieren und damit die DNA-Strukturen der NETs abbauen. Die DNasen spalten die Desoxyribonukleinsäure-Stränge (DNA) durch Hydrolyse in kurze Bestandteile, sog. Oligonukleotide (Palmer *et al.*, 2012). In-vivo-Studien zeigten, dass der Abbau von NETs durch bakterielle DNasen die Bakterien bei schweren entzündlichen Erkrankungen wie Sepsis, Pneumonie und nekrotisierender Faszitis pathogener machte. So wurde in einer Studie bei Mäusen eine bakterielle Sepsis induziert und einer von zwei Mäusegruppen wurden intraperitoneal DNasen injiziert. Die Gruppe mit den DNasen zeigte anschließend eine geringere Zahl an NETs, eine schnellere Progression der Sepsis, eine höhere Mortalität und eine stärkere bakterielle Ausbreitung in die Gewebe (Meng *et al.*, 2012). Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss bakterieller DNasen bei Pneumonie. Dabei wurden Mäuse mit einem von zwei Bakterienstämmen von *S. aureus* infiziert, von denen ein Stamm DNasen produzierte, der andere nicht. Die Mäuse mit dem DNase-produzierenden Wildstamm zeigten eine verstärkte bakterielle Infektion der Lungen und eine erhöhte Mortalität (Berends *et al.*, 2010). In einer weiteren Studie an Mäusen mit nekrotisierender Faszitis zeigten die infizierenden Streptokokken höhere Pathogenität, die DNase bildeten (Buchanan *et al.*, 2006).

Auch bei parodontal pathogenen Bakterien wurde die Produktion von DNasen nachgewiesen, die NETs abbauen können. So waren Laborstämme von *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *A. actinomycetemcomitans* DNase-positiv. Auch Laborstämme der Gattung *Prevotella* besaßen in der Studie DNase-Aktivität. Dies waren die Stämme *P.*

intermedia ATC 25611, *P. melaninogenica* ATCC 25845 und *P. denticola* ATCC 35308 (Palmer *et al.*, 2012). Eine weitere *in vitro* Studie bestätigte die Fähigkeit parodontalpathogener Keime zur extrazellulären DNase-Produktion und ihre Fähigkeit, die Strukturen der NETs abzubauen. Unter den getesteten Spezies *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* und *A. actinomycetemcomitans* zeigte der Laborstamm *P. intermedia* ATC 25611 die mit Abstand größte DNase-Aktivität (Doke *et al.*, 2017). Man nimmt an, dass sich Parodontitisekime durch den Abbau der NETs der Abwehr neutrophiler Granulozyten entziehen können. Dies würde die Ausbreitung der Keime erleichtern und die parodontale Entzündung fördern (Doke *et al.*, 2017; Palmer *et al.*, 2012).

Kritisch zu bewerten ist jedoch, dass in diesen Studien lediglich drei *Prevotella*-Laborstämme untersucht wurden und auch dass die DNase-positiven *Prevotella*-Stämme bereits vor langer Zeit isoliert worden waren. So wurden *P. intermedia* ATCC 25611 vor 1983 (Johnson und Holdeman, 1983), *P. melaninogenica* ATCC 25845 vor 1979 (Listgarten und Lai, 1979) und *P. denticola* ATCC 35308 vor 1981 isoliert (Shah und Collins, 1981). Das ist bedeutsam, da sich Bakterien an die Laborbedingungen anpassen und sich bei langjähriger Subkultivierung deren Genotyp und Phenotyp verändern können (Saxer *et al.*, 2014). Um diesen Kontext zu erhellen, untersuchte die hier vorgelegte Arbeit zahlreiche parodontale Wildstämme der Gattung *Prevotella* auf ihre Fähigkeit, extrazellulär DNase abzubauen.

1.8 Virulenzfaktoren der Gattung *Fusobacterium*

Die Bakterien der Gattung *Fusobacterium* sind gramnegative Stäbchenbakterien. Sie leben obligat anaerob und besiedeln die Mundhöhle, die Atemwege, den Gastrointestinaltrakt und den weiblichen Urogenitaltrakt (Fujiwara *et al.*, 2020). Die Spezies *F. nucleatum* unterteilt sich in vier Subspezies, nämlich *F. nucleatum ssp. animalis*, *F. nucleatum ssp. nucleatum*, *F. nucleatum ssp. polymorphum* und *F. nucleatum ssp. vincentii* (Gharbia und Shah, 1992; Kook *et al.*, 2013). *F. nucleatum* ist die häufigste gramnegative Spezies im gingivalen Sulkus (Moore und Moore, 1994). Bei Parodontitis steigt ihre Zahl in der parodontalen Tasche stark an. Die Spezies *F. nucleatum ssp. nucleatum*, *F. nucleatum ssp. polymorphum*, *F. nucleatum ssp. vincentii* und *F. periodonticum* findet man in der subgingivalen Flora von Parodontitispatienten in sehr viel höherer Anzahl als bei parodontal Gesunden

(Socransky und Haffajee, 2005). *F. nucleatum* gilt als parodontalpathogener Keim (Socransky *et al.*, 1998) und besitzt bekanntermaßen zahlreiche Virulenzfaktoren.

Der bedeutendste Virulenzfaktor von *F. nucleatum* ist seine Adhäsion an Wirtszellen und an andere Bakterienzellen (Fujiwara *et al.*, 2020). *F. nucleatum* gilt als adhäsive Spezies. Wegen seiner Fähigkeit, sich an parodontale Wirtszellen und an andere Bakterien zu binden, spielt *F. nucleatum* eine wichtige Rolle bei der Bildung des bakteriellen Biofilms (Han *et al.*, 2005). *F. nucleatum* besitzt ein Oberflächenprotein namens Fusobacterium Adhäsion A (FadA), das essenziell für die Adhäsion an orale Epithelzellen ist (Han *et al.*, 2005). Im folgenden Kapitel wird explizit auf FadA eingegangen. Außerdem besitzt *F. nucleatum* weitere Adhesine für die Bindung an Bakterienzellen. Damit kann *F. nucleatum* sowohl an grampositive als auch an gramnegative Bakterien binden (Kolenbrander *et al.*, 1989). Aufgrund dessen fungiert *F. nucleatum* als Brückenkeim zwischen grampositiven Frühkolonisierern wie *S. sanguis* oder *A. naeslundii* und gramnegativen Spätkolonisierern wie *P. gingivalis* und *T. forsythia*. Daher spielt *F. nucleatum* eine sehr wichtige Rolle bei der Integration der genannten parodontalpathogenen Keime in den parodontalen Biofilm (Amano, 2010; Kolenbrander *et al.*, 2002).

Außerdem initiiert *F. nucleatum* Entzündungen. So stimulierte *F. nucleatum* in vitro bei Kontakt mit Gingivaepithelzellen die Produktion des Entzündungsmediators IL-8 (Darveau *et al.*, 1998). Auch bildeten Epithelzellen in vitro bei Kontakt mit *F. nucleatum* Matrix-Metalloproteasen (Gursoy *et al.*, 2008). Eine weitere Studie zeigte die Adhäsion und Invasion von *F. nucleatum* in orale Epithelzellen. Dabei induzierte der Bakterienstamm die Zellen zur Produktion von IL-8 (Han *et al.*, 2000). Eine weitere Studie zeigt, dass *F. nucleatum* Gingivaepithelzellen bei deren Invasion zur Expression von β -Defensin-2 anregt (Ji *et al.*, 2009). Das antimikrobielle Peptid β -Defensin-2 lockt mittels Chemotaxis weitere Entzündungszellen an und fördert so die Entzündungsreaktion im Wirt (Niyonsaba *et al.*, 2004). Diese Erkenntnisse belegen, dass *F. nucleatum* durch Bindung und Invasion der Wirtszellen Entzündungsreaktionen auslöst.

Außerdem wirkt *F. nucleatum* immunsuppressiv. *F. nucleatum* kann über seine Oberflächenproteine bei Lymphozyten und Granulozyten in vitro Apoptose induzieren (Jewett *et al.*, 2000). Außerdem unterdrückt *F. nucleatum* die Proliferation humaner

Lymphozyten (Shenker und DiRienzo, 1984). Die dadurch geschwächte Abwehrreaktion des Wirts könnte die Kolonisierung weiterer Pathogene erleichtern und so zur Entstehung und zum Fortschreiten von Parodontitis beitragen (Jewett *et al.*, 2000).

Bei *F. nucleatum* wurde auch Proteaseaktivität nachgewiesen (Signat *et al.*, 2011). Allerdings scheint seine Fähigkeit, Strukturen des Parodontiums abzubauen, begrenzt zu sein (Eley und Cox, 2003).

1.9 Fusobacterium Adhäsion A (FadA)

Im Jahr 2005 wurde bei oralen *Fusobacteria* ein bis dato unbekanntes Adhäsion identifiziert, das Fusobacterium Adhäsion A (FadA). Dieses Oberflächenprotein war für die Bindung der Keime an orale Epithelzellen überaus wichtig. Es wurde *in vitro* nachgewiesen, dass FadA an Oberflächenrezeptoren von oralen mukosalen Epithelzellen bindet. *Fusobacterium*-Stämme ohne FadA hatten eine um 80% reduzierte Bindungsfähigkeit an die Zellen im Vergleich zu *Fusobacterium*-Stämmen mit FadA. FadA scheint somit eine zentrale Rolle bei der Kolonisierung des Wirts zuzukommen (Han *et al.*, 2005). Die Adhäsion an Epithelzellen ist bei der Parodontitis wichtig für die Kolonisierung des Wirts (Han *et al.*, 2000). Es ist der erste Schritt von parodontogenen Bakterien bei der Kolonisierung und der nachfolgenden Invasion der Wirtszellen (Liu *et al.*, 2014). Erstes Ziel der akkumulierenden Bakterien ist dabei das orale Sulkusepithel und das Saumepithel (Gursoy *et al.*, 2008).

FadA besteht aus zwei Komponenten, einer nicht-sezernierenden Form pre-FadA und einer sezernierenden Form m-FadA. Für die Adhäsion an Epithelzellen scheint eine Mischung beider Formen benötigt zu werden. Dieser Komplex aus pre-FadA und m-FadA wird FadAc genannt (Xu *et al.*, 2007). Weitere Studien unterstützen die Rolle dieses Adhäsions bei Parodontitis. So untersuchte eine klinische Studie subgingivale Plaqueproben von 30 parodontal Gesunden, 49 Gingivitispatienten und 35 Parodontitispatienten auf das Vorkommen von FadA und *F. nucleatum*. Es wurde in den Proben der Parodontitispatienten vermehrt *F. nucleatum* und auch das Gen für FadA-Gen nachgewiesen (Liu *et al.*, 2014). Des Weiteren wurde in einer Laborstudie bei Mäusen wiederholt *F. nucleatum* oral appliziert. Das führte zu signifikantem parodontalem Knochenabbau. Bei einer Kontrollgruppe, der ein *F. nucleatum*-Stamm

ohne FadA appliziert wurde, baute sich dagegen der Alveolarknochen nicht ab (Meng *et al.*, 2021).

FadA scheint somit eine bedeutsame Rolle bei der Pathogenese der Parodontitis zu haben. In der Studie von Han *et al.* aus dem Jahr 2005, in der FadA erstmals nachgewiesen wurde, besaßen 16 von 20 getesteten Stämme der Gattung *Fusobacterium* das Gen von FadA. Davon waren alle 12 verwendeten Stämme der Spezies *F. nucleatum* FadA-positiv. Allerdings handelte es sich hier bei 7 der 12 *F. nucleatum*-Stämme um Laborstämme (Han *et al.*, 2005). Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden in der vorgelegten Arbeit weitere 31 parodontale Wildstämme der Gattung *Fusobacterium* auf das Vorhandensein des FadA-Gens getestet.

1.10 Virulenzfaktoren der Spezies *P. micra*

P. micra ist eine grampositive anaerobe Kokke. Man unterscheidet zwei Morphotypen, den rauen und den glatten Typ. Der raue Morphotyp hat fibrilläre Strukturen auf seiner Zellwand, der glatte Morphotyp hingegen nicht (van Dalen *et al.*, 1993). *P. micra* ist Teil der Flora von Mundhöhle, Gastrointestinaltrakt und Urogenitaltrakt (Durovic *et al.*, 2020). Bei Gesunden findet man *P. micra* in der Mundhöhle selten (Socransky und Haffajee, 2005; van Dalen *et al.*, 1998). Bei parodontal Erkrankten hingegen nimmt *P. micra* in der parodontalen Region stark zu. *P. micra* besitzt zahlreiche Virulenzfaktoren und gilt als parodontalpathogener Keim (Socransky und Haffajee, 2005).

P. micra ist in der Lage, an Gingivaepithelzellen zu binden, was für seine parodontale Pathogenität von großer Bedeutung ist. Man nimmt an, dass Bestandteile seiner grampositiven Zellwand beim Andocken beteiligt sind (Dzink *et al.*, 1989; Kremer *et al.*, 1999). Zellwandbestandteile von *P. micra* lösen eine Entzündungsreaktion des Wirts aus. So regen Teile der grampositiven Zellwand aus Peptidoglykan und Teichonsäure Makrophagen dazu an, die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und RANTES zu sezernieren (Tanabe *et al.*, 2007). Makrophagen sind Schlüsselemente des körpereigenen Immunsystems und sie spielen bei chronischen Entzündungen wie Parodontitis eine wichtige Rolle (Schenkein, 2006). Bei parodontalen Erkrankungen findet man sie in großer Zahl an infizierten Stellen (Zappa *et al.*, 1991). Die Zytokine TNF- α und IL-1 β können die Expression weiterer Mediatoren induzieren und so die Entzündungsreaktion verstärken. Sie kommen in

parodontal erkranktem Gewebe verstärkt vor (Stashenko et al., 1991) und spielen eine wichtige Rolle bei der Progression der Parodontitis (Graves und Cochran, 2003). Das Zytokin IL-6 steht mit dem Abbau von parodontalem Knochen in Verbindung, es regt die Bildung von Osteoklasten an und fördert die Knochenresorption (Ishimi *et al.*, 1990; Kurihara *et al.*, 1990). Die Zytokine IL-8 und RANTES wirken chemotaktisch. Sie stimulieren die Migration diverser Entzündungszellen, wie neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Monozyten und T-Zellen zum Infektionsort (Luster, 1998). Beide Stoffe werden als wichtige Faktoren bei der Initiierung und Progression der Parodontitis betrachtet. Bei Parodontitispatienten wurden hohe Konzentrationen von RANTES in der Sulkusflüssigkeit (Gamonal *et al.*, 2000) und im entzündeten Gingivagewebe nachgewiesen (Johnson *et al.*, 2004). Auch IL-8 wurde in erhöhter Menge in der parodontalen Region gefunden (Tsai et al., 1995). Die Stimulation proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen des Wirtes führt damit zur Zerstörung des eigenen parodontalen Gewebes. Man nimmt an, dass *P. micra* auf diese Weise an der Entstehung der Parodontitis mitwirkt (Tanabe *et al.*, 2007).

Bei *P. micra* wurde eine Vielzahl proteolytischer Aktivitäten nachgewiesen, die einen wichtigen Virulenzfaktor darstellen (Grenier und Bouclin, 2006; Murphy und Frick, 2013). Im folgenden Kapitel wird explizit auf die Chymotrypsin- und Elastaseaktivität von *P. micra* eingegangen.

1.11 Chymotrypsin und Elastase bei Parodontitis

Proteasen sind Enzyme, die durch Hydrolyse Peptidbindungen von Proteinen und Peptiden spalten (Grenier und Bouclin, 2006). Sie wurden bei einer Vielzahl von parodontalen Keimen nachgewiesen und sind ein wichtiger Virulenzfaktor (Eley und Cox, 2003). Proteasen spielen eine wichtige Rolle für die bakterielle Nahrungsbeschaffung (Potempa *et al.*, 2000). Die Bakterien des subgingivalen Biofilms beziehen ihre Energie durch Fermentation von Aminosäuren. Da die Bakterien jedoch nur freie Aminosäuren und Peptide aufnehmen können, müssen sie extrazelluläre Proteine zuerst mit Hilfe von Proteasen in Polypeptide und Peptide spalten (Wei *et al.*, 1999). Außerdem nutzen die Bakterien Proteasen, um die Wirtsabwehr zu umgehen. Bakterielle Proteasen spalten Immunglobuline und Komplementproteine des Wirtes. Eine weitere Eigenschaft der bakteriellen Proteasen

ist ihre Fähigkeit, Strukturen des parodontalen Gewebes abzubauen. Dies ermöglicht den Keimen, in tiefere Gewebsschichten einzudringen (Eley und Cox, 2003).

Bei dem eigentlichen Gewebsabbau der Parodontitis, dem Abbau der kollagenen Fasern des parodontalen Ligaments, spielen die bakteriellen Proteasen jedoch eine untergeordnete Rolle. Es sind die bei der Entzündungsreaktion exprimierten wirtseigenen Enzyme, die zum größten Teil für die parodontale Zerstörung verantwortlich gemacht werden (Potempa *et al.*, 2000; Sorsa *et al.*, 1992). Um in tiefere Gewebsschichten eindringen zu können, müssen Bakterien zunächst die Gewebsbarrieren des Epithels und der darunterliegenden Basalmembran durchdringen (Alfano *et al.*, 1977). Basalmembranen sind allgegenwärtige Strukturen, die verschiedene Zelltypen voneinander trennen. Typischerweise trennt die Basalmembran das Epithel oder Endothel vom darunterliegenden Bindegewebe. Die Kollagenbestandteile der Basalmembran bestehen hauptsächlich aus Kollagen Typ IV (Uitto *et al.*, 1980). Hauptfunktionen der Basalmembran im Parodontium sind, die Gewebsarchitektur zu erhalten, die Epithelzellen zu stützen und eine Barriere für Zellen und Partikel zwischen den Gewebekompartimenten zu bilden (Grenier *et al.*, 1990). Im Folgendem werden zwei bakterielle Proteasen, Chymotrypsin und Elastase und ihr Beitrag bei der Parodontitis beschrieben.

Die erste ist eine chymotrypsinartige Protease von *T. denticola*. *T. denticola* ist eine parodontalpathogene Bakterienspezies aus der Klasse der Spirochäten, die bei Parodontitis ins parodontale Bindegewebe eindringt (Saglie *et al.*, 1982). Diese chymotrypsinartige Protease ermöglicht es dem Keim, Strukturen des Parodontiums zu spalten und in parodontales Gewebe einzudringen (Uitto *et al.*, 1988). Chymotrypsin ist ein Enzym aus der Gruppe der Serinproteasen (Blow, 1976). Es spaltet selektiv die Peptidbindungen von Proteinen und Peptiden an Aminogruppen wie Tyrosin, Trypsophan und Phenylalanin (Appel, 1986). Die chymotrypsinartige Protease von *T. denticola* wird auf dessen Oberfläche exprimiert und kann epitheliale parodontale Ligamentzellen lysieren (Fenno *et al.*, 1998). Es wurde außerdem gezeigt, dass sie die Epithelzellschichten durch Spalten der Verbundproteine, sog. Tight Junctions, durchdringen kann (Chi *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte *T. denticola* eine rekonstituierte Basalmembran aus Matrigel durchdringen und dessen Komponenten abbauen. Das Matrigel diente als Methodik, um die Invasionsfähigkeit des Keims durch parodontale Basalmembranen zu evaluieren. (Grenier *et al.*, 1990).

Matrigel ist ein Matrixmaterial, das aus murinen Sarkomzellen gewonnen wird und der zellulären Matrix der Basalmembran von Säugetieren ähnelt. Hauptbestandteile von Matrigel sind Laminin und Typ IV-Kollagen (Kleinman *et al.*, 1986). Zudem konnte in einer weiteren Studie die chymotrypsinartige Protease von *T. denticola* bei Gewebeproben von Parodontitispatienten im Gingivaepithel nachgewiesen werden (Marttila *et al.*, 2014).

Die zweite Protease, die hier beschrieben wird, ist die Elastase. Elastase ist wie Chymotrypsin eine Serinprotease (Shibata *et al.*, 1993). Sie kann ebenfalls das Kollagen Typ IV der Basalmembran abbauen (Mainardi *et al.*, 1980). Eine Studie identifizierte eine zellgebundene bakterielle Elastase, die in vitro Elastin abbauen konnte (Shibata *et al.*, 1993). Das Elastin ist nach dem Kollagen der zweite Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix der Gingiva. Elastin ist ein fibrilläres Glykoprotein und verleiht der Gingiva ihre elastische Eigenschaft (Chavrier, 1990). Eine weitere Studie zeigte, dass Elastase Bestandteile des Gingivagewebes abbauen konnte. Die in der Studie verwendete Elastase stammte jedoch von humanen Neutrophilen Granulozyten und war nicht bakteriellen Ursprungs. Unter dem Elektronenmikroskop betrachtet, vergrößerte die Elastase die Interzellularräume von oralem Gingivaepithel, unterbrach die Basalmembran und führte zu einem Verlust von Kollagen und dem darunterliegenden Bindegewebe (Cergneux *et al.*, 1982).

Auch bei *P. micra* wurden in vitro zahlreiche proteolytische Aktivitäten nachgewiesen. So hat *P. micra* die Fähigkeit, Gelatin zu hydrolisieren (Ng *et al.*, 1998) und wirkt hämolysierend (van Dalen *et al.*, 1993). Außerdem zeigen *P. micra*-Stämme in vitro Kollagenase- (Ota-Tsuzuki und Alves Mayer, 2010), Chymotrypsin- (Grenier und Bouclin, 2006), und Elastaseaktivität (Mikamo *et al.*, 1999). *P. micra* konnte, wie auch *T. denticola*, in vitro eine rekonstruierte Basalmembran aus Matrigel penetrieren. Aufgrund dessen wird angenommen, dass *P. micra* mittels seiner Proteolyse Bestandteile des parodontales Gewebe spalten und sich im Gewebe ausbreiten kann (Grenier und Bouclin, 2006; Ota-Tsuzuki und Alves Mayer, 2010).

Allerdings belegen in der Studie von Grenier und Bouclin aus dem Jahr 2006 lediglich 6 Stämme Chymotrypsinaktivität für die Spezies *P. micra* (Grenier und Bouclin, 2006). Die Gewinnung der Stämme liegt viele Jahre zurück, die untersuchten Stämme waren bereits in den Jahren 1993 (van Dalen *et al.*, 1993) und 1997 bei Parodontitispatienten

isoliert worden (Kremer *et al.*, 1997). Dagegen untersuchte die hier vorgelegte Studie 22 *P. micra*-Wildstämme auf Chymotrypsinaktivität. In der Untersuchung von Ota-Tsuzuki und Mayer aus dem Jahr 2010 zeigten nur 2 von 38 parodontalen *P. micra*-Stämmen Elastaseaktivität. Bei den Stämmen handelte es sich um 35 Wildstämme und 3 Laborstämme (Ota-Tsuzuki und Alves Mayer, 2010). Jedoch steht das Ergebnis der Studie von Ota-Tsuzuki und Mayer im Gegensatz zu dem einer weiteren Studie, in der 9 von 18 getesteten Wildstämmen der Spezies *P. micra* Elastaseaktivität zeigten. Die getesteten Stämme entstammten jedoch nicht der oralen Flora sondern dem Urogenitalbereich (Mikamo *et al.*, 1999). Als Beitrag zu der Elastaseaktivität bei parodontalen Bakterien der Spezies *P. micra* wurden in der hier vorgelegten Arbeit weitere 22 *P. micra*-Wildstämme auf ihre Elastaseaktivität untersucht.

1.12 Gegenüberstellung von Laborstämmen und Wildstämmen

Der Terminus „Wildstämme“ beschreibt Bakterienstämme, die in ihrer natürlichen Umgebung vorkommen und leben (Merkley *et al.*, 2017). Dagegen sind „Laborstämme“ Bakterienstämme, die wiederholt in einem künstlichen Nährmedium und unter definierten Umweltbedingungen kultiviert werden (Fux *et al.*, 2005). Die Lebensbedingungen von Laborstämmen und Wildstämmen unterscheiden sich stark. So bestehen im Labor für die Kultivierung der Laborstämme idealisierte Bedingungen bezüglich Nährstoffangebot, Temperatur und Luftfeuchtigkeit (Palkova, 2004). Auch werden Laborstämme als Monokulturen nur einer Bakterienspezies wiederholt subkultiviert. Sie müssen so nicht mit anderen Bakterienspezies konkurrieren (Fux *et al.*, 2005). In der natürlichen Umgebung von Wildstämmen hingegen sind Nährstoffe knapp, Wildstämme müssen mit anderen Bakterienspezies konkurrieren und sind mit der Immunabwehr des Wirts konfrontiert (Leiser *et al.*, 2018; Merkley *et al.*, 2017). Auch Parodontitisbakterien finden in dem subgingivalen Biofilm in der parodontalen Tasche eine komplett andere Umgebung vor als bei einer Kultivierung im Labor (Deng *et al.*, 2018). Sie stehen in Konkurrenz zu einer Vielzahl anderer Bakterienspezies und werden von der Immunabwehr des Wirts bedroht (Meyle und Chapple, 2015).

2 Fragestellung und Studienziel

Parodontitis ist eine Erkrankung mit multifaktorieller Genese, die aus einem komplexen Wechselspiel zwischen einem mikrobiellen Angriff und der entzündlichen Antwort des Wirts entsteht. Bakteriellen Virulenzfaktoren in einem dysbiotischen Biofilm werden als der primär ätiologische Faktor angesehen (Meyle und Chapple, 2015). Der Abbau von Neutrophil extracellular traps (NETs) durch extrazelluläre DNasen ist ein bedeutsamer Virulenzfaktor parodontopathogener Bakterien der Gattung *Prevotella*. Durch Umgehen dieses Abwehrmechanismus können sich die Keime verstärkt in der parodontalen Region ausbreiten und den Entzündungsprozess der Parodontitis fördern (Doke *et al.*, 2017). Das Fusobacterium Adhäsion A (FadA) ist essenziell für die Bindung der *Fusobacteria* an orale Epithelzellen und hat eine bedeutende Rolle bei der Kolonisierung des Wirts bei Parodontitis (Han *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2014). Die proteolytischen Aktivitäten von Chymotrypsin und Elastase parodontopathogener Bakterien der Spezies *P. micra* können Bestandteile des parodontalen Gewebes abbauen, was eine Verbreitung im Parodontium ermöglicht (Grenier und Bouclin, 2006). Allerdings sind die drei genannten Virulenzfaktoren teils nur an wenigen Laborstämmen der jeweiligen Gattung getestet und nachgewiesen worden. Es ist bekannt, dass sich Laborstämme infolge häufiger Subkultivierung an die Laborbedingungen adaptieren, so dass Unterschiede in ihrer Virulenz im Vergleich zu Wildstämmen entstehen können (Leiser *et al.*, 2018; Sjodin *et al.*, 2010). Folglich stellt sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß die oben genannten Virulenzfaktoren auch bei Wildstämmen derselben Gattung vorhanden sind. Um diese Fragen zu beantworten, wurden mehrere Laboruntersuchungen an einer Vielzahl von Wildstämmen durchgeführt. Die Hypothesen dieser Untersuchungen lauteten: Erstens, parodontale Wildstämme der Gattung *Prevotella* sind in der Lage, extrazellulär DNA abzubauen. Zweitens, parodontale Wildstämme der Gattung *Fusobacterium* beherbergen das Adhäsion FadA. Und drittens, parodontale Wildstämme der Spezies *P. micra* besitzen Chymotrypsin- und Elastaseaktivität.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Wildstämme

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 66 Wildstämme auf das Vorhandensein eines für sie charakteristischen Virulenzfaktors untersucht. 9 Wildstämme der Gattung *Prevotella*, 3 Wildstämme der Gattung *Segatella*, und 1 Wildstamm der Gattung *Hoylesella* wurden auf ihre Fähigkeit, DNA abzubauen getestet. 31 Wildstämme der Gattung *Fusobacterium* wurden auf das Gen von Fusobacterium Adhesin A (FadA) getestet. Bei 22 Wildstämmen der Gattung *Parvimonas* wurde untersucht, ob sie Chymotrypsin- und Elastaseaktivität besitzen. Tabelle 1 zeigt die Bakteriengattungen und die Anzahl der getesteten Wildstämme. Die Bezeichnungen der einzelnen Wildstämme finden sich im Anhang 12.2.

| Gattung | Anzahl |
|----------------------|--------|
| <i>Prevotella</i> | 13 |
| <i>Segatella</i> | 3 |
| <i>Hoylesella</i> | 1 |
| <i>Fusobacterium</i> | 31 |
| <i>Parvimonas</i> | 22 |
| Gesamt: | 66 |

Tabelle 1: Anzahl und Gattungen der Wildstämme dieser vorgelegten Studie

Alle Wildstämme stammen von Parodontitispatienten und wurden im Rahmen einer anderen Studie gewonnen. Die Gewinnung erfolgte durch Entnahme subgingivaler Plaqueproben aus den parodontalen Taschen bei Patienten der Ambulanz der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität München. Aus den Plaqueproben wurden Reinkulturen gewonnen und die Bakterienspezies wurden im Max-von-Pettenkofer-Institut der Universität München mittels MALDI-TOF-MS-Analyse bestimmt. Anschließend wurden sie in einer Suspension aus Brain Heart Infusion und 10 % Glycerin bei -196°C in Cryoröhrchen eingefroren. Die Wildstämme blieben bis zu ihrer Verwendung ohne weitere Subkultivierung eingefroren. Gewinnung und Identifizierung der Wildstämme waren nicht Teil dieser Arbeit. Der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität München wurde für die Gewinnung der Wildstämme von Patienten das Studienprotokoll zur Begutachtung vorgelegt. Diese bestätigte die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit (Nr. 178-16, Votum in Anhang 12.1).

3.2 Kultivierung der Wildstämme

Für die Kultivierung der Bakterien wurden Anaerobenboxen (GasPak™ EZ large incubation container, BD, New Jersey, USA) und GasPaks (GasPak™ EZ Anaerobe Container System, BD) verwendet. Beide sind in Abbildung 1 abgebildet. Die GasPaks enthalten anorganische Carbonate, Aktivkohle, Ascorbinsäure und Wasser. Bei Öffnen wird das GasPak durch Luftkontakt aktiviert und reduziert den umgebenden Sauerstoff durch Bildung von Kohlendioxid (CO₂). Innerhalb von 2,5 Stunden entsteht so in den Anaerobenboxen eine anaerobe Atmosphäre mit weniger als 1% Sauerstoff (O₂) und 13% oder mehr Kohlenstoffdioxid (CO₂). Zur Kultivierung der Wildstämme wurden die Anaerobenboxen in einem Brutschrank (Innovens 234 EB2 CAB, JOUAN S.A.S., Frankreich) bei 37°C gelagert.

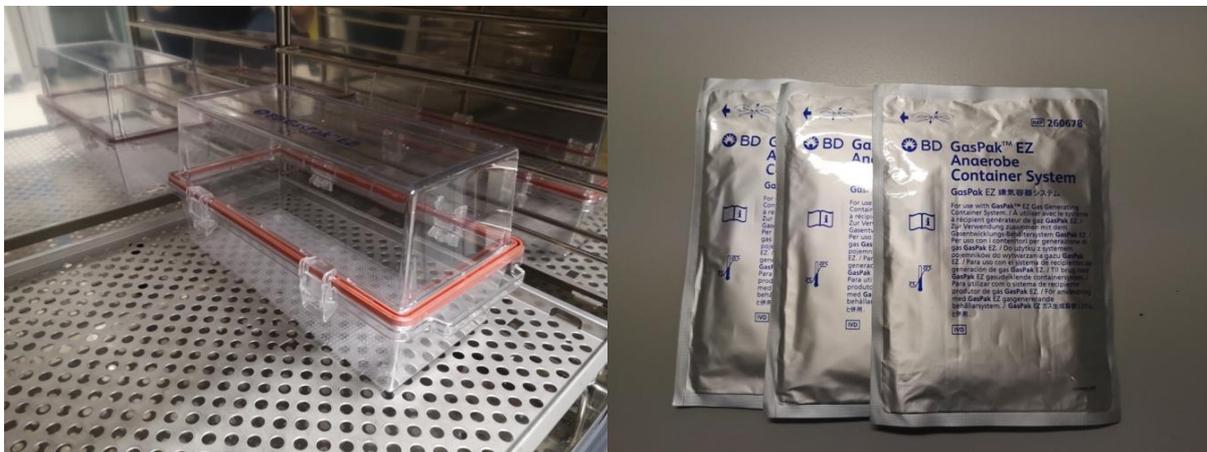


Abbildung 1: Anaerobenbox in Brutschrank (links), noch verschlossene Gaspaks (rechts)

Die gefrorenen Bakterienstämme wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut und in einer anaeroben Kammer (Bactron Anaerobic/Environmental Chamber BAC II-2E, ShellLab, Oregon, USA) auf Agarplatten (Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood, BD,) beimpft. Hierfür wurden je ein Wildstamm mit einer sterilen Impfföse (Hard loop, 10 µl, sterile, VWR, Pennsylvania, USA) mittels Dreifelderaufstrich auf die Agarplatte aufgetragen. Das Plattenmedium bestand aus Schaedler-Agar mit Vitamin K1 und 5% Schafblut. Die Agarplatten waren zuvor 2 h lang in der anaeroben Kammer gelagert worden, um den im Plattenmedium enthaltenen Sauerstoff (O₂) zu entfernen. Nach dem Beimpfen wurden die Platten zusammen mit 3 GasPaks in einer Anaerobenbox 72 h lang bei 37°C in einem Wärmeschrank bebrütet. Anschließend wurden die so kultivierten Wildstämme alle 72 h auf frische Schaedler-Agarplatten

überimpft. Abbildung 2 zeigt einen *P. micra*-Wildstamm nach 72 h Kultivierung auf einer Schaedler-Agarplatte.

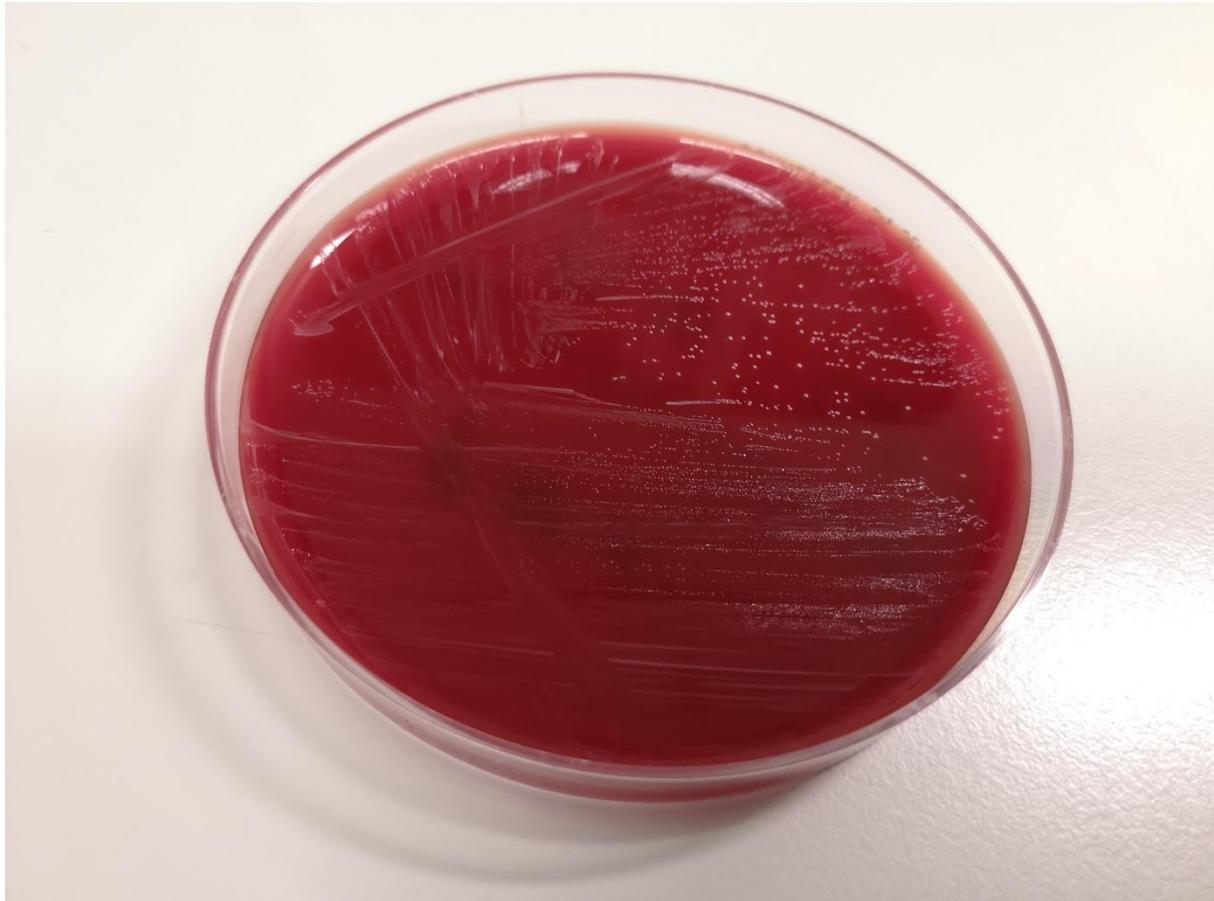


Abbildung 2: Kultivierter Wildstamm der Spezies *P. micra* auf Schaedler-Agarplatte

Für die Untersuchung der DNase-Aktivität von Wildstämmen der Gattungen *Prevotella*, *Segatella* und *Hoyleseella* und der Chymotrypsin- und Elastaseaktivität von Wildstämmen der Spezies *P. micra* wurden zusätzlich Flüssigkulturen hergestellt. Hierfür wurde ein BHI-Medium (Bacto™ Brain Heart Infusion, BD, Deutschland) verwendet, das mit Hämin und Vitamin-K supplementiert war. Das Rezept findet sich in Anhang 12.3. Vor der Kultivierung wurde das flüssige Nährmedium 20 min lang bei 121°C in einem Dampfsterilisator (Varioclav^R Dampfsterilisator 135T, HP Medizintechnik, Deutschland) sterilisiert und dann in einer anaeroben Kammer vorreduziert. Anschließend wurden die Wildstämme in der anaeroben Kammer von den Agarplatten in Reagenzgläser (Röhrchen, 15 ml, PS, 17/120 mm Rundboden, Greiner Bio-One, Österreich) mit 5 ml Flüssigmedium überimpft. Dazu wurden sie mit einer sterilen Impföse (Hard loop, 10 µl, sterile, VWR) von der Schaedler-Agarplatte aufgenommen und in die Flüssigkultur übertragen. Die beimpfte Flüssigkultur wurde

anschließend mit einem Vortex Mixer (Vortex Mixer VM-300, neoLab, Deutschland) durchmischt und dann zusammen mit 3 GasPaks in einer Anaerobenbox 24 h lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Abbildung 3 zeigt 24 h lang inkubierte Flüssigkulturen.

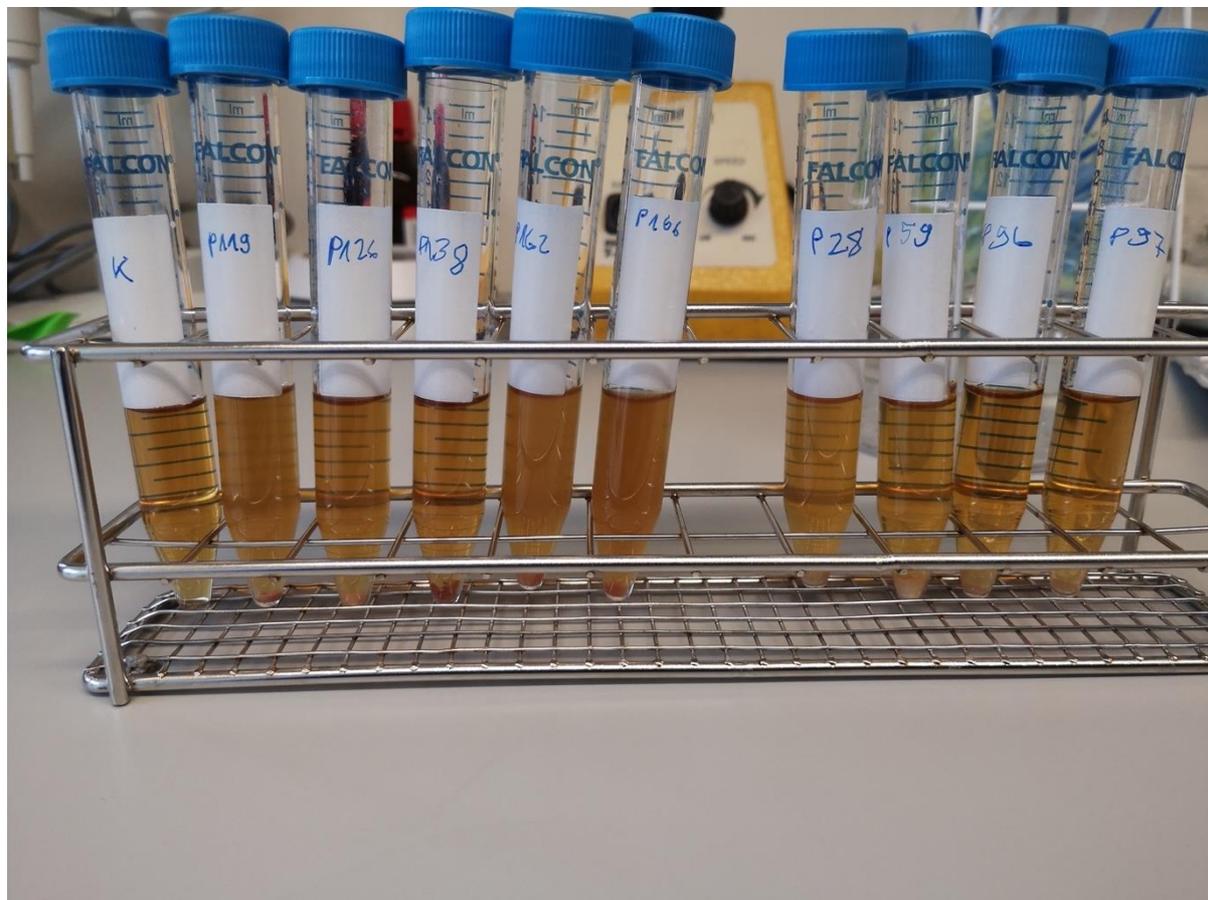


Abbildung 3: 24 Stunden inkubierte Flüssigkulturen und Kontrolle (K)

3.3 Arbeiten in der anaeroben Kammer

Um mit den Bakterienstämmen in einer anaeroben Atmosphäre arbeiten zu können, wurde eine anaerobe Kammer (Bactron Anaerobic/Environmental Chamber BAC II-2E, Sheldon, Shellab, OR, USA) verwendet. Sie besteht aus einer luftdichten Hauptkammer, einer luftdichten Schleuse und Armschleusen mit Armmanschetten. Die Kammer ist in Abbildung 4 abgebildet. Durch Fluten der Hauptkammer mit Stickstoff (N_2) wurden dort anaerobe Verhältnisse geschaffen. Reste von Sauerstoff (O_2) in der Kammer wurden mit einem Palladium-Katalysator eliminiert. Der Katalysator wurde in regelmäßigen Abständen durch 8-stündiges Erhitzen auf 180°C reaktiviert. Die anaeroben Verhältnisse in der Hauptkammer wurden mit einem Indikatorstreifen (Dry anaerobic indicator strips, BD) kontrolliert. Die Bakterienkulturen und sonstige Materialien wurden über die Schleuse und die Armschleusen anaerob in

die Hauptkammer gebracht. Dazu wurde in den Schleusen mehrmals ein Vakuum hergestellt und Schleuse und Armschleusen wurden mit Stickstoff (N_2) geflutet. Über die Armschleusen ließ sich in der Hauptkammer hantieren.

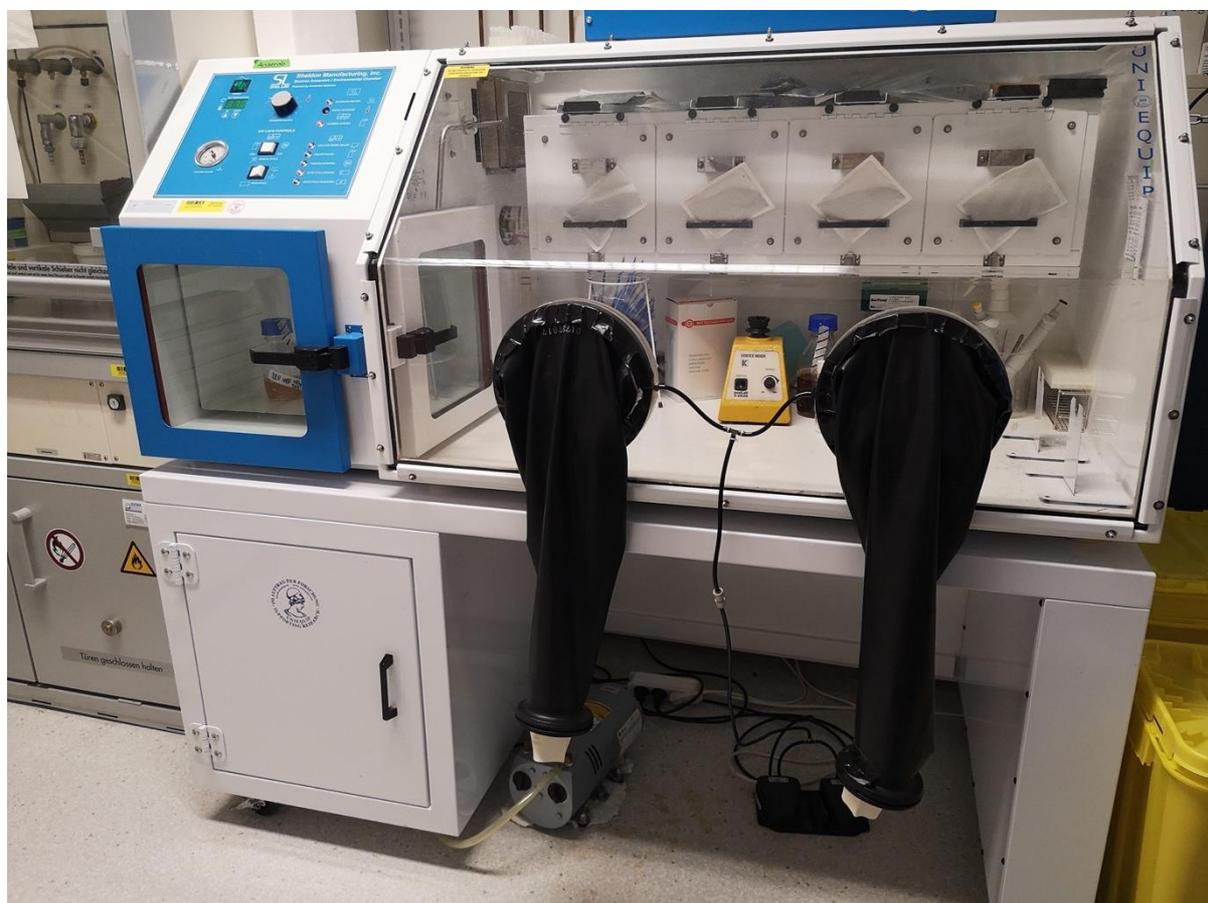


Abbildung 4: Anaerobe Kammer mit Hauptkammer, Armschleusen und Schleuse

3.4 DNase-Aktivität von Wildstämmen der Gattung *Prevotella* auf DNA-Agarplatten

Um zu testen, ob die Wildstämme der Spezies *Prevotella*, *Segatella* und *Hoylesella* extrazellulär DNA abbauten, wurden sie zunächst auf speziellen DNA-Agarplatten kultiviert. Anschließend wurde der DNA-Abbau auf der Agarplatte sichtbar gemacht und gemessen (Doke *et al.*, 2017).

3.4.1 Herstellung der DNA-Agarplatten

Die DNA-Agarplatten enthielten BHI-Nährmedium (Bacto™ Brain Heart Infusion, BD), DNA (Deoxyribonucleic acid low molecular weight from salmon sperm, Sigma-Aldrich), Magnesiumchlorid ($MgCl_2$, Magnesium chloride hexahydrate SigmaUltra minimum 99.0%, Sigma-Aldrich) und Calciumchlorid ($CaCl_2$, Calcium chloride

dihydrate for molecular biology approx. 99%, Sigma-Aldrich). Für die DNase-Reaktion werden divalente Kationen benötigt, deshalb die Zugabe der Magnesiumionen (Mg^{2+}) und Calciumionen (Ca^{2+}) (Doke *et al.*, 2017). Das Rezept findet sich in Anhang 12.3. Zur Herstellung der Platten wurden die Inhaltsstoffe mit Reinstwasser vermischt, in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht und in Petrischalen (Nunc™ Cell Culture/Petri Dishes 100X15, ThermoFisher Scientific) gegossen. Nach dem Abkühlen und Erstarren des Agars wurden die Platten bei +8°C kühl gelagert und innerhalb von 8 Tagen verwendet (Palmer *et al.*, 2012).

3.4.2 Versuchsdurchführung

Vor Versuchsbeginn wurden die DNA-Agarplatten 2 h lang in der anaeroben Kammer gelagert, um den enthaltenden Sauerstoff zu entfernen. Um sie in der anaeroben Kammer mit Flüssigkulturen der *Prevotella*-, *Segatella*- und *Hoylella*-Wildstämme zu beimpfen, wurden die 24 h inkubierten Kulturen zunächst durch Vortexen emulgiert. Dann wurden jeweils 5 µl der Flüssigkultur mit einer sterilen Pipettenspitze mittig auf die Agarplatte aufgetragen (Doke *et al.*, 2017). Anschließend wurden die beimpften DNA-Agarplatten mit 3 GasPaks in einer Anaerobenbox 48 Stunden lang bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Als negative Kontrolle diente 24 h inkubiertes, pures Flüssigmedium. Als weitere Kontrollgruppen dienten 2 Wildstämme der Gattung *Fusobacterium* und 2 Wildstämme der Spezies *P. micra*. Der Versuch wurde drei mal in unabhängigen Versuchsdurchläufen wiederholt.

3.4.3 Visualisieren des DNA-Abbaus

Um den Abbau der DNA auf den Platten sichtbar zu machen, wurden die inkubierten Agarplatten mit 1 M Salzsäure-Lösung (HCl (1 N) 1 mol/l-2N Maßlösung, Carl Roth, Deutschland) für 5 min geflutet (Doke *et al.*, 2017). Die Säure reagierte mit der nicht hydrolysierten DNA und trübte dort die Platte durch Präzipitation. Der an die Bakterienzellen angrenzende Bereich, in dem DNA abgebaut worden war blieb hingegen klar (Jeffries *et al.*, 1957). Die Ergebnisse wurden photographisch dokumentiert, dem eine Größenreferenz beigelegt wurde, wie in Abbildung 5 zu sehen ist. Die klare Fläche des DNA-Abbaus ließ sich digital mithilfe des Programms Microsoft Word (Version 16.1, WA, USA) errechnen. Hierfür wurde die kreisförmige Fläche der Bakterienkultur von der kreisförmigen Fläche aus Bakterienkultur plus

DNA-Abbau abgezogen. Die Differenz beider Flächen ergab die Fläche des DNA-Abbaus.

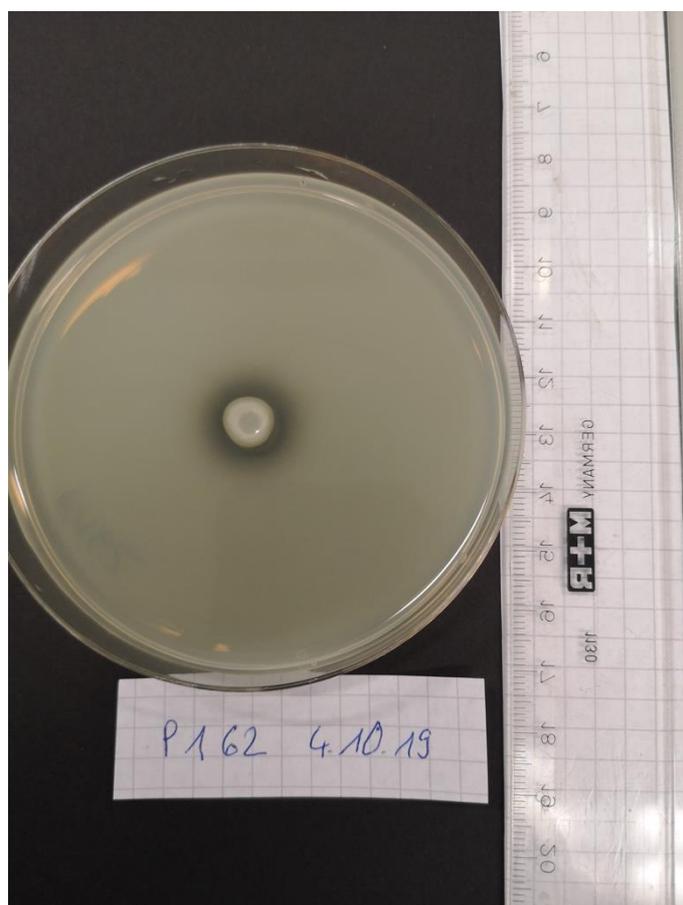


Abbildung 5: Inkubierte DNA-Agarplatte mit kreisförmiger Bakterienkultur (mittig) und angrenzend abgebaute DNA (klar), nicht abgebaute DNA auf der Platte (trüb) und beigelegter Größenreferenz (Lineal)

3.5 DNase-Aktivität von Wildstämmen der Gattung *Prevotella* in DNA-Lösung

In der zweiten Untersuchung zur DNase-Aktivität der *Prevotella*-, *Segatella*- und *Hoysella*-Wildstämmen wurden Bakterienproben mit einer DNA-Lösung inkubiert. Nach DNase-Reaktion in der Lösung konnte der Abbau unter Verwendung einer Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Für den Versuch wurden die Bakterienzellen zunächst von ihrem Kulturüberstand getrennt. Dann wurden die Proben aus Bakterienzellen und Überständen getrennt auf DNase-Aktivität untersucht. Dies ermöglichte es, zwischen zellgebundener und sezernierter DNase zu unterscheiden (Palmer *et al.*, 2012).

3.5.1 Herstellung der Bakterienproben aus Bakterienzellen und Kulturüberständen

Zur Trennung von Bakterienzellen und Kulturüberstand wurden die 24 h lang inkubierten Flüssigkulturen 40 min in einer Kühlzentrifuge (Allegra™ X-22R

Centrifuge, Beckman Coulter, Kalifornien, USA) bei 4°C mit 1000 g zentrifugiert (Palmer *et al.*, 2012). Die Kulturüberstände über dem Bodensatz aus Bakterienzellen konnten dann mit einer Spritze (Injekt^R Luer Solo, 2 ml, B Braun, Deutschland) aufgenommen werden. Um Verunreinigungen der Kulturüberstände durch Bakterienzellen zu verhindern, wurden sterile 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter (Sterile Syringe Filter w/ 0,2µm polyethersulfone membrane, VWR) verwendet (Palmer *et al.*, 2012). Die in den Spritzen aufgezogenen Flüssigkulturen wurden durch den Vorsatzfilter in Reagiergefäße (Reagiergefäß 1,5 ml Easy Cap, Sarstedt, Deutschland) filtriert. Als negative Kontrolle diente 24 Stunden lang inkubiertes pures Flüssigmedium. Die aus den Kulturüberständen gewonnenen Proben wurden bei -20°C eingefroren. Für die Proben aus den Bakterienzellen wurde der Bodensatz der zentrifugierten Flüssigkulturen zweimal mit PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline sterile filtered endotoxin tested, Sigma-Aldrich) gewaschen, was verbliebenes Flüssigmedium entfernte. Hierfür wurde der Bodensatz aus Bakterienzellen mit 500 µl PBS resuspendiert. Die entstandene Emulsion wurde dann 15 min lang bei 1000 g und 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und der Überstand über den Bakterienzellen abpipettiert (Palmer *et al.*, 2012). Dieser Waschvorgang wurde wiederholt und anschließend wurden die Bakterienzellproben in Reagiergefäße pipettiert. Als negative Kontrolle diente 24 Stunden inkubiertes pures Flüssigmedium. Im Anschluss wurde überprüft, ob die einzelnen Proben aus Bakterienzellen vergleichbare Bakterienzellkonzentrationen enthielten. Hierfür wurde die optische Dichte der Proben photometrisch gemessen (Palmer *et al.*, 2012). Dazu wurden 100 µl jeder Probe in ein Kompartiment einer klaren 96-Well-Platte (Microplate 96 Well OS F-Bottom Clear, Greiner Bio-one) pipettiert und bei 620 nm in einem Photometer (Thermo Electron Varioskan Type 3001, ThermoFisher Scientific) gemessen. Um aus der optischen Dichte die Zellkonzentration in CFU/ml zu errechnen, wurden die Messergebnisse mit dem Faktor $8,5 \times 10^8$ multipliziert (Ota-Tsuzuki und Alves Mayer, 2010). Die Proben der Bakterienzellen wurden ebenfalls bei -20°C eingefroren.

3.5.2 Vorbereitung der DNA-Lösung und der positiven Kontrollproben

Für den Versuch wurde eine DNA-Lösung hergestellt, bestehend aus einem DNase-Reaktionspuffer und Kalbsthymus-DNA (Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus suitable for substrate for DNase (Readily soluble), Sigma-Aldrich) (Palmer *et*

al., 2012). Der DNase-Reaktionspuffer seinerseits bestand aus 10 mM Tris-Puffer, 2,5 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$, Magnesium chloride hexahydrate SigmaUltra minimum 99.0%, Sigma-Aldrich) und 0,05 mM Calciumchlorid ($CaCl_2$, Calcium chloride dihydrate for molecular biology approx. 99%, Sigma-Aldrich) und hatte einen pH-Wert von 7,6. Das Rezept findet sich in Anhang 12.3. Der pH-Wert von 7,6 gewährleistet die optimale DNase-Aktivität des Enzyms (Doke *et al.*, 2017). Die zweiwertigen Kationen, Mg^{2+} und Ca^{2+} sind für die Enzymfunktion der DNase nötig (Pan und Lazarus, 1999). Der pH-Wert der Lösung wurde mithilfe einer pH-Meters (827 pH lab, Metrohm, Schweiz) gemessen und durch schrittweise Zugabe von 1 M HCL-Lösung auf pH = 7,6 eingestellt. Für die DNA-Lösung wurde 2,5 ml des DNase-Reaktionspuffers zu 1,0 mg Kalbsthymus-DNA pipettiert und bei 8°C über Nacht gelagert, um die DNA vollständig im Puffer zu lösen. Vor Gebrauch wurde die DNA-Lösung geschwenkt und vorsichtig durch wiederholtes Einsaugen mit der Pipette vermischt.

Als positive Referenz dienten Kontrollproben mit DNase I (Palmer *et al.*, 2012). Dazu wurden Standards in den DNase-Konzentrationen 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0, 32,0, 64,0 und 132,0 K/ml hergestellt. Hierfür wurden 0,25 mg DNase I aus Rinderpankreas (Deoxyribonuclease I from bovine pabcreas Standardized vial containing 2,000 Kunitz units of DNase I Vial 0 \geq 0.25mg total protein, Sigma Aldrich) auf die benötigten Konzentrationen verdünnt. Zur Verdünnung dienten wie bei den Bakterienproben PBS für die Proben aus Bakterienzellen und BHI-Flüssigmedium für die Proben aus Flüssigkulturüberständen. Die so hergestellten Standards wurden dann bei -20°C in Reagiergefäßen eingefroren.

3.5.3 Versuchsdurchführung

Jeweils 40 μ l der DNA-Lösung und 10 μ l einer Bakterienprobe wurden in ein Reagiergefäße pipettiert, durch Vortexen vermischt und in einem Thermoblock (Denley Vortemp, ThermoFisher Scientific) bei 37°C 30 min lang inkubiert. Die enzymatische Spaltung der DNA durch die DNase wurde anschließend durch Zugabe von 12,5 μ l 0,5M EDTA (Ethylendiaminetetraacetic acid disodium salt solution for molecular biology, 0.5 M in H_2O , DNase, RNase, NICKase and protease, none detected, Sigma-Aldrich) gestoppt (Doke *et al.*, 2017). Das EDTA bildet Komplexe mit den zweiwertigen Kationen, Mg^{2+} und Ca^{2+} . Die für die DNase-Aktivität nötigen

zweiwertigen Kationen werden so entfernt, was die DNase hemmt (Sundberg *et al.*, 1974). Es wurden 3 unabhängige Versuchsdurchläufe durchgeführt.

3.5.4 Visualisieren des DNA-Abbaus mittels Gelelektrophorese

Um den Abbau der DNA in der DNA-Lösung sichtbar zu machen und zu messen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (Palmer *et al.*, 2012). Diese Analysetechnik trennt geladene Moleküle nach ihrer Größe. Beim Anlegen einer Spannung wandern die geladenen Moleküle in einem elektrischen Feld durch ein Gel. Dabei hält ein Puffer den pH-Wert konstant und ermöglicht den Elektronenfluss. Da Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert wegen ihrer Phosphodiesterbindungen negativ geladen sind, wandern sie zur positiven Elektrode. Abbildung 6 zeigt die positive Elektrode in rot. Das bei der Gelelektrophorese verwendete Gel besteht aus Agarose, einem Polysaccharid aus Galaktose. Da kleinere Moleküle schneller durch die Poren der Agarose-Gelmatrix wandern als größere, lassen sich die Moleküle ihrer Größe entsprechend trennen. Die in dem Gel gewanderte DNA lässt sich mit Ethidiumbromid, einem fluoreszierenden Farbstoff sichtbar machen. Ethidiumbromid wird in die DNA aufgenommen, indem es sich zwischen die Basenpaare der Doppelhelix einlagert. Wenn es mit UV-Licht von 302 nm Wellenlänge bestrahlt wird, fluoresziert das eingelagerte Ethidiumbromid mit 590 nm Wellenlänge (Armstrong und Schulz, 2015).

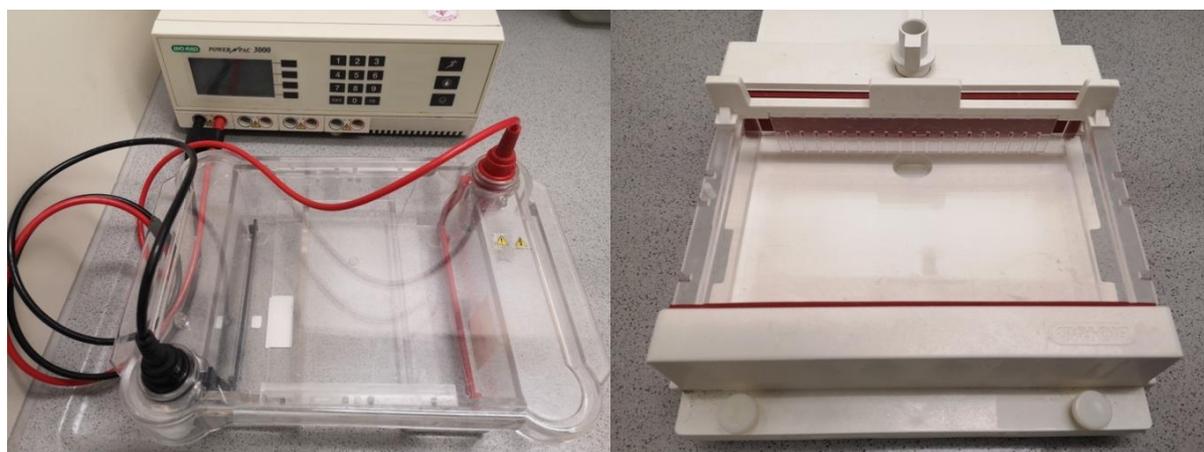


Abbildung 6: Elektrophoresekammer mit positiver Elektrode (rot), negativer Elektrode (schwarz) und Stromquelle (links) und Gelform zum Gießen des Gels (rechts)

Für die Elektrophorese wurde ein 0,8%-iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid hergestellt. Das Rezept findet sich in Anhang 12.3. Hierfür wurde TBE-Puffer mit Agarose (Biozym LE Agarose For gel electrophoresis, Biozym, Deutschland) vermischt und in der Mikrowelle aufgekocht. Dann wurde das Ethidiumbromid

(Ethidium bromide solution, 10 mg/ml Molecular biology tested suitable for gel electrophoresis DNA isolation procedures, Sigma-Aldrich) unter einem Abzug hinzu pipettiert. Die Lösung wurde in die Gelform (Mini-Sub Cell GT Gel Caster, Bio-Rad, Kalifornien, USA) gegossen. Die Gelform ist in Abbildung 6 dargestellt. Beim Abkühlen erstarrte die Lösung zum Gel. Das Gel wurde mit den Geltaschen nahe der negativen Elektrode in die Elektrophoresekammer (Sub-Cell GT Wide Mini, Bio-Rad) eingesetzt und die Elektrophoresekammer mit 1X TBE-Puffer so weit aufgefüllt, bis das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war. Um die farblosen DNA-Lösungen kontrolliert in die Geltaschen pipettieren zu können und am Boden der Geltaschen zu sammeln, wurde ein blauer Laufpuffer (DNA-Auftragspuffer 6x, 5ml, Apotheke Klinikum der Universität München, Deutschland) verwendet. Vor Beladen des Gels wurde jeder inkubierten DNA-Lösung 12,6 μ l Laufpuffer hinzupipettiert und durch vortexen vermischt. Anschließend wurden je 20 μ l Probe in die Geltaschen Gels pipettiert und die Elektrophorese gestartet. Die technischen Daten der Elektrophorese mit der 14,5 cm langen Elektrophoresekammer waren 72 V, 400 mA und 400 W. Nach 1 h wurde die Elektrophorese gestoppt, das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und in der UV-Box (CN-3000.WL/LC Infinity, Peqlab -Life Science/ VWR) beleuchtet. Das Ergebnis wurde mit einer Software (Infinity-Capt Software) dokumentiert, wie die Abbildung 7 zeigt. Die Stärke der DNase-Aktivität wurde anhand der Strecke bestimmt, welche die DNA während der Elektrophorese gewandert war. Denn je stärker die DNA-Stränge in kürzere Oligonukleotide abgebaut worden waren, desto schneller wanderten diese während der Elektrophorese. (Palmer *et al.*, 2012) Mithilfe der Größenreferenz neben dem Gel konnten die einzelnen DNA-Proben gemessen werden. Gemessen wurde dabei die Länge der Strecke von der Geltasche bis zur vorderen Front der fluoreszierenden DNA-Bande in Laufrichtung.

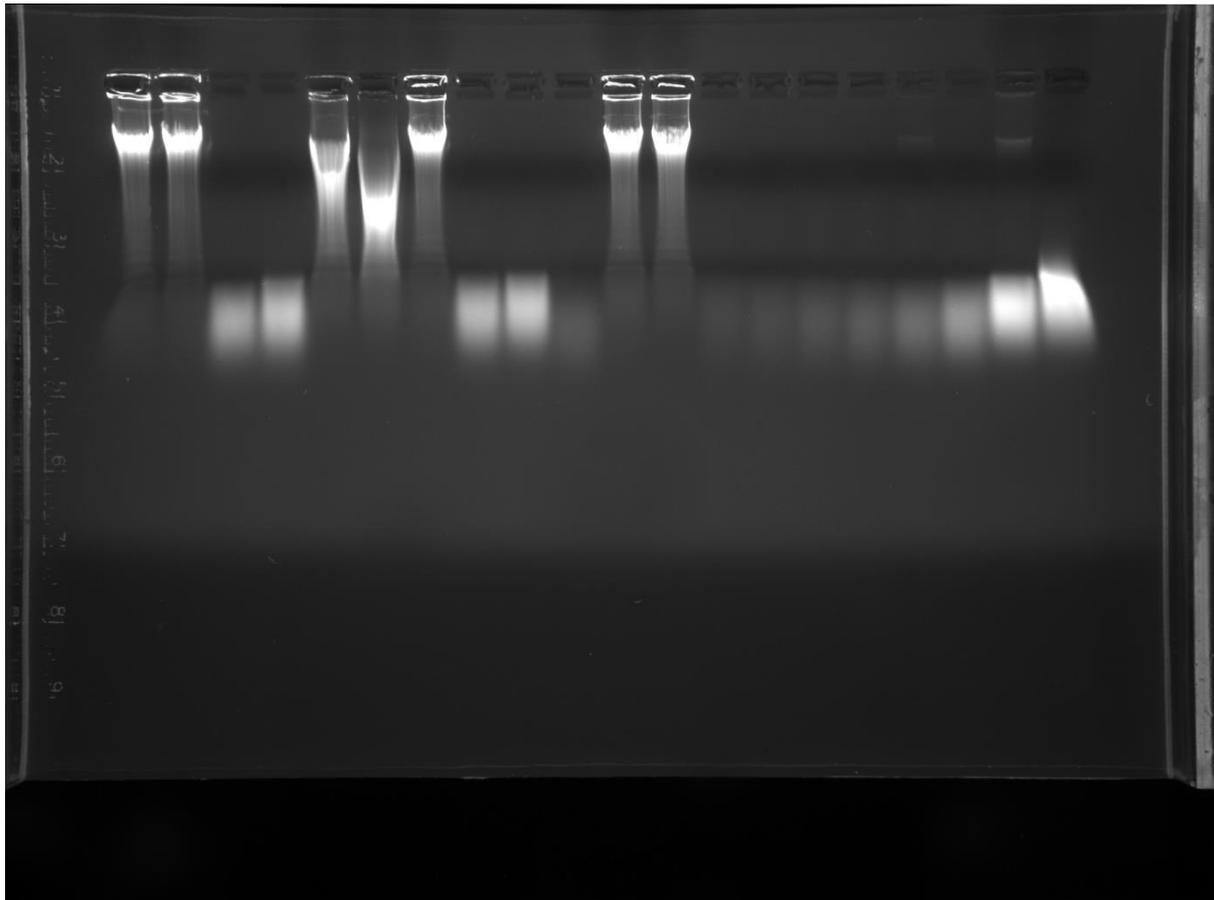


Abbildung 7: Unter UV-Licht visualisierte DNA-Banden in dem Agarosegel der Bakterienstämme 3. bis 10. Bande von links, negativer Kontrolle (linke Bande) und positiven Kontrollen (acht Banden von rechts) mit Größenreferenz links

3.6 FadA-Gen bei Wildstämmen der Gattung *Fusobacterium*

Für den Nachweis des FadA-Gens bei den Wildstämmen der Gattung *Fusobacterium* wurde die DNA der einzelnen Stämme mit dem MagNA Pure LC (MagNA Pure LC, Roche, Schweiz) extrahiert. Die extrahierte DNA wurde im Anschluss mittels PCR auf das Vorhandensein des FadA-Gens untersucht und dieses mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht (Liu *et al.*, 2014).

3.6.1 Isolation bakterieller DNA mittels Magna pure LC

Zur Isolation der bakteriellen DNA wurde das Magna Pure LC (MagNA Pure LC, Roche) verwendet, wie in Abbildung 8 abgebildet. Bei der DNA-Isolierung fügt das Gerät einen Lysepuffer (Lysis/Binding Buffer, Bottle 4, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, Roche) zu den Proben hinzu, der die Zellen in den Proben lysiert und die nukleare DNA freisetzt. Durch Zugabe von magnetischen Glasparkeln (Magnetic Glass Particles Suspension, Vial 5, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, Roche) mit

magnetischem Kern und einer Beschichtung aus Siliziumglas bindet die freigesetzte DNA an die Oberfläche der Partikel. Aufgrund von chaotropen Salzbedingungen, Isopropanol und der hohen Ionenstärke des Lysepuffers adsorbiert die DNA an die Siliziumoberfläche der Glaspartikel. Die Magnetpartikel mit der anhaftenden DNA können durch magnetische Anziehung mit der magnetischen Platte des robotischen Arms an den Pipettenspitzen vom Rest der lysierten Probe entfernt werden. Anschließend werden die magnetischen Partikel wiederholt mit Waschpuffern (Wash Buffer I-III, Bottle 1-3, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, Roche) gewaschen, um nicht gebundene Substanzen zu entfernen. Als letzter Schritt wird die purifizierte DNA mit einem Puffer (Elution Buffer, Bottle 6, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, Roche) mit niedrigem Salzgehalt und Hitze gelöst und die magnetischen Partikel werden mit der magnetischen Platte von der purifizierten DNA entfernt (Fiebelkorn *et al.*, 2002).



Abbildung 8: MagNA Pure LC, Plattform mit positionierten Pipettenspitzen und Einweg-Kunststoffbehältnissen und robotischem Arm (rechts hinten)

Bei der Untersuchung wurden die 72 Stunden lang kultivierten *F. nucleatum*-Wildstämme mit einer sterilen Impföse von der Agarplatte aufgenommen und in einem Reagiergefäß in 1 ml PBS gelöst. Als negative Kontrolle diente 1 ml pures PBS. Um die Bakterienkonzentrationen der Proben zu überprüfen, wurden sie in einem Photometer (Thermo Electron Varioskan Type 3001, ThermoFisher Scientific) bei 620 nm vermessen. Zur Lyse der Bakterienzellen wurden je 250 µl Bakterienprobe mit 230 µl Lysepuffer (Bacteria Lysis Buffer, Bottle 7, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III Roche) und 20 µl Proteinase-K-Lösung 10 Minuten lang in einem Wasserbad bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt. Für eine bessere Lyse der Bakterienzellen wurden die Proben zusätzlich mit dem Magna Lyser (Magna Lyser, Roche) mechanisch homogenisiert. Der Magna Lyser spaltet mechanisch Zellen und andere biologische Materialien auf. Die zu homogenisierenden Proben werden dazu in Green Beads Rörchen (MagNA Lyser Green Beads, Roche) gefüllt, die Keramikperlen enthalten. Abbildung 10 zeigt Magna Lyser und Green Beads Rörchen. Der Magna Lyser schüttelt über einen Rotor die Proben mit den Keramikperlen bei sehr hoher Geschwindigkeit und die Zellen brechen bei der Kollision mit den Keramikperlen auf.

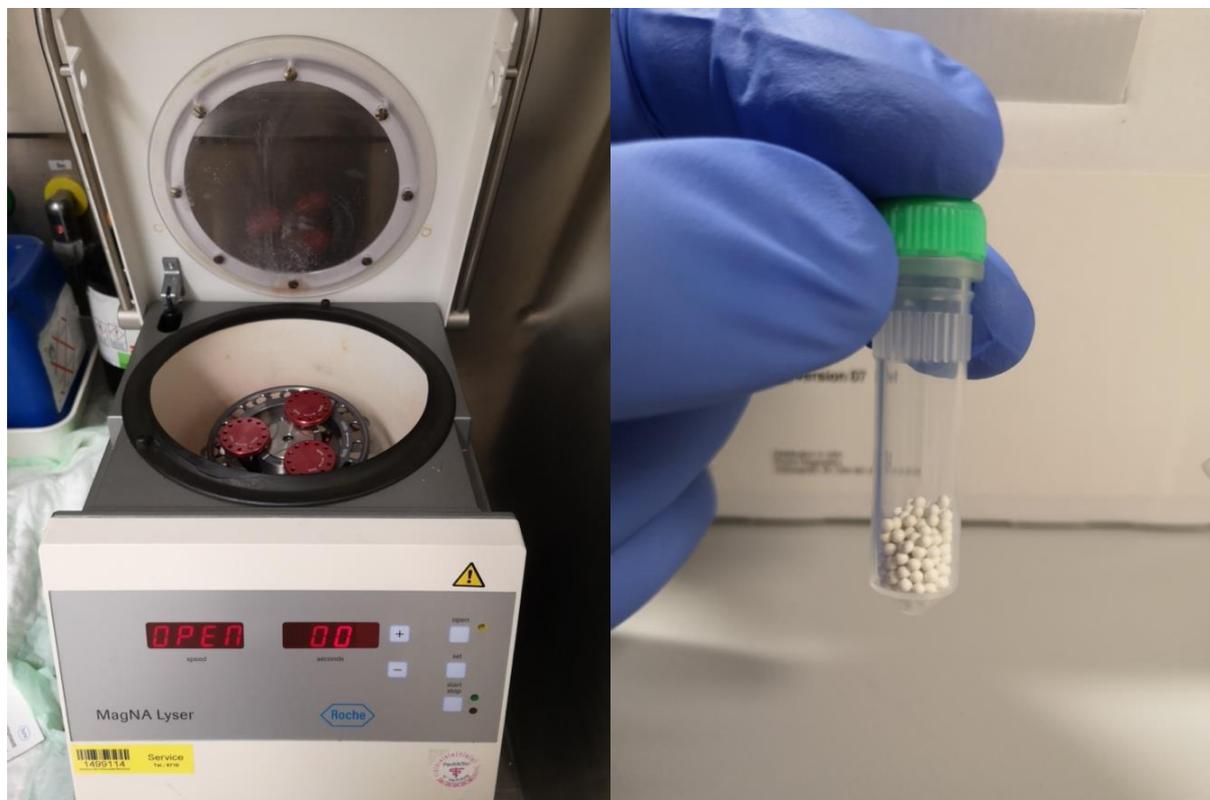


Abbildung 9: Magna Lyser mit Rotor (links), Green beads Gefäß mit den Keramikperlen (rechts)

Zur Zellaufspaltung wurden die Lösungen in Green beads Röhrchen (MagNA Lyser Green Beads, Roche) pipettiert und 30 Sekunden lang bei 6000 rpm im Magna Lyser homogenisiert. Die homogenisierten Proben wurden im Anschluss auf Eis gestellt und dann bei 14000 rpm 5 min lang zentrifugiert.

Für die DNA-Extraktion mit dem MagNA Pure LC wurden die Einmalprodukte ins Gerät gegeben, die Reagenzien nach Angaben der Software in die entsprechenden Behältnisse pipettiert, und diese ebenfalls in den Magna Pure gegeben. Dann wurde die DNA-Extraktion im Magna Pure LC durchgeführt. Nach der DNA-Isolation wurde die extrahierte DNA auf 30 µl in Reagiergefäße aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Die verwendeten Einmalprodukte und Mengenangaben der Reagenzien finden sich in Anhang 12.3.

3.6.2 FadA-spezifische PCR

Zum Nachweis des FadA-Gens wurde bei der extrahierten DNA der *F. nucleatum*-Wildstämme eine FadA-spezifische PCR durchgeführt (Liu *et al.*, 2014). Bei der PCR, der polymerase chain reaction, wird *in vitro* ein gewünschter DNA-Abschnitt vervielfältigt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt durch mehrere Zyklen aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Für die PCR werden die Proben in einen Tharmocycler geladen, der die Proben exakt auf die benötigte Temperatur erwärmt.

Als erster Schritt der PCR erfolgt die Denaturierung. Sie ist in Abbildung 11, Cycle 1, Nummer 1 dargestellt (Garibyan und Avashia, 2013). Das Erhitzen auf 95°C teilt den Doppelstrang der zu vervielfältigenden DNA. Dabei löst die thermische Energie die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren der beiden DNA-Stränge (Ramesh *et al.*, 1992).

Als zweiter Schritt erfolgt die Primerhybridisierung. Sie ist in Abbildung 11, Cycle 1, Nummer 2 dargestellt. Primer sind kurze Sequenzen aus Nukleinsäuren. Sie lagern sich gezielt an den zu vervielfältigenden Abschnitt der DNA an und definieren so den Startpunkt für die DNA-Polymerase bei der anschließenden Elongation. Die beiden Primer, der Reverse-Primer und der Forward-Primer binden an die ihnen komplementäre Stellen des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts. Hierbei bindet der Forward-Primer auf dem DNA-Strang an das eine Ende des zu vervielfältigenden

DNA-Abschnitts. Der Reverse-Primer bindet auf dem komplementären DNA-Strang an das andere Ende des zu vervielfältigenden Abschnitts. Die 3' Enden der beiden Primer sind so einander zugeordnet. Beim Herunterkühlen auf 37-72°C lagern sich die Primer an die DNA-Einzelstränge (Ramesh *et al.*, 1992).

Als dritter Schritt erfolgt die Elongation. Sie ist in Abbildung 11, Cycle 1, Nummer 3 dargestellt. Die DNA-Polymerase ist ein Enzym, das an einem komplementären DNA-Strang einen neuen DNA-Strang aus Desoxynukleosidtriphosphaten synthetisieren kann. Bei 72°C synthetisiert die DNA-Polymerase aus den Nucleotiden neue DNA, beginnend an dem 3' Ende des Primers entlang der zu vervielfältigenden Sequenz. Die Nucleotide dienen hierbei als Bausteine und beinhalten Adenin, Thymin, Zytosin und Guanin. Als DNA-Polymerase dient Taq-Polymerase, die bei 94°C hitzebeständig ist und aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird (Ramesh *et al.*, 1992).

Nach der Elongation dient der neu synthetisierte DNA-Strang als Schablone für den nächsten Zyklus. Dann beginnen Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation erneut, wie in Abbildung 11, Cycle 2 und Cycle 3 veranschaulicht. Aus den wiederholten Zyklen entstehen Replikate der gewünschten DNA-Sequenz in exponentieller Weise (Erich, 1989).

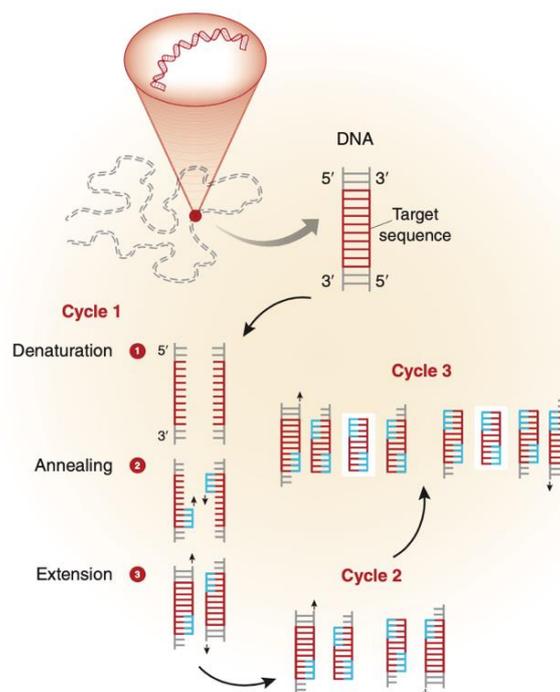


Abbildung 10: Ablauf PCR (Garibyan und Avashia, 2013)

Für den FadA-Nachweis in der vorgelegten Studie wurden Primer verwendet, die einen 232 Basenpaaren langen Abschnitt des FadA-Gens vervielfältigten. Der Forward-Primer war FadA-F (59-CAC AAG CTG ACG CTG CTA GA -39, Invitrogen Cusom Primer, Thermo Fisher Scientific) und der Reverse-Primer war FadA-R (59-TTA CCA GCT CTT AAA GCT TG -39, Invitrogen Cusom Primer, Thermo Fisher Scientific) (Liu *et al.*, 2014). Aus beiden Primern wurde mit Reinstwasser eine wässrige Lösung hergestellt, aus 40,0 nmol FadA-F 20,0 µmol/l und aus 45,4 nmol FadA-R 20,6 µmol/l. Die Lösungen wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gestellt und für die anschließenden Versuche auf -20°C eingefroren. Die isolierte DNA der Wildstämme von *F. nucleatum* wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Dann wurden die DNA-Proben mit einer sterilen Pipette 10 mal gespült, 5 µl Probe in ein Reagiergefäß pipettiert und nach kurzem Spin am Boden des Reagiergefäßes gesammelt. Für die PCR wurde ein Mastermix hergestellt, das Rezept dazu findet sich in Anhang 12.3. Alle Arbeitsschritte wurden bei Kühlung auf Eis durchgeführt. Der Mastermix wurde durch mehrmaliges Einsaugen in die Pipettenspitze gemischt und je 45 µl davon zu den DNA-Proben hinzupipettiert. Die fertigen Proben im Volumen von 50 µl wurden in den Thermocycler (S100 Thermal Cycler, Bio-Rad) geladen, dann wurde die PCR durchgeführt. Die Daten zur Programmierung des Thermocyclers für die PCR finden sich in Anhang 12.3.

3.6.3 Nachweis des FadA-Gens mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Für den Nachweis des 232 Basenpaare langen, amplifizierten Abschnittes des FadA-Gens wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Liu *et al.*, 2014). Zunächst wurde ein 1,5%-iges Agarosegel mit Ethidiumbromid hergestellt. Das Rezept dazu findet sich in Anhang 12.3. Als Größenreferenz für den 232 Basenpaare langen, amplifizierten Genabschnitt des FadA-Gens wurde eine DNA-Leiter in Stufen von 100 Basenpaaren (GeneRuler 100 bp ready-to-use 0.1µg/µl, 50 µg, ThermoFisher Scientific) verwendet. Die DNA-Leiter enthält bekannte Massen an DNA-Fragmenten und kann bei der Gelelektrophorese als Größenreferenz für die aufzutrennende DNA verwendet werden (Armstrong und Schulz, 2015). Der in den DNA-Proben enthaltene Reaktionspuffer (5X Green GoTaq Reaction buffer, Promega), der in der PCR verwendet wurde, enthält einen blauen und gelben Farbstoff, die als Größenreferenz bei der Elektrophorese dienen. Der gelbe Farbstoff wandert in einem

1% Agarose-Gel bei einem pH-Wert von 8,5 schneller als der <50 Basenpaare lange Primer, während der blaue Farbstoff in ähnlich schnell wandert wie ein DNA-Fragment in der Länge von 3000-5000 Basenpaaren. Des Weiteren erhöht der Reaktionspuffer die Dichte der Probe, sodass die Proben ohne Zugabe eines Ladepuffers in die Geltaschen pipettiert werden konnten. In Abbildung 12 sind links die gelben und blauen Banden des Reaktionspuffers nach der Elektrophorese zu sehen. Die Proben der DNA-Leiter, die Versuchsproben und die negative Kontrolle wurden kurz gevortext und dann je 20 µl davon mit einer sterilen Pipettenspitze in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte eine Stunde lang, bei 145 V, 400 mA und 400 W. Die Länge der Elektrophoresekammer war 29 cm. Im Anschluss wurden die aufgetrennten DNA-Proben in einer UV-Kammer (CN-3000.WL/LC Infinity, Peqlab - Life Science/ VWR, Pennsylvania, USA) mit UV-Licht beleuchtet und das Ergebnis mit einer Software (Infinity-Capt Software) dokumentiert. Das zeigt Abbildung 12 rechts. Der Versuch der PCR und anschließender Agarose-Gel- Elektrophorese wurde zwei mal durchgeführt, um die Ergebnisse zu verifizieren.

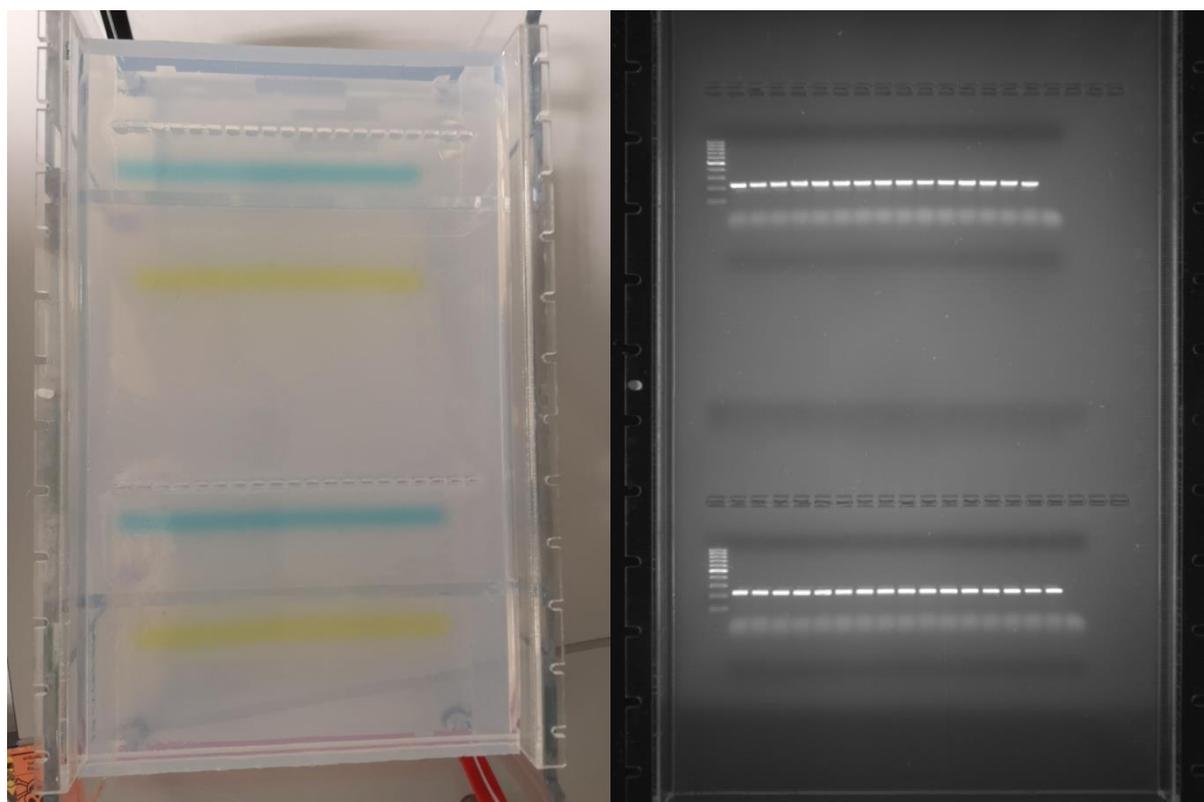


Abbildung 11: Agarosegel nach Elektrophorese unter Raumlampe (links) und unter UV-Licht (rechts) mit 100 BP DNA-Leiter (je erste Bande von links), negative Kontrollen (vierte Spalte von rechts oben, dritte Spalte von rechts unten) und die getesteten *Fusobacterium*-Wildstämme (dazwischen liegenden Banden)

3.7 Chymotrypsin- und Elastaseaktivität von Wildstämmen der Spezies *P. micra*

Um die Wildstämmen der Spezies *P. micra* auf ihre Chymotrypsinaktivität und Elastaseaktivität zu testen, wurden Bakterienproben mit chromogenen Peptidlösungen inkubiert. Für die Unterscheidung zwischen zellgebundener und sezernierter Protease wurden Proben aus Bakterienzellen und aus Kulturüberständen verwendet. Für die Versuche dienten synthetische Peptide mit einer p-Nitroanilingroupe (Grenier und Bouclin, 2006). Wenn sie im Peptid gebunden ist, ist die p-Nitroanilingroupe nahezu farblos, bei einem molaren Absorptionskoeffizienten von $50 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 405 nm. Nach Abspaltung des p-Nitroanilins durch Proteolyse färbt sich das Molekül gelb, mit einem molaren Absorptionskoeffizienten von $10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 405 nm (Budzynski, 2001). Die Strukturformel des p-Nitroanilins ist in Abbildung 13 dargestellt.

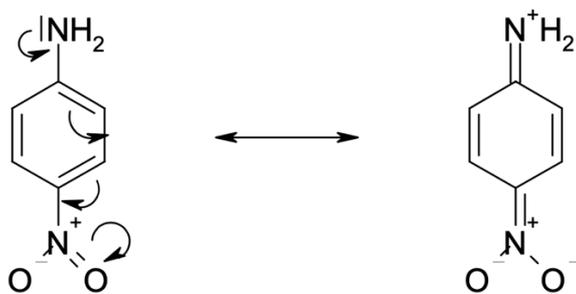


Abbildung 12: Strukturformel des p-Nitroanilins

3.7.1 Herstellung der Bakterienproben aus Bakterienzellen und Kulturüberständen

Für die Untersuchung wurden Bakterienproben aus den Bakterienzellen und aus den Kulturüberständen der *P. micra*-Wildstämmen hergestellt. Als negative Kontrolle diente ein Wildstamm der Spezies *A. naeslundii*. Als negative Kontrolle wurde außerdem 24 h inkubiertes pures Flüssigmedium verwendet. Die Proben aus Bakterienzellen und Überständen wurden entsprechend dem Vorgehen im Versuch zur DNase-Aktivität der *Prevotella*-Wildstämmen hergestellt und dann bei -20°C 24 h lang eingefroren.

3.7.2 Messung der Chymotrypsinaktivität mittels chromogenem Peptid

Zur Messung der Chymotrypsinaktivität wurde N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-N-nitroanilid als chromogenes Peptid verwendet (Grenier und Bouclin, 2006). Abbildung 15 zeigt die Struktur des Moleküls. N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-N-nitroanilid

($C_{30}H_{36}N_6O_9$, 624,6 g/mol, N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-N-nitroanilid, Sigma-Aldrich) ist ein Substrat für Alpha-Chymotrypsin und fungale Chymotrypsin-artige Serinprotease. Durch enzymatische Spaltung entsteht 4-Nitroanilin, das für eine Gelbfärbung sorgt.

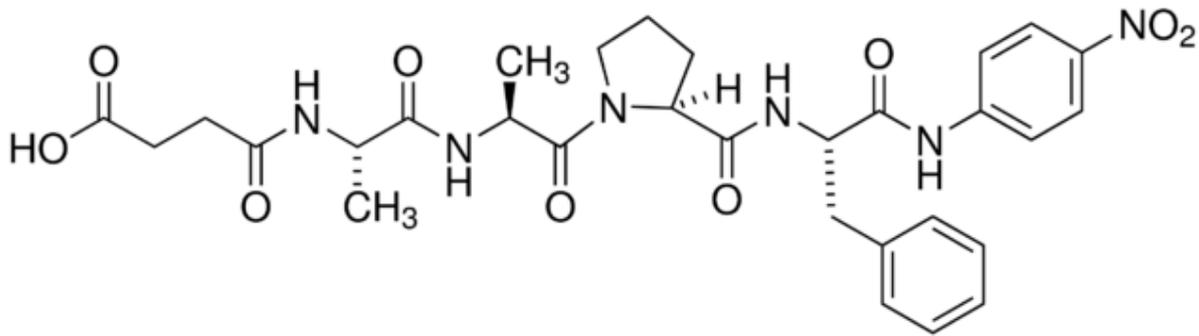


Abbildung 13: Strukturformel von N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-N-nitroanilid

Für die Untersuchung wurde eine 4,31 mM N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-N-nitroanilid Peptidlösung mit PBS hergestellt. Das Rezept dazu findet sich in Anhang 12.3. Als positive Kontrolle diente Alpha-Chymotrypsin von Rinderpankreas (α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas Typ II, Lyophilisiertes Puder, ≥ 40 Units/mg Protein, Sigma-Aldrich). Eine Einheit Alpha-Chymotrypsin hydrolisiert bei pH 7,8 und 25°C pro min 1,0 μ mol N-Benzoyl-L-tyrosin-ethylester. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde 5 mg gefriergetrocknetes Alpha-Chymotrypsin von Rinderpankreas in 330 μ l 1 mM HCL-CaCl₂-Lsg gelöst. Das Rezept der 1 mM HCL-CaCl₂-Lsg findet sich in Anhang 12.3. Nach dem Auftauen wurden die Proben aus Überständen zweimal mit PBS gewaschen.

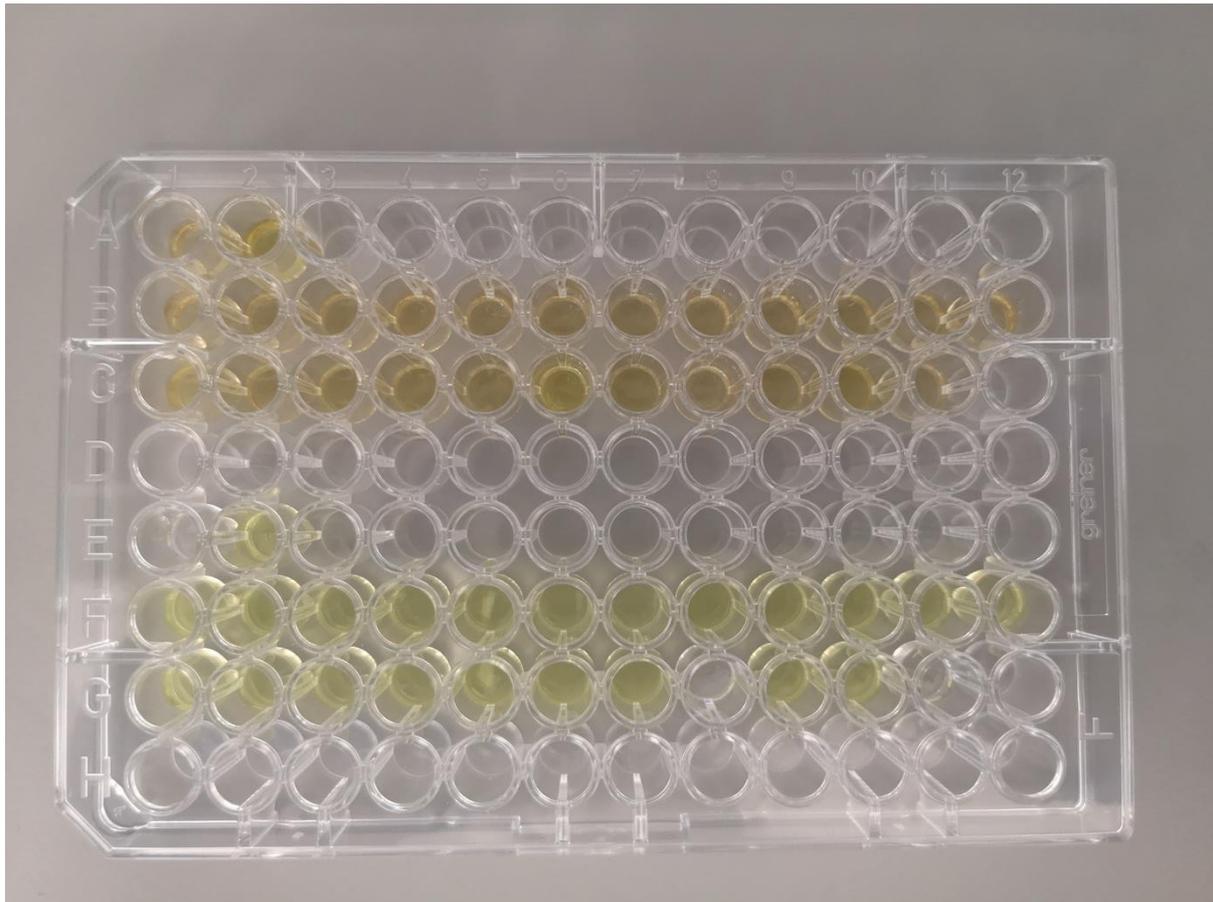


Abbildung 14: Chymotrypsinaktivität von 24 Stunden inkubierten Bakterienproben aus Überständen (B1-C11) und aus Bakterienzellen (F1-G11), negative Kontrolle Überstand (A1), negative Kontrolle Bakterienzellen (E1) und positive Kontrolle Überstand (A2) und positive Kontrolle Bakterienzellen (E2)

Je 100 μ l der Bakterienproben aus Überständen bzw. aus Bakterienzellen sowie die positiven und negativen Kontrollen wurden mit 20 μ l Peptidlösung versetzt und in einem Reagiergefäß bei 37°C im Wärmeschrank 24 h lang inkubiert. Auf gleiche Weise wurden die Proben aus Bakterienzellen eine Stunde lang inkubiert. Danach wurden die Lösungen bei 8°C und 14000 rpm 15 min lang zentrifugiert, um die Bakterienzellen in den Lösungen zu separieren. Die Extinktion infolge der chromogenen Reaktion wurde dann mittels Photometer bestimmt. Hierfür wurden je 100 μ l der inkubierten Proben in eine klare 96-Well-Platte pipettiert. Abbildung 16 zeigt die 96-Well-Platte mit den inkubierten Proben. Die Gelbfärbung der Proben ist Anzeichen der positiven Reaktion durch das chromogene Peptid. Der Versuch wurde in 3 unabhängigen Versuchsdurchläufen wiederholt.

3.7.3 Messung der Elastaseaktivität mittels chromogenem Peptid

Für die Enzymaktivität wurde N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide als chromogenes Peptid verwendet (Grenier und Bouclin, 2006). Abbildung 17 zeigt die Struktur des Moleküls. N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid (N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide, elastase substrate, $C_{19}H_{25}N_5O_8$, 451,4 g/mol, Sigma-Aldrich) ist ein Substrat für Pankres-Elastase.

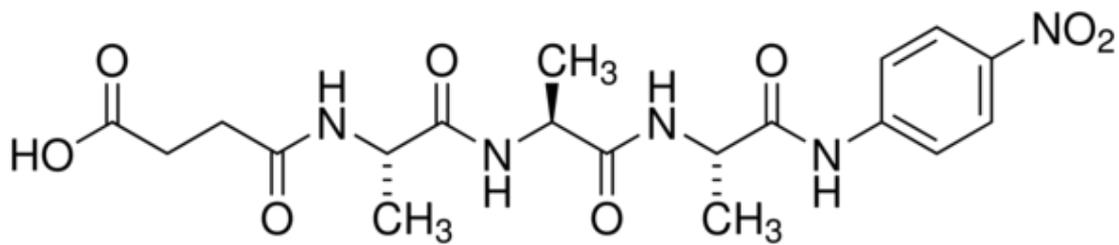


Abbildung 15: Strukturformel von N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid

Für den Versuch wurde mit Tris-Puffer eine 4,31 mM N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid Peptidlösung hergestellt. Das Rezept dazu findet sich in Anhang 12.3. Als positive Kontrolle diente Elastase aus Schweinepankreas (Elastase aus Schweinepankreas Zyp I, $\geq 4,0$ Units/mg Protein, Sigma-Aldrich). Eine Einheit hydrolisiert bei pH-Wert von 8,0 und 25°C pro min 1,0 μmol N-Succinyl-L-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilid.

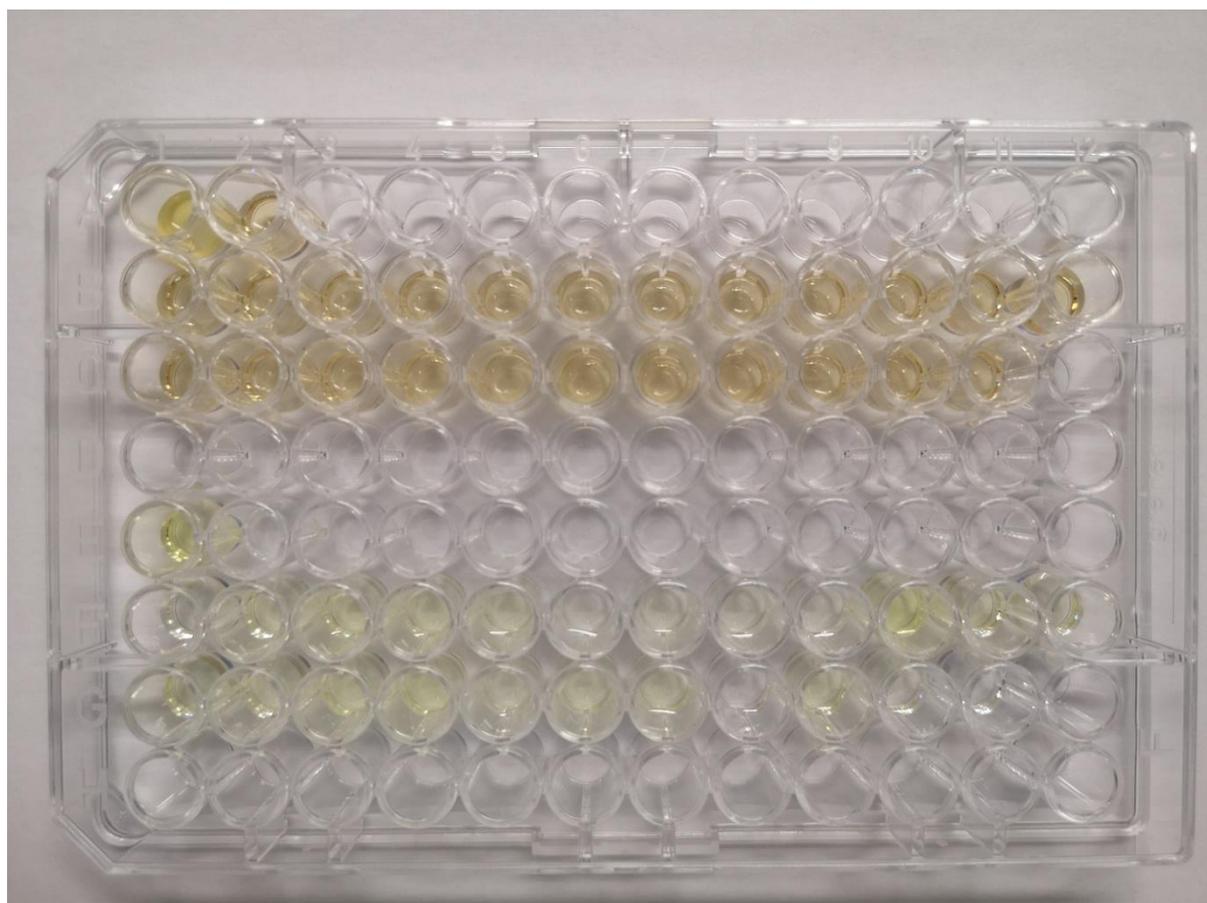


Abbildung 16: Elastaseaktivität von 24 Stunden inkubierten Bakterienproben aus Überständen (B1-C11) und Bakterienzellen (F1-G11), negative Kontrolle Überstand (A1), negative Kontrolle Bakterienzellen (E1) und positive Kontrolle Überstand (A2) und positive Kontrolle Bakterienzellen (E2)

Analog zu dem Versuch zur Chymotrypsinaktivität wurden je 100 μ l der Bakterienproben, der negativen Kontrollen und der positiven Kontrollen mit 20 μ l Peptidlösung 24 h lang inkubiert. Dann wurde die Extinktion mittels Mikroplattenreader bestimmt. Abbildung 18 zeigt die für 24 h inkubierten Proben in der 96-Well-Platte. Die leichte Gelbfärbung der Proben lässt bereits die positive Reaktion mit dem chromogenen Peptid erkennen. Der Versuch zur Elastaseaktivität wurde in drei unabhängigen Versuchsdurchläufen wiederholt.

3.8 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung wurde mit einer Statistik-Software (SPSS, Version 27, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte zunächst deskriptiv in Säulendiagrammen mit Mittelwert und Standardabweichung. Im Anschluss erfolgte die analytische Statistik. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mittels Levene-Test auf Varianzhomogenität getestet. Das Signifikanzniveau für die statistischen Tests wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Da die

Voraussetzungen der Normalverteilung und der Varianzhomogenität für die Varianzanalyse nicht gegeben waren, wurde der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Die im Kruskal-Wallis-Test ermittelten Unterschiede wurden mit dem Dunn's-Test als Post-Hoc-Test spezifiziert. Um die Ergebnisse zweier Variablen auf lineare Zusammenhänge zu testen, wurde die Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 DNase-Aktivität von Wildstämmen der Gattung *Prevotella*

Der Versuch zur DNase-Aktivität auf DNA-Agarplatten ergab, dass alle 13 getesteten Wildstämmen der Gattungen *Prevotella*, *Segatella* und *Hoylesella* in der Lage waren, DNA abzubauen. Abbildung 19 zeigt die Mittelwerte der gemessenen Flächen des DNA-Abbaus auf den DNA-Agarplatten der einzelnen Wildstämmen in einem Säulendiagramm.

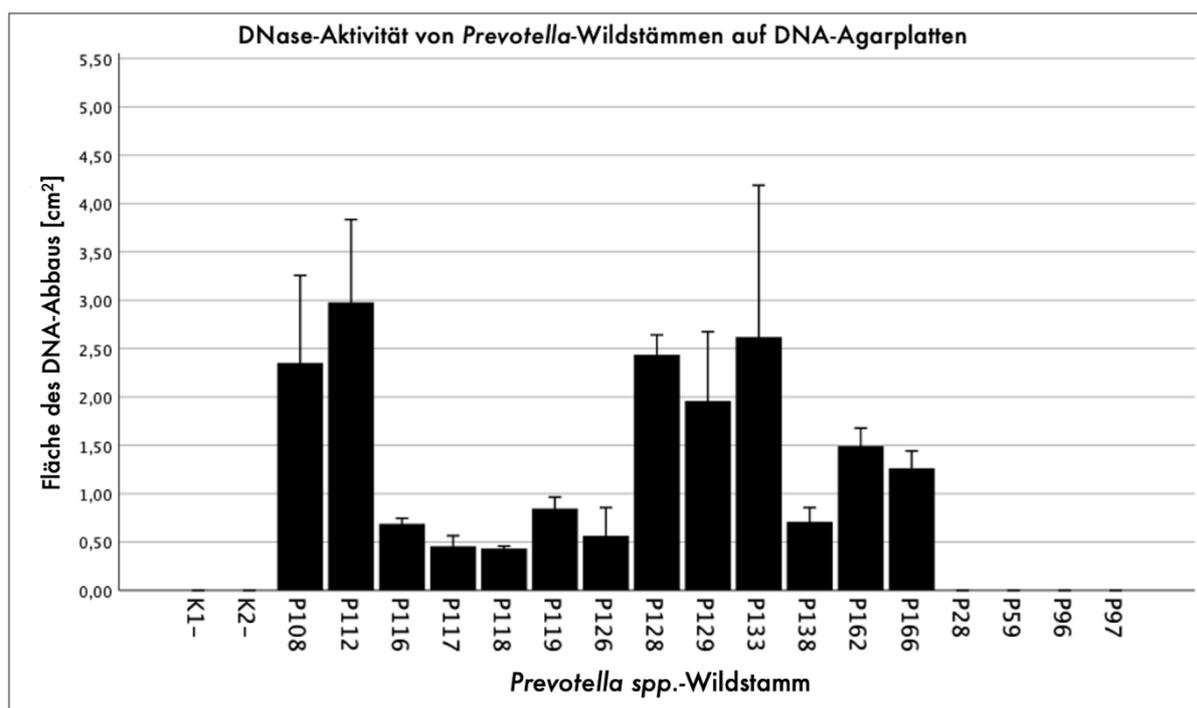


Abbildung 17: Mittelwerte der Flächen des DNA-Abbaus auf DNA-Agarplatten der negativen Kontrollproben (K1-, K2-), der Wildstämmen der Gattung *Prevotella*, *Segatella* und *Hoylesella* (P108 - P166) und der Kontrollstämmen (P28, P59, P96, P97)

Bei den Kontrollstämmen der Gattung *Fusobacterium* und *Parvimonas*, P28 bis P97, war kein Abbau auf den DNA-Agarplatte erkennbar. Somit betragen die dort abgebauten Flächen im Mittel jeweils 0 cm². Die Wildstämmen P112, P133 und P128

zeigten im Mittel den größten Abbau, die Wildstämme P118, P117 und P126 den geringsten Abbau an DNA.

Für die statistische Tests auf Normalverteilung, Varianzhomogenität und Mittelwertsunterschiede bilden die Messwerte jedes Wildstamms, jedes Kontrollstamms und jeder negative Kontrollprobe eine eigene Gruppe.

Der Test der einzelnen Gruppen auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk ergab bei 10 der 19 Gruppen ein eine Normalverteilung. Die Prüfung der Gruppen auf Varianzhomogenität mittels Levene-Test ergab keine Varianzhomogenität der einzelnen Gruppen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte signifikante Unterschiede der Mittelwerte des DNA-Abbaus jedes Wildstamms zwischen den einzelnen Gruppen. Die Einzelvergleiche einer Gruppe mit einer negativen Kontrollprobe waren im Dunn's-Test mit Bonferroni-Korrektur bei allen Wildstämmen nicht signifikant. Die entsprechenden Daten des Shapiro-Wilk-Test, Levene-Test, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's-Test sind im Anhang 12.4 beigefügt. Folglich unterscheiden sich die Messwerte des DNA-Abbaus der einzelnen Wildstämme statistisch nicht signifikant von den gemessenen Werten der negativen Kontrollprobe K1-. Dies wird auf die hohe Zahl der Einzelvergleiche zurückgeführt, wodurch bei der Anpassung des Signifikanzniveaus mit der Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau stark korrigiert wird. (Cabin und Mitchell, 2000)

Die Ergebnisse der DNase-Aktivität auf DNA-Agarplatten sind in Tabelle 2 dargestellt.

| Spezies | Wildstamm | Anzahl der getesteten Stämme | Anzahl der Stämme mit DNase-Aktivität |
|----------------------|------------------------------|-------------------------------------|--|
| <i>P. nigrescens</i> | P108, P128, P129, P133 | 4 | 4 |
| <i>S. baroniae</i> | P112 | 1 | 1 |
| <i>S. buccae</i> | P116 | 1 | 1 |
| <i>P. denticola</i> | P117, P118, P119, P162, P166 | 5 | 5 |
| <i>H. loescheii</i> | P126 | 1 | 1 |
| <i>S. salivae</i> | P138 | 1 | 1 |
| | | Gesamt: 13 | Gesamt: 13 |
| <i>F. naviforme</i> | P28 (Kontrollstamm) | 1 | 0 |

| | | | |
|--------------------------|---------------------------|-----------|------------------|
| <i>Fusobacterium</i> sp. | P59 (Kontrollstamm) | 1 | 0 |
| <i>P. micra</i> | P96, P97 (Kontrollstämme) | 2 | 0 |
| | | Gesamt: 4 | Gesamt: 0 |

Tabelle 2: Ergebnis DNase-Aktivität der Wildstämme auf DNA-Agarplatten

Im Versuch zur DNase-Aktivität in DNA-Lösung konnte ebenfalls bei den 13 getesteten Wildstämmen ein Abbau von DNA nachgewiesen werden. Sowohl in den aus Bakterienzellen gewonnenen Proben als auch in den Proben aus Überständen wanderte die visualisierte DNA in der Elektrophorese weiter als die DNA der negativen Kontrollproben. Abbildung 20 stellt die Wanderweiten der visualisierten DNA bei der Elektrophorese einschließlich Mittelwerten und Standardabweichungen in einem gruppierten Säulendiagramm dar. Die schwarzen Balken zeigen die Werte der aus Bakterienzellen gewonnenen Proben und die grauen Balken die der Proben aus Überständen.

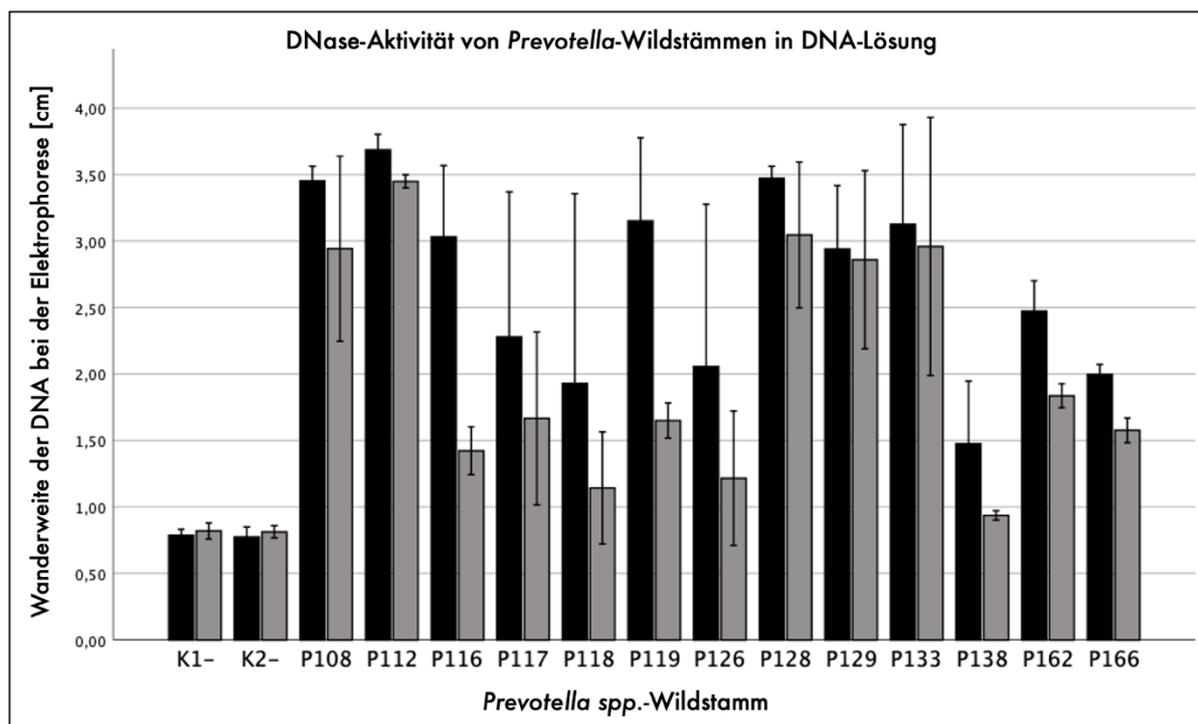


Abbildung 18: Mittelwerte der gewanderten Strecke der DNA bei der Elektrophorese für die Proben aus Bakterienzellen (schwarz) und Überständen (grau). Negative Kontrollproben (K1-, K2-) und *Prevotella*, *Segatella* und *Hoyleseella*-Wildstämme (P108 – P166).

Die Stämme mit den höchsten Werten in den Proben aus Bakterienzellen und Überständen sind P 112, P128 und P108. Die Stämme mit den im Mittel niedrigsten Werten sind für die Proben aus Bakterienzellen P138, P118 und P166, für die Proben aus Überständen P138, P118 und P126.

Für die statistische Analyse von Normalverteilung, Varianzhomogenität und Unterschiede der Mittelwerte bei den Proben aus Bakterienzellen bilden die Messwerte jedes Wildstamms und jeder negativen Kontrollprobe eine eigene Gruppe. Bei den Proben aus Überständen besteht dieselbe Einteilung.

Der Test der einzelnen Gruppen auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ergab für die Proben aus Bakterienzellen bei 13 der 15 Gruppen, und für die Proben aus Überständen bei 14 der 15 eine Normalverteilung. Die Prüfung auf Varianzhomogenität mittels Levene-Test ergab bei den Proben aus Bakterienzellen und bei den Proben aus Überständen keine Varianzhomogenität. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte für die Proben aus Bakterienzellen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen. Die Einzelvergleiche einer Gruppe mit einer negativen Kontrollprobe mittels Dunns-Test mit Bonferroni-Korrektur waren bei den Proben aus Bakterienzellen für alle Gruppen nicht signifikant. Folglich unterscheiden sich die Messwerte des DNA-Abbaus der einzelnen Wildstämme statistisch nicht signifikant von den gemessenen Werten der negativen Kontrollprobe K1- oder K2-. Eine Tabelle mit den entsprechenden Daten von Shapiro-Wilk-Test, Levene-Test, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's-Test ist dem Anhang 12.4 beigelegt.

Bei den Proben aus Überständen zeigte der Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Wildstämme. Die nachfolgenden Einzelvergleiche eines Wildstamms mit einer Kontrollprobe im Dunn's-Test und Bonferroni-Korrektur waren bei allen Gruppen nicht signifikant. Auch hier unterscheiden sich die Messwerte des DNA-Abbaus der einzelnen Wildstämme statistisch nicht signifikant von den gemessenen Werten der negativen Kontrollprobe K1- oder K2-. Eine Tabelle mit den entsprechenden Daten von Shapiro-Wilk-Test, Levene-Test, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Test ist dem Anhang 12.4 beigelegt. Dass die Ergebnisse für die Proben aus Bakterienzellen und Überständen im Dunn's-Test nicht signifikant sind, wird auf die hohe Zahl der Einzelvergleiche zurückgeführt. Hierdurch wird bei der Anpassung des Signifikanzniveaus mit der Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau stark korrigiert (Cabin und Mitchell, 2000).

Die Ergebnisse des Versuchs zur DNase-Aktivität in DNA-Lösung sind in Tabelle 3 dargestellt.

| Bakterienart | Wildstamm | Anzahl der getesteten Stämme | Anzahl der Stämme mit DNase-Aktivität, Proben Bakterienzellen | Anzahl der Stämme mit DNase-Aktivität, Proben Überstände |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|---|--|
| <i>P. nigrescens</i> | P108, P128, P129, P133 | 4 | 4 | 4 |
| <i>S. baroniae</i> | P112 | 1 | 1 | 1 |
| <i>S. buccae</i> | P116 | 1 | 1 | 1 |
| <i>P. denticola</i> | P117, P118, P119, P162, P166 | 5 | 5 | 5 |
| <i>H. loescheii</i> | P126 | 1 | 1 | 1 |
| <i>S. salivae</i> | P138 | 1 | 1 | 1 |
| | | Gesamt: 13 | Gesamt: 13 | Gesamt: 13 |

Tabelle 3: Ergebnis DNase-Aktivität in DNA-Lösung

Vergleicht man die Messwerte der Proben aus Bakterienzellen mit den Proben aus Überständen im Säulendiagramm in Abb. 20, zeigen alle Wildstämme höhere Werte bei den Proben aus Bakterienzellen. Im Gegensatz dazu haben die Negativkontrollen K1- und K2- bei den Proben aus Bakterienzellen geringere Werte als bei den Proben aus Überständen. Des Weiteren zeigen die Wildstämme mit den höchsten Messwerten bei den Proben aus Bakterienzellen auch die höchsten Messwerte bei den Proben aus Überständen.

Die statistische Analyse auf lineare Zusammenhänge dieser beiden Gruppen ergab folgendes. Der Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ergab für die Messwerte bei der DNase-Aktivität auf DNA-Agarplatten, bei der DNase-Aktivität in DNA-Lösung bei Proben aus Bakterienzellen und bei der DNase-Aktivität in DNA-Lösung bei Proben aus Überständen keine Normalverteilung. Die Rangkorrelation nach Spearman der Variable „DNase-Aktivität in DNA-Lösung der Proben aus Bakterienzellen“ und der Variable „DNase-Aktivität in DNA-Lösung der Proben aus Bakterienzellen“ ergab eine gleichsinnige signifikante Korrelation mit starkem Effekt zwischen diesen beiden Variablen (Cohen, 1992). Die Rangkorrelation nach Spearman zwischen „DNase-Aktivität der Prevotella-Wildstämme aus Überständen“ und „DNase-Aktivität der Prevotella-Wildstämme auf DNA-Agarplatten“ ebenfalls eine gleichsinnige signifikante Korrelation mit starkem Effekt der beiden Variablen (Cohen,

1992). Die Testergebnisse zu Shapiro-Wilk-Test und Rangkorrelation nach Spearman sind dem Anhang 12.4 beigefügt.

4.2 FadA-Gen bei Wildstämmen der Gattung *Fusobacterium*

Beim Versuch des FadA-Nachweises wurde bei allen 31 getesteten *Fusobacterium*-Wildstämmen in allen Versuchsdurchläufen ein Genabschnitt in Größe von 232 Basenpaaren in der Elektrophorese nachgewiesen. Bei den beiden negativen Kontrollproben zeigte die Elektrophorese dagegen keine amplifizierte DNA. Dies dokumentiert die Abbildung 12 im Methodenteil dieser Arbeit photographisch. Somit wurde bei allen 31 getesteten Wildstämmen der Gattung *Fusobacterium* der gesuchte Genabschnitt von FadA gefunden. Der Genabschnitt wurde bei 22 Wildstämmen der Spezies *F. nucleatum*, zwei Wildstämmen der Spezies *F. naviforme*, einem Wildstamm der Spezies *F. canifelinum* und 6 weiteren Wildstämmen der Gattung *Fusobacterium* nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

| Bakterienart | Wildstamm | Anzahl der getesteten Stämme | Anzahl der Stämme mit amplifizierten FadA Genabschnitt |
|--------------------------|---|------------------------------|--|
| <i>F. naviforme</i> | P28, P29 | 2 | 2 |
| <i>F. canifelinum</i> | P165 | 1 | 1 |
| <i>F. nucleatum</i> | P30, P33, P34, P35, P37, P38, P39, P41, P42, P43, P44, P45, P46, P47, P50, P51, P53, P54, P55, P61P161, P171, | 22 | 22 |
| <i>Fusobacterium</i> sp. | P57, P58, P59, P60, P63, P64 | 6 | 6 |
| | | Gesamt: 31 | Gesamt: 31 |

Tabelle 4: Ergebnis FadA-Nachweis

4.3 Chymotrypsin- und Elastaseaktivität von Wildstämmen der Spezies *P. micra*

Beim Versuch zur Chymotrypsinaktivität zeigten 21 der 22 getesteten *P. micra*-Wildstämmen nach 24 Stunden Inkubation einen Abbau des chromogenen Peptids, sowohl in den Proben aus Bakterienzellen als auch in den Proben aus Überständen. So wurden bei allen *P. micra*-Wildstämmen, bis auf P104, erhöhte Werte der optischen

Dichte im Vergleich zur negativen Kontrolle gemessen. Der Kontrollstamm *A. naeslundii* wies lediglich in der Probe aus Bakterienzellen einen erhöhten Wert auf.

Abbildung 21 zeigt die Mittelwerte der gemessenen Werte der optischen Dichte mit Mittelwert und Standardabweichung im Säulendiagramm nach Inkubation mit dem chromogenen Peptid. Die schwarzen Balken zeigen die Werte der Proben aus Bakterienzellen, die grauen Balken die Werte der Proben aus Überständen. K+ ist die positive Kontrollprobe, K- die negative Kontrollprobe und A.n. der Kontrollstamm *A. naeslundii*.

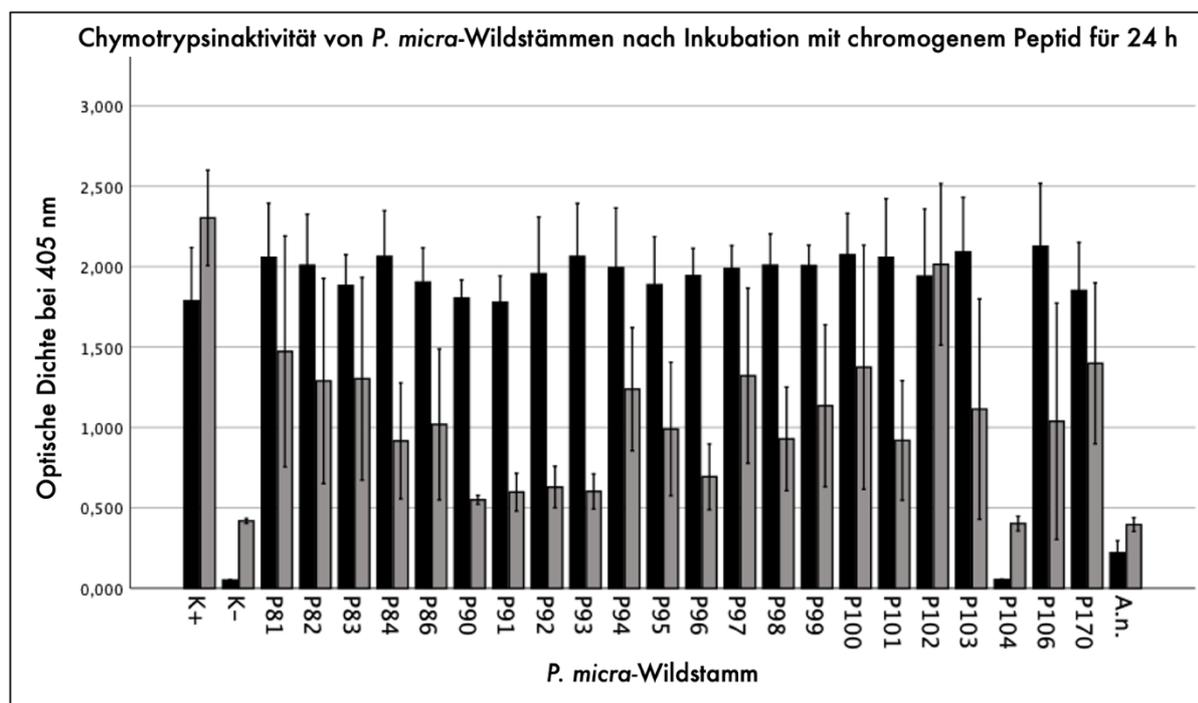


Abbildung 19: Mittelwerte der Chymotrypsinaktivität der *P. micra*-Wildstämmen nach 24 Stunden Inkubation mit chromogenem Peptid von den Proben der Bakterienzellen (schwarz) und den Proben der Überstände (grau). Positive Kontrolle (K+), Negative Kontrolle K-, *P. micra*-Wildstämmen (P81 - 170) und Kontrollstamm (A.n.).

Die *P. micra*-Wildstämmen mit den im Mittel höchsten Werten sind die aus Bakterienzellen gewonnenen Proben von P106, P103 und P100 und die Proben aus Überständen von P102, P81 und P170. Die Wildstämmen mit den im Mittel niedrigsten Werten sind bei den Proben aus Bakterienzellen P104, P90 und P170 und bei den Proben aus Überständen P104, P90 und P91.

Für die statistische Analyse auf Normalverteilung, Varianzhomogenität und Unterschiede der Mittelwerte bilden bei den Proben aus Bakterienzellen die Messwerte jedes *P. micra*-Wildstamms, jeder Kontrollprobe und des Kontrollstamms eine eigene Gruppe. Auch bei den Proben aus Überständen besteht diese Einteilung.

Der Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ergab für die Proben aus Bakterienzellen bei 20 Gruppen, und für die Proben aus Überständen bei 22 Gruppen eine Normalverteilung. Die Prüfung der Gruppen auf Varianzhomogenität mittels Levene-Test ergab für die Proben aus Bakterienzellen keine Varianzhomogenität, für die Proben aus Überständen Varianzhomogenität. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte für die Proben aus Bakterienzellen signifikante Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Gruppen der Wildstämme. Die Einzelvergleiche der Wildstämme mit der negativen Kontrollprobe waren im Dunn's-Test mit Bonferroni-Korrektur allen Proben aus Bakterienzellen nicht signifikant.

Bei den Proben aus Überständen zeigte der Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede der einzelnen Gruppen. Die Einzelvergleiche zwischen einem Wildstamm und der negativen Kontrollprobe ergab im Dunn's-Test mit Bonferroni-Korrektur ebenfalls keine Signifikanzen bei den Proben aus Überständen. Die nicht signifikanten Ergebnisse bei den Proben aus Bakterienzellen und Überständen im Dunn's-Test sind auf die große Gruppenzahl der Einzelvergleiche zurückzuführen. Hierdurch wird bei der Anpassung des Signifikanzniveaus mit der Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau stark korrigiert (Cabin und Mitchell, 2000). Eine Tabelle mit den entsprechenden Daten ist im Anhang 12.4 angefügt.

Die Ergebnisse des Versuchs zur Chymotrypsinaktivität sind in Tabelle 5 dargestellt.

| Bakterienart | Wildstamm | Anzahl der getesteten Stämme | Anzahl der Stämme mit Chyotrypsin-Aktivität, Proben Bakterienzellen | Anzahl der Stämme mit Chymotrypsin-Aktivität, Proben Überstände |
|----------------------|----------------------|------------------------------|---|---|
| <i>P. micra</i> | P81-P170 | 22 | 21 | 21 |
| | | Gesamt: 22 | Gesamt: 21 | Gesamt:21 |
| <i>A. naeslundii</i> | A.n. (Kontrollstamm) | 1 | 1 | 0 |
| | | Gesamt: 1 | Gesamt: 1 | Gesamt: 0 |

Tabelle 5: Ergebnisse Chymotrypsinaktivität

Im direkten Vergleich sind bei 20 der 22 getesteten *P. micra*-Wildstämme die Werte der Proben aus Bakterienzellen höher als die aus Überständen, wie im Säulendiagramm in Abbildung 21 zu sehen. Im Gegensatz dazu sind die Werte der negativen und positiven Kontrolle bei den Proben aus Überständen höher.

Da sich die Werte der optischen Dichte der Proben der Wildstämme aus Bakterienzellen nach wenigen Stunden Inkubation nicht mehr veränderten, wird davon ausgegangen, dass die chromogenen Peptide zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig abgebaut waren. Das würde eine Verfälschung der unterschiedlichen Maße der Aktivität der einzelnen Stämme bedeuten. Daher wurden für die statistische Auswertung der Korrelation für die Proben aus Bakterienzellen die Werte nach einer Stunde Inkubation herangezogen. Die statistische Analyse auf lineare Zusammenhänge dieser beiden Gruppen ergab folgendes. Für die Messwerte der Chymotrypsinaktivität nach 1 Stunde und nach 24 Stunden Inkubation ergab der Test nach Shapiro-Wilk bei den Proben aus Bakterienzellen keine Normalverteilung. Für die Werte der Chymotrypsinaktivität nach 24 Stunden der Proben aus Überständen zeigte der Test nach Shapiro-Wilk ebenfalls keine Normalverteilung der Messwerte. Die Rangkorrelation nach Spearman der zwei Variablen „Chymotrypsinaktivität nach 24 Stunden der Proben aus Bakterienzellen“ und „Chymotrypsinaktivität nach 24 Stunden der Proben aus Überständen“ zeigte eine gleichsinnige, nicht signifikante Korrelation mit schwachem Effekt der beiden Variablen (Cohen, 1992). Die Rangkorrelation von „Chymotrypsinaktivität nach 1 Stunde bei den Proben aus Bakterienzellen“ und „Chymotrypsinaktivität nach 24 Stunden bei den Proben aus Überständen“ ergab eine gleichsinnige signifikante Korrelation mit starkem Effekt der beiden Variablen (Cohen 1992). Die Daten des Shapiro-Wilk-Tests und der Rangkorrelation sind in Anhang 12.4 angefügt.

Beim Versuch zur Elastaseaktivität zeigten alle 22 getesteten *P. micra*-Wildstämme nach 24 Stunden Inkubation einen Abbau des chromogenen Peptids, allerdings nur in den Proben aus Bakterienzellen. Alle *P. micra*-Wildstämme der Proben aus Bakterienzellen, mit Ausnahme von P104, zeigten im Vergleich zur negativen Kontrollprobe erhöhte Messwerte. Bei den *P. micra*-Proben aus Überständen konnte dagegen nur bei der Probe P102 ein geringfügiger Abbau nachgewiesen werden. Der Kontrollstamm A.n. wies bei den Proben aus Bakterienzellen erhöhte Werte im Vergleich zur negativen Kontrolle auf, nicht aber bei den Proben aus Überständen. Die gemessenen Werte der optischen Dichte sind als Mittelwert und Standardabweichung im Säulendiagramm der Abb. 22 dargestellt. Die schwarzen Balken stellen die Werte der Proben aus Bakterienzellen dar, die grauen Balken die

Werte der Proben aus Überständen. K+ ist die positive Kontrolle, K- die negative Kontrolle und A.n. ist der Kontrollstamm *A. naeslundii*.

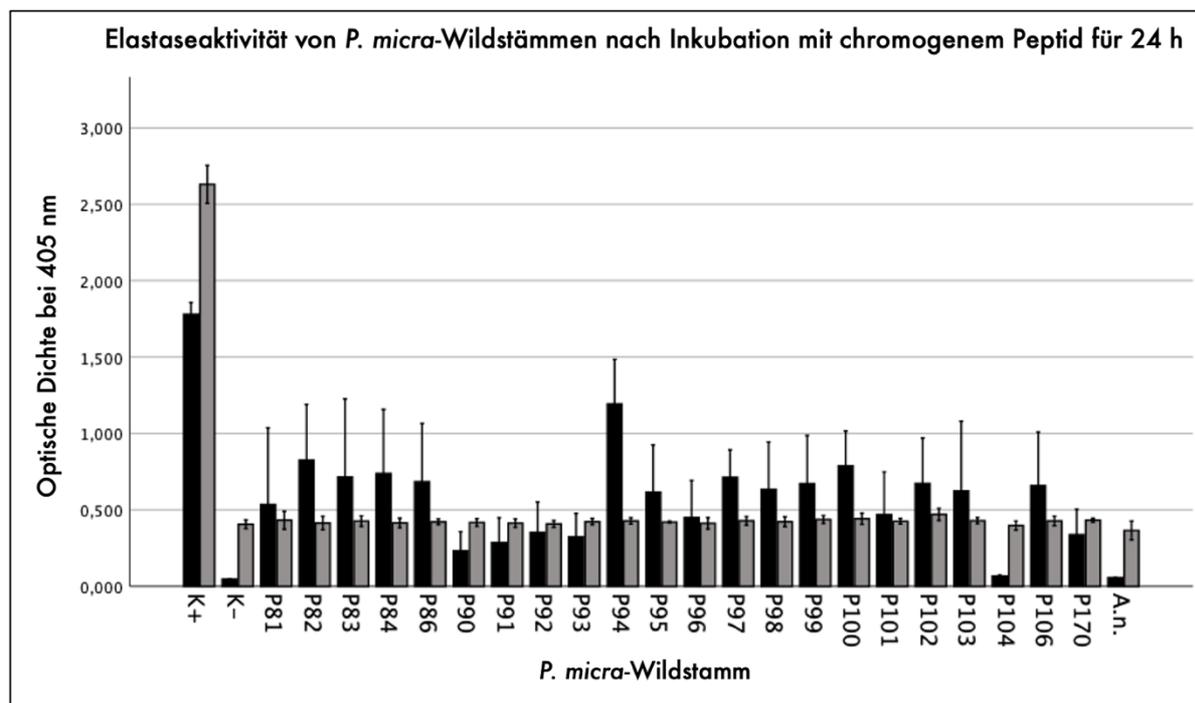


Abbildung 20: Mittelwerte der Elastaseaktivität der *P. micra*-Wildstämme nach 24 Stunden Inkubation mit chromogenem Peptid der Proben aus Bakterienzellen (schwarz) und der Proben aus Überständen (grau). Positive Kontrolle (K+), Negative Kontrolle (K-), *P. micra*-Wildstämme (P81 – P170) und Kontrollstamm (A.n.).

Für die statistische Analyse auf Normalverteilung, Varianzhomogenität und Unterschiede der Mittelwerte bilden bei den Proben aus Bakterienzellen jeder Wildstamm, die positive Kontrollprobe, die negative Kontrollprobe und der Kontrollstamm eine einzelne Gruppe. Diese Einteilung besteht analog bei den Proben aus Überständen.

Der Test auf Normalverteilung in den einzelnen Gruppen mittels Shapiro-Wilk-Test ergab für die Proben aus Bakterienzellen und Überständen bei 24 der 25 Gruppen eine Normalverteilung. Die Prüfung der Gruppen auf Varianzhomogenität mittels Levene-Test ergab für die Proben aus Bakterienzellen und die Proben aus Überständen keine Varianzhomogenität. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte für die Proben aus Bakterienzellen signifikante Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Gruppen. Die Einzelvergleiche eines Wildstamms mit der negativen Kontrollprobe für die Proben aus Bakterienzellen im Dunn's-Test ergaben keine Signifikanzen. Die nicht signifikanten Ergebnisse beim Dunn's-Test für die Proben aus Bakterienzellen werden auf die hohe Zahl der Einzelvergleiche zurückgeführt.

Hierdurch wird bei der Anpassung des Signifikanzniveaus mittels Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau stark korrigiert (Cabin und Mitchell, 2000). Die Daten des Shapiro-Wilk-Tests, des Levene-Tests, Des Kruskal-Wallis-Tests und des Dunn's Tests sind dem Anhang 12.4 beigefügt.

Die Ergebnisse zur Elastaseaktivität der *P. micra*-Wildstämme sind in Tabelle 6 dargestellt.

| Bakterienart | Wildstamm | Anzahl der getesteten Stämme | Anzahl der Wildstämme mit Elastase-Aktivität; Proben Bakterienzellen | Anzahl der Wildstämme mit Elastase-Aktivität; Proben Überstände |
|----------------------|-----------------------|------------------------------|--|---|
| <i>P. micra</i> | P81-P170 | 22 | 21 | 1 |
| | | Gesamt: 22 | Gesamt: 21 | Gesamt: 1 |
| <i>A. naeslundii</i> | A. n. (Kontrollstamm) | 1 | 1 | 0 |
| | | Gesamt: 1 | Gesamt: 1 | Gesamt: 0 |

Tabelle 6: Ergebnisse Elastaseaktivität

Die statistischen Analyse auf lineare Zusammenhänge dieser beiden Gruppen ergab folgendes. Der Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk ergab für die Elastaseaktivität bei den Proben aus Bakterienzellen und aus Überständen nach 24 Stunden jeweils keine Normalverteilung. Die Rangkorrelation nach Spearman ergab zwischen den beiden Variablen Elastaseaktivität und Chymotrypsinaktivität der Proben aus Bakterienzellen nach 24 Stunden eine gleichsinnige nicht signifikante Korrelation mit schwachem Effekt der beiden Variablen (Cohen, 1992). Zwischen der Elastaseaktivität der Proben aus Bakterienzellen nach 24 Stunden und der Chymotrypsinaktivität der Proben aus Bakterienzellen nach 1 Stunde ergab die Rangkorrelation nach Spearman eine gleichsinnige signifikante Korrelation mit starkem Effekt der beiden Variablen (Cohen, 1992). Die Daten für den Shapiro-Wilk-Test und Rangkorrelation nach Spearman sind dem Anhang 12.4 beigefügt.

4.4 Gesamtbilanz

Zusammengefasst wiesen die Versuche zur DNase-Aktivität bei *Prevotella*-Wildstämmen, zum FadA-Nachweis bei *Fusobacterium*-Wildstämmen und zur proteolytischen Aktivität bei *P. micra*-Wildstämmen bei 65 der insgesamt 66 untersuchten Wildstämme den jeweils gesuchten Virulenzfaktor nach. Folglich

besaßen 98,5% der untersuchten Wildstämme den entsprechenden Virulenzfaktor. Diese Ergebnisse werden im folgenden Kapitel diskutiert.

5 Diskussion

Diese Arbeit untersuchte bei einer Vielzahl von Wildstämmen das Vorhandensein von Virulenzfaktoren, die bereits bei einer geringen Zahl von Laborstämmen derselben Spezies nachgewiesen wurden. Dies ist relevant, da sich Wildstämme in ihren Eigenschaften von Laborstämmen derselben Bakterienspezies unterscheiden können. Nachweislich passen sich Bakterienstämme bei wiederholter Subkultivierung den Umweltbedingungen im Labor an. Eine Langzeitstudie namens long-term evolution experiment, (LTEE) analysierte die langjährige Entwicklung von *E. coli*-Laborkulturen. Zu Beginn des Experiments waren zwölf Geschwisterstämme von *E. coli* in ein Glucosemedium transferiert und anschließend fortlaufend subkultiviert worden. Die Langzeitstudie konnte die Adaptation der *E. coli*-Stämme an ihre Umweltbedingungen, das Glucosemedium zeigen. So wuchsen nach 20.000 Generationen die Bakterienstämme um 70% schneller als ihr Ursprungsstamm (Cooper und Lenski, 2000). Auch weitere Studien zeigen eine Adaptation von *E. coli*-Wildstämmen an Laborbedingungen und dies bereits nach kurzer Zeit. Hierbei wurden *E. coli*-Wildstämme für 500 Generationen in Laborkulturen passagiert. Genom- und Proteomanalysen zeigten starke parallele Veränderungen bei voneinander unabhängigen Stämmen, was auf eine Adaptation an die Laborbedingungen schließen ließ. (Saxer *et al.*, 2014). Nicht nur für die Spezies *E. coli* wurde die Adaption an Laborbedingungen gezeigt. So wurden Stämme eines klinischen Isolates der Spezies *S. aureus* 6 Wochen lang täglich passagiert. Auch hier zeigten sich Veränderungen im Phenotyp und Genotyp der Stämme im Laufe ihrer Kultivierung (Somerville *et al.*, 2002). Die Adaptation von Wildstämmen an Laborbedingungen kann auch zu einer Veränderung ihrer Virulenz führen. So konnte in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen Adaptation und Veränderung der Virulenz nachgewiesen werden. In einer Studie wurden ein Laborstamm der Spezies *F. tularensis* und ein Wildstamm miteinander verglichen, die beide demselben Ursprungsstamm entstammten. Der Laborstamm war nach seiner Isolierung über 60 Jahre im Labor subkultiviert worden. Mittels Genomanalyse wurden Veränderungen im Genom des Laborstamms gefunden, die mit der häufigen Subkultivierung des

Laborstamms begründet wurden. Die adaptiven Veränderungen des Laborstammes gingen mit einer abgeschwächter Virulenz des Laborstammes einher (Sjodin *et al.*, 2010). In einer weiteren Studie wurde die Proteinexpression von Wildstämmen und Laborstämmen der Bakterienart *B. anthracis* verglichen. Dabei fand man Mechanismen, die für eine verringerte Sporulation der Laborstämme verantwortlich zu sein schienen. Die Sporenbildung ist bei *B. anthracis* ein entscheidender Virulenzfaktor und spielt eine Schlüsselrolle bei der Infektion des Wirtes. Die festgestellte verringerte Sporulation der Laborstämme wurde mit deren Adaptation an die Laborbedingungen begründet (Leiser *et al.*, 2018). In einer weiteren Studie wurden Wildstämme der Bakterienart *Y. pestis* in 12 unabhängigen Laborkulturen für 750 Generationen passagiert. Mittels Genom- und Proteomanalyse wurden parallele Veränderungen in den unabhängigen Laborkulturen festgestellt, die einen Einfluss auf die Virulenz zu haben schienen. So exprimierten die Laborkulturen weniger Virulenzprotein (Ail), das von *Y. pestis* für die Invasion in die Wirtszelle benötigt wird (Leiser *et al.*, 2015). Es ist jedoch anzumerken, dass für die Durchführung von wissenschaftlichen Studien die Verwendung von Laborstämmen gegenüber Wildstämmen Vorteile hat. Die Laborstämme sind meist leicht erwerbbar und müssen nicht selbstständig und aufwändig von Patienten isoliert werden. Auch sind sie bereits intensiv in ihren genotypischen und phänotypischen Eigenschaften charakterisiert worden. Durch Verwendung derselben Laborstämme können neue Studien an die reproduzierbaren Ergebnisse früherer Studien anknüpfen. Dies ermöglicht die Akkumulierung von Wissen in der Wissenschaft (Dorman und Thomson, 2020).

Diese Arbeit hat extrazelluläre DNase-Aktivität bei einer Vielzahl von parodontalen Wildstämmen der Gattung *Prevotella* nachgewiesen. Auch konnte erstmalig extrazelluläre DNase-Aktivität bei Bakterienstämmen der Spezies *P. nigrescens*, *S. baroniae*, *S. buccae*, *H. loescheii* und *S. salivae* nachgewiesen werden. Die Fähigkeit, extrazellulär DNA abzubauen, wurde bei allen getesteten Stämmen sowohl in deren Proben aus Bakterienzellen als auch in den Proben aus Überständen nachgewiesen. Hieraus wird angenommen, dass DNasen bei den getesteten Wildstämmen sowohl membrangebunden vorliegen als auch sezerniert werden. Dies zuvor konnte bereits für die Laborstämme *P. intermedia* ATC 25611 und *P. melaninogenica* ATCC 25845 gezeigt werden (Palmer *et al.*, 2012). Die statistische Auswertung der Korrelation zwischen zellgebundener und sezernierter DNase-Aktivität eines Stammes zeigt, dass

mit der erhöhten zellgebundenen Aktivität zugleich eine erhöhte sezernierte Aktivität einhergeht. Bei allen hier untersuchten Wildstämmen war die zellgebundene DNase-Aktivität höher als die sezernierte Aktivität. Ein direkter Vergleich der Messwerte ist allerdings nicht möglich, weil die Proben aus Bakterienzellen aus PBS und die Proben aus Überständen aus Kulturmedien unterschiedlich stark konzentriert waren. Um die von den Bakterien sezernierte DNase-Aktivität nachzuweisen, wurden zwei Methoden, nämlich der Nachweis auf DNA-Agarplatten und der Nachweis in DNA-Lösung mit Proben aus Überständen, angewandt und miteinander verglichen. Es zeigte sich eine signifikante gleichsinnige Korrelation mit starkem Effekt. Dies zeigt, dass die unterschiedlich vorliegenden Versuchsbedingungen wenig Einfluss auf das Ausmaß der DNase-Aktivität hatten (Palmer *et al.*, 2012).

Vergleicht man die in dieser Untersuchung bei *Prevotella*-Wildstämmen festgestellte DNase-Aktivität mit der DNase-Aktivität von Laborstämmen derselben Gattung aus anderen Studien, so zeigen sich große Übereinstimmungen, aber auch Unterschiede (Doke *et al.*, 2017; Palmer *et al.*, 2012). Die Laborstämme *P. intermedia* ATC 25611 und *P. melaninogenica* ATCC 25845 zeigten ebenfalls DNase-Aktivität auf DNA-Agarplatten und in DNA-Lösungen, die aus Bakterienzellen und Überständen gewonnen worden waren. Beim Laborstamm *P. denticola* ATCC 35308 wurde DNase-Aktivität jedoch nur auf DNA-Agarplatten nachgewiesen, nicht dagegen in DNA-Lösung. Dieser Unterschied wurde von den Autoren der Studie mit den unterschiedlichen Kulturmethode begründet (Palmer *et al.*, 2012), da die Kulturbedingungen die molekularen und biochemische Eigenschaften des Stamms beeinflussen könnten (Donlan und Costerton, 2002; Mikkelsen *et al.*, 2007). Die hier vorgelegte Arbeit stellte jedoch bei den Wildstämmen keinen Unterschied der DNase-Aktivität bei den beiden unterschiedlichen Kulturmethode fest. Alle fünf hier getesteten Wildstämme der Art *P. denticola* zeigten DNase-Aktivität sowohl auf DNA-Agarplatten als auch in DNA-Lösung auf. Des Weiteren korrelierte das Maß der DNase-Aktivität der Wildstämmen der beiden hier angewandten Methoden stark. Der oben beschriebene Laborstamm *P. denticola* ATCC 35308 stammt von dentaler Plaque und wurde vor dem Jahr 1981 isoliert (Shah und Collins, 1981). Die Isolierung des Laborstamms liegt also viele Jahre zurück. Deshalb ist es denkbar, dass der Keim im Laufe der zahlreichen Subkultivierungen seine Fähigkeit, DNA in Flüssigkultur abzubauen, verloren hat, weil einzelne seiner Gene mutierten. Beispielsweise wurden

für den Laborstamm *P. intermedia* 25611, der DNase-Aktivität auf DNA-Agarplatten und in DNA-Lösung zeigt, zwei Gene identifiziert, die für DNasen kodieren. Diese sind PIN17_A1415 und PIN17_0064. Die exprimierten DNasen von PIN17_A1415 und PIN17_0064 bauten in vitro DNA in Flüssigkultur ab und zerstörten die DNA-Strukturen von Neutrophil extracellular Traps (Doke *et al.*, 2017). Es erscheint vorstellbar, dass durch Mutationen vergleichbarer Gene bei *P. denticola* ATCC 35308 infolge oft wiederholter Subkultivierungen seine DNase-Aktivität in DNA-Lösung beeinträchtigt worden sein könnte. Analog dazu wurde bei anderen Spezies eine Veränderung ihrer Virulenz durch Mutation bestimmter Gene und Verlust der Genfunktion nach häufiger Subkultivierung nachgewiesen (Leiser *et al.*, 2015; Sjodin *et al.*, 2010). Vergleicht man die Ergebnisse der verwendeten Kontrollstämme dieser vorgelegten Untersuchung mit Resultaten aus der Literatur, so bestätigen sich die Ergebnisse. Auch dort zeigten Kontrollstämme der Arten *P. micra* und *F. nucleatum* keine DNase-Aktivität auf DNA-Agarplatten (Palmer *et al.*, 2012).

Kritisch zu bewerten ist, dass sich die Ergebnisse in dieser Arbeit zur DNase-Aktivität der Wildstämme nicht signifikant von denen der negativen Kontrollen unterscheiden. Es konnte jedoch in dem Versuch auf DNA-Agarplatten für die negativen Kontrollproben keine DNase-Aktivität verzeichnet werden, wohingegen die Wildstämme einen deutlichen Abbau, gemessen an der abgebauten Fläche auf der DNA-Agarplatte, zeigten. Auch im Versuch in DNA-Lösung sind die Messwerte der Wildstämmen im Vergleich zu den negativen Kontrollproben deutlich erhöht. Dies zeigen die Stämme mit den geringsten Werten für die Wanderweite in der Gel-Elektrophorese. So sind die Mittelwerte der Proben aus Bakterienzellen von Stamm P138 um 87,3 %, von P118 um 144,3 % und von P166 um 153,2 % höher als der Wert der negativen Kontrollprobe K1-. Bei den Proben aus Überständen sind die Mittelwerte von P138 um 14,6 %, von P118 um 39,0 % und von P126 um 45,1 % höher als die negative Kontrollprobe K1-. Dass die Ergebnisse in beiden Versuchen nicht signifikant sind, wird auf die hohe Gruppenzahl der Einzelvergleiche im Dunn's Test zurückgeführt. Durch die Bonferroni-Korrektur steigt der Wert der angepassten Signifikanz mit der Zahl der Einzelvergleiche im Dunn's Test (Cabin und Mitchell, 2000). Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist, dass es sich um eine in vitro-Studie handelt, in der nicht die exakt selben Bedingungen wie in-vivo bei Parodontitis vorliegen. So lag für die Kultivierung und Untersuchung der Wildstämme idealisierte

Bedingungen bezüglich Nährstoffangebot, Temperatur und Luftfeuchtigkeit vor. Auch wurden die einzelnen Bakterienstämme in diesem Versuchsaufbau als Monokulturen einer Bakterienspezies kultiviert. Dies steht im Gegensatz zu dem oralen Biofilm, in dem gleichzeitig verschiedene Gattungen und Spezies existieren. Die Laborstämme mussten somit nicht mit anderen Bakterienspezies konkurrieren. Auch waren sie nicht wie bei Parodontitis mit der Immunabwehr des Wirts konfrontiert (Fux *et al.*, 2005).

Studien zeigen, dass bakterielle extrazelluläre DNasen die DNA-Strukturen der Neutrophil extracellular traps eines Wirtes abbauen und sich so der Körperabwehr entziehen können. Bei Mäusen mit Sepsis (Meng *et al.*, 2012), Pneumonie (Berends *et al.*, 2010) und nekrotisierender Faszitis führte der Abbau von Neutrophil extracellular traps durch bakterielle DNasen zu einer erhöhten Pathogenität der Keime (Buchanan *et al.*, 2006). Auch bei Parodontitis wurden erhöhte NET-Konzentrationen in parodontalen Taschen nachgewiesen (Vitkov *et al.*, 2009) und NETs werden mit der entzündlichen Abwehr des Wirtes bei der Erkrankung assoziiert (Fine *et al.*, 2016; Kaneko *et al.*, 2018). In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass auch die extrazellulären DNasen der beim Menschen parodontalpathogenen Keimen *P. intermedia*, *P. denticola* und *P. melaninogenica* die Strukturen von Neutrophil extracellular traps abbauen können (Doke *et al.*, 2017; Palmer *et al.*, 2012). Der Nachweis von extrazellulärer DNase-Aktivität bei allen getesteten Wildstämmen der Gattungen *Prevotella*, *Segatella* und *Hoylella* in der vorliegenden Untersuchung lässt den Schluss zu, dass diese Eigenschaft bei parodontalen Wildstämmen der getesteten Spezies *P. nigrescens*, *P. denticola*, *S. baroniae*, *S. buccae*, *S. salivae* und *H. loescheii* verbreitet ist. Dies könnte es parodontalen Keimen der genannten Spezies in vivo, bei Parodontitis ermöglichen Neutrophil extracellular traps abzubauen und sich so diesem Abwehrmechanismus zu entziehen (Palmer *et al.*, 2012). Das würde die Ausbreitung der Keime in der parodontalen Region erleichtern und die parodontale Entzündung fördern (Doke *et al.*, 2017). Weitere Erkenntnisse über die Rolle von extrazellulärer DNasen der Gattung *Prevotella* bei der Pathogenese von Parodontitis könnten Grundlage für potentielle Therapieansätze bieten, die der Entstehung und dem Voranschreiten der Erkrankung entgegenwirken. Um die Rolle von extrazellulären DNasen parodontopathogener Keime bei Parodontitis zu charakterisieren, sind jedoch weitere in vivo Studien notwendig. Die hier vorgelegte Studie bezeugt, dass die extrazelluläre DNase-Aktivität bei parodontalen

Wildstämmen der Gattungen *Prevotella*, *Segatella* und *Hoylesella* vorhanden ist. Die erste Hypothese der vorgelegten Arbeit wurde bestätigt, parodontale Wildstämme der Gattung *Prevotella* sind in der Lage, extrazellulär DNA abzubauen.

Diese Arbeit hat bei einer Vielzahl von Wildstämmen der Gattung *Fusobacterium* den Genabschnitt des *Fusobacterium* Adhäsins A (FadA)-Gens nachgewiesen. Für die Spezies *F. canifelinum* ist dies der erste bekannte Nachweis des Genabschnittes. Beim Vergleich mit Laborstämmen von *F. nucleatum* aus anderen Studien zeigen sich große Übereinstimmungen. So wies eine Untersuchung an 12 von 12 getesteten Stämmen der Spezies *F. nucleatum* FadA nach (Han *et al.*, 2005). Auch eine andere Studie mit *F. nucleatum*-Wildstämmen unterstützt die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit. Dort fand man bei 122 subgingivalen Plaqueproben, in denen *F. nucleatum* nachgewiesen wurde, in 101 Fällen das FadA-Gen (Liu *et al.*, 2014). Ein Unterschied zeigt sich jedoch bei der Spezies *F. naviforme*. In der Studie von Han und Mitarbeitern aus dem Jahr 2005 war der Stamm *F. naviforme* DUMC CF108-1 FadA-negativ, wohingegen in der vorliegenden Untersuchung alle beiden getesteten *F. naviforme*-Wildstämme FadA-positiv waren. *F. naviforme* DUMC CF108-1 stammte jedoch nicht aus der Zahnfleischtasche eines Parodontitispatienten wie die Wildstämme, sondern aus dem Vaginaltrakt einer Patientin mit bakterieller Vaginose. Auch anderen extraoralen Spezies der Gattung *Fusobacterium* fehlte in der Studie der gesuchte Abschnitt von FadA. So waren die beiden Stämme *F. gonidiaformans* DUMC CF65-1 und DUMC CF63-1 FadA-negativ, beide entstammen dem Vaginaltrakt bei bakterieller Vaginose (Han *et al.*, 2004). Die Autoren begründen die Unterschiede in ihrer Studie zwischen den getesteten Spezies der Gattung *Fusobacterium* mit deren unterschiedlicher genetischen Zugehörigkeit und deren unterschiedlichem Ursprungsort. So waren die FadA-positiven Spezies der Studie nahe verwandt mit großen genetischen Übereinstimmungen und hatten denselben Ursprungsort (Han *et al.*, 2005; Lawson *et al.*, 1991). Dies würde auch den Unterschied von *F. naviforme* DUMC CF108-1 und den getesteten *F. naviforme*-Wildstämmen erklären. Auch eine weitere Studie bestätigt diese These. Hier wurden die Genome von 26 Stämmen aus 7 Spezies der Gattung *Fusobacterium* analysiert. Sie bestätigt die genetische Heterogenität innerhalb der Gattung *Fusobacterium* und ordnet die unterschiedlichen Spezies bestimmten Zelllinien innerhalb der Gattung zu. *F. nucleatum* wurde einer Zelllinie zugeordnet, die durch eine Vielzahl von Genen charakterisiert wurden, die für

Oberflächenproteine kodieren. Diese Oberflächenproteine befähigen sie, aktiv in Wirtszellen einzudringen. *F. gonidiiiformans* hingegen wurde einer Zelllinie zugeordnet, die nicht aktiv in Wirtszellen eindringen kann. So fehlte den Spezies dieser Zelllinie Gene für Oberflächenproteine. Auch war deren Genom, das für Oberflächenproteine kodierte, nur halb so groß wie bei der ersten Zelllinie. Die Studie vermutet, dass sich die unterschiedlichen Zelllinien der Gattung *Fusobacterium* durch Adaptationen an verschiedene Umgebungen entwickelten (Manson McGuire *et al.*, 2014).

Studien unterstützen die Rolle von *Fusobacterium* Adhäsion A bei Parodontitis. So untersuchte die klinische Studie von Liu und Kollegen aus dem Jahr 2014 subgingivale Plaqueproben von 30 parodontal Gesunden, 49 Gingivitispatienten und 35 Parodontitispatienten auf das Vorkommen von FadA und *F. nucleatum*. Es konnte in den Proben der Parodontitispatienten vermehrt *F. nucleatum* und das Gen für FadA nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2014). Des Weiteren wurde gezeigt, dass *F. nucleatum*-Laborstämme, die FadA exprimierten, bei Mäusen *in vivo* zu einer höheren Pathogenität bei Parodontitis führte (Meng *et al.*, 2021). Da die hier vorliegende Untersuchung den gesuchten Genabschnitt von FadA bei allen 31 getesteten Wildstämmen der Gattung *Fusobacterium* nachgewiesen hat, liegt der Schluss nahe, dass FadA bei parodontalen Wildstämmen der untersuchten Spezies *F. nucleatum*, *F. naviforme* und *F. canifelinum* verbreitet ist. Auch könnte dies demnach bedeuten, dass FadA eine wichtige Rolle bei Parodontitis spielt (Han *et al.*, 2005). FadA scheint für die Adhäsion von *F. nucleatum* an orale Epithelzellen von großer Bedeutung zu sein. Eine *in-vitro*-Untersuchung zeigte eine um 80% reduzierte Bindungsfähigkeit an orale mukosale Epithelzellen für *Fusobacterium*-Stämme, die nicht das Gen für FadA in sich trugen. (Han *et al.*, 2005) Klinisch ist dieser Virulenzfaktor in dem Sinne von Bedeutung, da die Adhäsion an Epithelzellen bei Parodontitis der erste Schritt für die Kolonisierung der Wirtszellen darstellt. Dies kann es *F. nucleatum* ermöglichen weiter in die Zellen einzudringen und eine entzündliche Reaktion der Wirtszelle auszulösen. Dies wurde bereits in einer *in-vitro*-Studie nachgewiesen. (Han *et al.*, 2000). Somit könnte FadA einen Ansatz für eine Therapie bieten, die der Adhäsion von *F. nucleatum* und der nachfolgenden parodontalen Entzündungsreaktion entgegenwirkt. Allerdings bedarf es klinischen Studien, die die Relevanz des Fad-Adhesins bei der Pathogenese der Parodontitis darstellen. Das

Ergebnis dieser vorgelegten Arbeit ist ein weiterer Beitrag zu diesem Thema und bestätigt seine starke Verbreitung von FadA unter Bakterien der Gattung *Fusobacterium* mit parodontalem Ursprung. Die zweite Hypothese der vorgelegten Arbeit wurde bestätigt, parodontale Wildstämme der Gattung *Fusobacterium* beherbergen das Oberflächenprotein FadA.

Für die in dieser Arbeit getesteten Wildstämme der Spezies *P. micra* wurde bei 21 der 22 getesteten Wildstämmen Chymotrypsinaktivität nachgewiesen. Alle positiv getesteten Stämme zeigten sowohl in den Proben aus Bakterienzellen als auch in den Überständen Chymotrypsinaktivität. Das lässt den Schluss zu, dass chymotrypsinartige Proteasen bei den getesteten Wildstämmen membrangebunden vorliegen und auch sezerniert werden (Grenier und Bouclin, 2006). Die statistische Auswertung der Korrelation von zellgebundener und sezernierter Chymotrypsinaktivität eines Stammes zeigte, dass je höher die zellgebundene Chymotrypsinaktivität ist, desto höher ist auch die sezernierte Chymotrypsinaktivität eines Wildstamms. Im Vergleich war die zellgebundene Chymotrypsinaktivität bei allen Wildstämmen höher als die sezernierte Chymotrypsinaktivität. Ein direkter Vergleich der Messwerte ist jedoch wegen der unterschiedlichen Konzentrationen der Proben aus Bakterienzellen und der Proben aus Überständen nicht möglich. Elastaseaktivität konnte ebenfalls bei 21 der 22 *P. micra*-Wildstämmen nachgewiesen werden. Allerdings war die Elastaseaktivität in den Proben aus Überständen nur bei einem Stamm nachweisbar, und dies nur geringfügig. Eine Verfälschung der Ergebnisse des Stammes durch eine Verunreinigung der Proben oder aufgrund eines Messfehlers lässt sich ausschließen, da die Messwerte in den 3 Versuchsdurchläufen für besagten Wildstamm ähnlich waren. Die Elastaseaktivität bei *P. micra*-Wildstämmen scheint in den meisten Fällen nur zellgebunden vorzuliegen. Verglichen mit der Chymotrypsinaktivität war die zellgebundene Elastaseaktivität der einzelnen Wildstämme geringer als ihre zellgebundene Chymotrypsinaktivität. Die statistische Auswertung der Korrelation von zellgebundener Chymotrypsin- und Elastaseaktivität zeigte eine gleichsinnige signifikante Korrelation mit starkem Effekt. Somit scheinen Wildstämme mit hoher Chymotrypsinaktivität auch eine hohe Elastaseaktivität zu haben.

Vergleichbar den Ergebnissen der in dieser Arbeit getesteten Wildstämme zeigten auch alle 6 in einer anderen Studie getesteten Stämme der Spezies *P. micra*

zellgebundene und sezernierte Chymotrypsinaktivität. Allerdings zeigte keiner der 6 Stämme Elastaseaktivität, wohingegen 21 der 22 *P. micra*-Wildstämme der vorliegenden Untersuchung zellgebundene Elastaseaktivität aufwiesen (Grenier und Bouclin, 2006). Die Stämme *P. micra* HG1252, HG1259, HG1262, HG1251, HG1253 und HG1254 entstammen subgingivalen Plaqueproben von Parodontitispatienten und wurden in den Jahren 1993 (van Dalen *et al.*, 1993) und 1997 gesammelt (Kremer *et al.*, 1997). Ein möglicher Grund für unterschiedliche Elastaseaktivität könnte in der unterschiedlichen Studienmethodik liegen. So wurden die Proben für die Laborstämme für 4 h mit dem chromogenen Peptid inkubiert, die Proben der Wildstämme in der vorliegenden Studie dagegen 24 h lang (Grenier und Bouclin, 2006). Jedoch zeigten in einer anderen Studie parodontale Stämme der Spezies *P. micra* ebenfalls kaum Elastaseaktivität. Nur 2 von 38 getesteten Stämmen hatten Elastaseaktivität, wobei es sich bei den 38 Stämmen um 3 Laborstämme und 35 Wildstämme handelte (Ota-Tsuzuki und Alves Mayer, 2010). Sowohl die in der Studie getesteten Wildstämme (Ota-Tsuzuki und Alves Mayer, 2010) und die beiden Laborstämme stammten aus subgingivalen Plaqueproben (Kremer *et al.*, 1997; van Dalen *et al.*, 1993). Die Ergebnisse zur Elastaseaktivität der *P. micra*-Wildstämme der vorgelegten Arbeit werden jedoch durch eine weitere Studie bestätigt, in der 9 von 18 *P. micra*-Wildstämmen ebenfalls Elastaseaktivität zeigten. Diese Wildstämme stammen aber nicht von subgingivalen Plaqueproben sondern aus der Amnionflüssigkeit. Auch wurde die Elastaseaktivität nicht in Flüssigkultur, sondern auf Agarplatten nachgewiesen (Mikamo *et al.*, 1999). Die Unterschiede der Elastaseaktivität von *P. micra* werden in der Literatur mit den unterschiedlichen Isolierungsorten begründet (Ota-Tsuzuki und Alves Mayer, 2010). Die vorgelegte Untersuchung kann dies jedoch nicht bestätigen, da die hier getesteten Wildstämme aus subgingivalen Plaqueproben von Parodontitispatienten stammen. Die sehr geringe Chymotrypsinaktivität des Kontrollstammes *A. naeslundii* der vorliegenden Untersuchung steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien. Dort wurden proteolytische Aktivitäten bei der Bakterienspezies *A. naeslundii* nicht gefunden (Gajdács und Urbán, 2020).

Kritisch zu bewerten ist, dass sich die Ergebnisse in dieser Arbeit zur Chymotrypsin- und Elastaseaktivität der *P. micra*-Wildstämme nicht signifikant von der jeweiligen negativen Kontrolle K- unterscheiden. Allerdings sind für alle getesteten *P. micra*-

Wildstämme, außer für P104, sind die Mittelwerte der optischen Dichte im Vergleich zur negativen Kontrollprobe K- deutlich erhöht bei der Chymotrypsinaktivität. Dies wird bei den Stämmen mit den niedrigsten Werten deutlich. Die Mittelwerte bei den Proben aus Überständen für P90 sind um 31,3 % und für P91 um 42,7 % höher als die der negativen Kontrollprobe. Der Mittelwert von P104 bei den Proben aus Bakterienzellen ist lediglich um 5,8 % größer, bei den Proben aus Überständen um 3,6 % geringer als die negative Kontrolle. Ebenso bei der Elastaseaktivität sind die Mittelwertsunterschiede deutlich, wie nachfolgend anhand der Stämme mit den geringsten Werten der optischen Dichte demonstriert. Bei den Proben aus Bakterienzellen ist der Mittelwert von P104 um 44,7 %, von P90 um 393,6 % und von P91 um 508,5 % erhöht, verglichen mit der negativen Kontrolle. Die Mittelwerte der *P.-micra*-Proben aus Überständen unterscheiden sich nicht wesentlich von dem der negativen Kontrolle, lediglich die Werte von P102 sind leicht erhöht. Dies wird hier anhand der Stämme mit den höchsten Werten gezeigt. So ist der Mittelwert für P102 um 16 %, für P100 um 8,9 % und für P99 um 7,6 % höher als bei der negativen Kontrolle. Der Mittelwert des Kontrollstammes A.n. ist bei den Proben aus Bakterienzellen 19,1 % höher und bei den Proben aus Überständen 10,1 % geringer als der der negativen Kontrolle. Dass die Ergebnisse in beiden Versuchen nicht signifikant sind, wird auf die hohe Gruppenszahl der Einzelvergleiche im Dunn's Test zurückgeführt. Durch die Bonferroni-Korrektur steigt der Wert der angepassten Signifikanz mit der Zahl der Einzelvergleiche im Dunn's Test (Cabin und Mitchell, 2000). Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist, dass es sich, so wie die vorangehenden Versuche dieser Arbeit auch, um eine in vitro-Studie handelt. Die für die Laborstämme vorliegenden Bedingungen bei der Kultivierung unterscheiden sich somit von den natürlichen Bedingungen im subgingivalen Biofilm bei Parodontitis.

Studien zeigen, dass eine chymotrypsinartige Protease der parodontalpathogenen Spezies *T. denticola* in vitro parodontale Ligamentzellen (Fenno *et al.*, 1998), sowie Bestandteile des parodontalen Halteapparats Laminin und Typ IV-Kollagen abbauen können (Grenier *et al.*, 1990). Auch in vivo wurde eine chymotrypsinartige Protease von *T. denticola* im erkrankten parodontalen Gewebe identifiziert und ihr wird eine aktive Rolle bei der bakteriellen Invasion in parodontales Gewebe zugesprochen (Marttila *et al.*, 2014). Auch die elastolytische Aktivität parodontaler Bakterien scheint bei der Pathogenese von Parodontitis bedeutsam zu sein, denn mit ihrer Elastase

können die Bakterien parodontale Strukturen abbauen (Shibata *et al.*, 1993). Folglich könnten die chymotrypsinartige und elastolytischen Proteaseaktivitäten von *P. micra* ebenfalls eine Rolle bei dem Abbau parodontaler Gewebsstrukturen und der Verbreitung der Keime in parodontales Gewebe haben (Grenier und Bouclin, 2006). Dass in der vorliegenden Untersuchung durchgehend Chymotrypsin- und Elastaseaktivität bei *P. micra*-Wildstämmen nachgewiesen wurde, unterstützt diese Annahme. Um diese Frage zu klären, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, in denen die chymotrypsinartigen und elastolytischen Proteasen der *P. micra*-Wildstämme identifiziert und ihre Rolle bei der Parodontitispathogenese *in vivo* näher untersucht werden. Wie auch für die Gattungen *Prevotella*, *Segatella* und *Hoylesella* und *Fusobacterium* bestand die Relevanz des Versuchs für *Parvimonas* in dieser Arbeit darin, die untersuchten Virulenzfaktoren bei Wildstämmen nachzuweisen. Nach Charakterisierung der Rolle dieser Virulenzfaktoren bei der Pathogenese der Parodontitis in klinischen Studien, könnte dies Grundlage für potenzielle Therapieansätze bieten. Diese vorgelegte Arbeit zeigt eine weite Verbreitung von Chymotrypsin- und Elastaseaktivität unter Wildstämmen der Spezies *P. micra* auf. Die dritte Hypothese der vorgelegten Arbeit wurde bestätigt, Wildstämme der Spezies *P. micra* besitzen Chymotrypsin- und Elastaseaktivität.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es Wildstämme von Parodontitisbakterien auf das Vorhandensein von Virulenzfaktoren zu testen und die mögliche Rolle dieser Virulenzfaktoren bei der Pathogenese der Parodontitis zu diskutieren. Bei Parodontitis lösen parodontopathogene Bakterien mittels krankmachender Eigenschaften, den sog. Virulenzfaktoren Entzündungsreaktionen im parodontalen Gewebe des Wirts aus. Hierdurch resultiert ein fortschreitender Abbau des parodontalen Halteapparats, mit dem letztendlich der Zahn seine Verankerung im Knochen verliert. Die Behandlung von Parodontitis besteht aus der mechanischen Entfernung des subgingivalen Biofilms und der bakteriellen Konkremente. Parodontale Bakterien der Gattungen *Prevotella*, *Fusobacterium* und *Parvimonas* sind im subgingivalen dysbiotischen Biofilm in erhöhter Zahl vorhanden und tragen mit ihren Virulenzfaktoren maßgeblich zu der Entstehung und Progression einer Parodontitis bei. Die in dieser Arbeit getesteten Virulenzfaktoren waren zuvor teils nur an wenigen Laborstämmen der jeweiligen Gattung getestet und nachgewiesen worden. Dies ist kritisch zu betrachten, da sich die Eigenschaften von Laborstämmen im Laufe wiederholter Subkultivierung verändern können. Aufgrund dessen war unklar, in welchem Umfang diese Virulenzfaktoren auch bei Wildstämmen derselben Gattung vorkommen. Die in dieser Arbeit getesteten Virulenzfaktoren waren DNase-Aktivität für die Gattungen *Prevotella*, *Segatella* und *Hoyleseella*, Fusobacterium Adhäsion A (FadA) für die Gattung *Fusobacterium* und die beiden proteolytischen Aktivitäten, Chymotrypsin- und Elastaseaktivität für die Gattung *Parvimonas*. Mittels DNase-Aktivität können Bakterien DNA Strukturen (NETs) von Abwehrzellen des Wirts abbauen, sich so diesem Abwehrmechanismus entziehen und die Progression einer Parodontitis fördern. FadA ist ein Adhäsion, das die Bakterien befähigt Epithelzellen der Gingiva zu besiedeln und so den Entzündungsprozess bei Parodontitis zu fördern. Proteolytische Aktivitäten ermöglichen es Bakterien Bestandteile des parodontalen Gewebes abzubauen und die Schutzbarriere des Gingivaepithels zu durchdringen. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 66 Wildstämme parodontalen Ursprungs der Gattungen *Prevotella*, *Segatella*, *Hoyleseella*, *Fusobacterium* und *Parvimonas* in vitro auf je einen für ihre Gattung charakteristischen Virulenzfaktor untersucht. Es wurden 9 Wildstämme der Gattung *Prevotella*, 3 Wildstämme der Gattung *Segatella* und 1 Wildstamm der Gattung *Hoyleseella* auf ihre DNase-Aktivität, das Vermögen

extrazellulär DNA abzubauen, getestet. Die Testung erfolgte zum einen auf Agar-Kulturplatten, die DNA enthielten und zum anderen in einem flüssigen Nährmedium, das mit DNA inkubiert wurde. 31 Wildstämme der Gattung *Fusobacterium* wurden auf das Vorhandensein von FadA getestet. Für den Nachweis wurde das Genom der *Fusobacterium*-Wildstämme auf ein spezifisches Fragment des FadA-Gens untersucht. Die bakterielle DNA wurde mittels Magna Pure LC-Gerät extrahiert und anschließend in einer PCR mit einem FadA-spezifischen Primer analysiert. 22 Wildstämme der Spezies *P. micra* wurden auf Chymotrypsinaktivität und Elastaseaktivität getestet. Der Nachweis erfolgte mit zwei chromogenen Peptiden, spezifisch für Chymotrypsin- und Elastaseaktivität. Das Ergebnis dieser Arbeit zeigte für alle 13 getesteten Wildstämme der Gattungen *Prevotella*, *Segatella* und *Hoylesella* mit beiden Methoden DNase-Aktivität. Bei allen 31 Wildstämmen der Gattung *Fusobacterium* wurde der gesuchte Genabschnitt von FadA gefunden. Für *P. micra* wurde bei 21 der 22 getesteten Wildstämme Chymotrypsin- und Elastaseaktivität nachgewiesen. Die statistische Auswertung der Ergebnisse von DNase-Aktivität der Wildstämme und proteolytischen Aktivitäten der *P. micra*- Wildstämme zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messwerten der Wildstämme und den entsprechenden negativen Kontrollen ($p > 0,05$). Dies wird auf die hohe Gruppengröße im statistischen Test zurückgeführt, da hierdurch im Dunn's Test mit Bonferroni-Korrektur die Signifikanz stark angepasst wurde. In dieser Arbeit konnte erstmalig extrazelluläre DNase-Aktivität bei Stämmen der Spezies *P. nigrescens*, *S. baroniae*, *S. salivae*, *S. buccae* und *H. loescheii* und nachgewiesen werden. Für die Spezies *F. canifelinum* konnte erstmalig FadA nachgewiesen werden. Insgesamt wurde bei 65 der 66 getesteten Wildstämme der gesuchte Virulenzfaktor gefunden. Die untersuchten Virulenzfaktoren scheinen folglich bei parodontalpathogenen Wildstämmen der jeweiligen Gattung weit verbreitet zu sein. Die hier bei den Wildstämmen in vitro nachgewiesenen Virulenzfaktoren könnten einen neuen Ansatzpunkt für die Parodontitistherapie darstellen, bei dem die bakteriellen Virulenzfaktoren gezielt unterbunden werden. Durch Hemmung der bakteriellen DNase-Aktivität wären Bakterien schutzlos gegen den Abwehrmechanismus der neutrophilen Granulozyten des Wirts und könnten so abgetötet werden. Durch Hemmung des *Fusobacterium* Adhäsins A (FadA) könnte die bakterielle Besiedelung und Invasion in parodontale Gewebszellen verhindert werden. Und durch Hemmung

von proteolytischen Aktivitäten könnte der Abbau von Bestandteilen des parodontalen Gewebes durch Bakterien verhindert werden. All dies könnte der Entstehung und Progression einer Parodontitis entgegenwirken. Es ist naheliegend, dass die hier getesteten Virulenzfaktoren einen ihrem häufigen Vorkommen entsprechenden, bedeutsamen Beitrag bei der Pathogenese der Parodontitis leisten. Diese begründete Annahme bedarf jedoch weiterer Untersuchung. Um die genaue Rolle der drei Virulenzfaktoren bei der Initiation und Progression der Parodontitis zu ergründen, sind nachfolgende in-vivo-Studien an Wildstämmen der Gattungen *Prevotella*, *Segatella*, *Hoylella*, *Fusobacterium* und *Parvimonas* notwendig.

7 Literaturverzeichnis

1. Alfano MC, Chasens AI, Masi CW. Autoradiographic study of the penetration of radiolabelled dextrans and inulin through non-keratinized oral mucosain vitro (1977). *Journal of Periodontal Research* **12**: 368-377.
2. Allenspach-Petrzilka GE, Guggenheim B. Bacteroides melaninogenicus ss. intermedius invasion of rat gingival tissue (1982). *J Periodontal Res* **17**: 456-459.
3. Amano A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis (2010). *Periodontol 2000* **52**: 12-37.
4. Appel W. Chymotrypsin: Molecular and catalytic properties (1986). *Clinical Biochemistry* **19**: 317-322.
5. Armstrong JA, Schulz JR. Agarose Gel Electrophoresis (2015). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* **10**: 7.2.1-7.2.22.
6. Berends ET, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Kockritz-Blickwede M. Nuclease expression by Staphylococcus aureus facilitates escape from neutrophil extracellular traps (2010). *J Innate Immun* **2**: 576-586.
7. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis (2011). *Periodontol 2000* **55**: 36-47.
8. Blow DM. Structure and mechanism of chymotrypsin (1976). *Accounts of Chemical Research* **9**: 145-152.
9. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria (2004). *Science* **303**: 1532-1535.
10. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs (2007). *Nat Rev Microbiol* **5**: 577-582.
11. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J, Nizet V. DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps (2006). *Curr Biol* **16**: 396-400.
12. Budzynski AZ. Chromogenic Substrates in Coagulation and Fibrinolytic Assays (2001). *Laboratory Medicine* **32**: 365-368.
13. Cabin R, Mitchell R. To Bonferroni or Not to Bonferroni: When and How Are the Questions (2000). *Bulletin of the Ecological Society of America* **81**: 246-248.
14. Cergneux M, Andersen E, Cimasoni G. In vitro breakdown of gingival tissue by elastase from human polymorphonuclear leukocytes An electron microscopic study (1982). *Journal of Periodontal Research* **17**: 169-182.
15. Chavrier C. The elastic system fibres in healthy human gingiva (1990). *Archives of Oral Biology* **35**: S223-S225.
16. Chi B, Qi M, Kuramitsu HK. Role of dentilisin in Treponema denticola epithelial cell layer penetration (2003). *Res Microbiol* **154**: 637-643.
17. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood (2007). *Nat Med* **13**: 463-469.
18. Cohen J. A power primer (1992). *Psychol Bull* **112**: 155-159.
19. Cooper VS, Lenski RE. The population genetics of ecological specialization in evolving Escherichia coli populations (2000). *Nature* **407**: 736-739.
20. Dahlen G, Basic A, Bylund J. Importance of Virulence Factors for the Persistence of Oral Bacteria in the Inflamed Gingival Crevice and in the Pathogenesis of Periodontal Disease (2019). *J Clin Med* **8**: 1339.

21. Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis* (1998). *Infect Immun* **66**: 1660-1665.
22. Deng ZL, Sztajer H, Jarek M, Bhuju S, Wagner-Dobler I. Worlds Apart - Transcriptome Profiles of Key Oral Microbes in the Periodontal Pocket Compared to Single Laboratory Culture Reflect Synergistic Interactions (2018). *Front Microbiol* **9**: 124.
23. Doke M, Fukamachi H, Morisaki H, Arimoto T, Kataoka H, Kuwata H. Nucleases from *Prevotella intermedia* can degrade neutrophil extracellular traps (2017). *Mol Oral Microbiol* **32**: 288-300.
24. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms (2002). *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.
25. Dorman MJ, Thomson NR. 'Community evolution' - laboratory strains and pedigrees in the age of genomics (2020). *Microbiology (Reading)* **166**: 233-238.
26. Dorn BR, Leung KL, Progulske-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia* (1998). *Infect Immun* **66**: 6054-6057.
27. Durovic A, Eberhard N, Schären S, Widmer AF. *Parvimonas micra* as a rare cause of spondylodiscitis - case series from a single centre (2020). *Swiss Med Wkly* **150**: 20272.
28. Dzink JL, Gibbons RJ, Childs WC, 3rd, Socransky SS. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells (1989). *Oral Microbiol Immunol* **4**: 1-5.
29. Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases (1994). *Periodontol 2000* **5**: 112-141.
30. Eiring P, Waller K, Widmann A, Werner H. Fibronectin and laminin binding of urogenital and oral *prevotella* species (1998). *Zentralbl Bakteriologie* **288**: 361-372.
31. Eley BM, Cox SW. Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid (2003). *Periodontol 2000* **31**: 105-124.
32. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus (1991). *J Periodontol* **62**: 123-131.
33. Erlich HA. Polymerase chain reaction (1989). *J Clin Immunol* **9**: 437-447.
34. Fenno JC, Hannam PM, Leung WK, Tamura M, Uitto VJ, McBride BC. Cytopathic effects of the major surface protein and the chymotrypsinlike protease of *Treponema denticola* (1998). *Infect Immun* **66**: 1869-1877.
35. Fiebelkorn KR, Lee BG, Hill CE, Caliendo AM, Nolte FS. Clinical evaluation of an automated nucleic acid isolation system (2002). *Clin Chem* **48**: 1613-1615.
36. Fine N, Hassanpour S, Borenstein A, Sima C, Oveisi M, Scholey J, Cherney D, Glogauer M. Distinct Oral Neutrophil Subsets Define Health and Periodontal Disease States (2016). *J Dent Res* **95**: 931-938.
37. Fujiwara N, Kitamura N, Yoshida K, Yamamoto T, Ozaki K, Kudo Y. Involvement of *Fusobacterium* Species in Oral Cancer Progression: A Literature Review Including Other Types of Cancer (2020). *Int J Mol Sci* **21**: 6207.
38. Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, Costerton JW. Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? (2005). *Trends Microbiol* **13**: 58-63.
39. Gajdács M, Urbán E. The Pathogenic Role of *Actinomyces* spp. and Related Organisms in Genitourinary Infections: Discoveries in the New, Modern Diagnostic Era (2020). *Antibiotics (Basel)* **9**: 524.
40. Gamonal J, Bascones A, Jorge O, Silva A. Chemokine RANTES in gingival crevicular fluid of adult patients with periodontitis (2000). *J Clin Periodontol* **27**: 675-681.
41. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction (2013). *J Invest Dermatol* **133**: 1-4.
42. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease (2013). *Periodontology 2000* **62**: 59-94.

43. Gharbia SE, Shah HN. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* subsp. nov. and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *animalis* subsp. nov. as additional subspecies within *Fusobacterium nucleatum* (1992). *Int J Syst Bacteriol* **42**: 296-298.
44. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction (2003). *J Periodontol* **74**: 391-401.
45. Grenier D, Bouclin R. Contribution of proteases and plasmin-acquired activity in migration of *Peptostreptococcus micros* through a reconstituted basement membrane (2006). *Oral Microbiol Immunol* **21**: 319-325.
46. Grenier D, Uitto VJ, McBride BC. Cellular location of a *Treponema denticola* chymotrypsinlike protease and importance of the protease in migration through the basement membrane (1990). *Infect Immun* **58**: 347-351.
47. Guan SM, Shu L, Fu SM, Liu B, Xu XL, Wu JZ. *Prevotella intermedia* induces matrix metalloproteinase-9 expression in human periodontal ligament cells (2008). *FEMS Microbiol Lett* **283**: 47-53.
48. Guan SM, Shu L, Fu SM, Liu B, Xu XL, Wu JZ. *Prevotella intermedia* upregulates MMP-1 and MMP-8 expression in human periodontal ligament cells (2009). *FEMS Microbiol Lett* **299**: 214-222.
49. Gursoy UK, Könönen E, Uitto VJ. Stimulation of epithelial cell matrix metalloproteinase (MMP-2, -9, -13) and interleukin-8 secretion by fusobacteria (2008). *Oral Microbiol Immunol* **23**: 432-434.
50. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later (2017). *Periodontol 2000* **75**: 116-151.
51. Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, Giedlin MA, Mullenbach G, Tekamp-Olson P. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors (1995). *J Immunol* **155**: 1428-1433.
52. Han YW, Ikegami A, Rajanna C, Kawsar HI, Zhou Y, Li M, Sojar HT, Genco RJ, Kuramitsu HK, Deng CX. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria (2005). *J Bacteriol* **187**: 5330-5340.
53. Han YW, Redline RW, Li M, Yin L, Hill GB, McCormick TS. *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth (2004). *Infect Immun* **72**: 2272-2279.
54. Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H, Genco RJ. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells (2000). *Infect Immun* **68**: 3140-3146.
55. Ilijazovic A, Roy U, Galvez EJC, Lesker TR, Zhao B, Gronow A, Amend L, Will SE, Hofmann JD, Pils MC, Schmidt-Hohagen K, Neumann-Schaal M, Strowig T. Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation (2021). *Mucosal Immunol* **14**: 113-124.
56. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption (1990). *The Journal of Immunology* **145**: 3297-3303.
57. Jansen HJ, Grenier D, Van der Hoeven JS. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* (1995). *Oral Microbiol Immunol* **10**: 138-145.
58. Jeffries CD, Holtman DF, Guse DG. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids (1957). *J Bacteriol* **73**: 590-591.
59. Jewett A, Hume WR, Le H, Huynh TN, Han YW, Cheng G, Shi W. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum* (2000). *Infect Immun* **68**: 1893-1898.
60. Ji S, Choi YS, Choi Y. Bacterial invasion and persistence: critical events in the pathogenesis of periodontitis? (2015). *J Periodontal Res* **50**: 570-585.

61. Ji S, Shin JE, Kim YS, Oh JE, Min BM, Choi Y. Toll-like receptor 2 and NALP2 mediate induction of human beta-defensins by fusobacterium nucleatum in gingival epithelial cells (2009). *Infect Immun* **77**: 1044-1052.
62. Johnson JL, Holdeman LV. Bacteroides intermedius comb. nov. and Descriptions of Bacteroides corporis sp. nov. and Bacteroides levii sp. nov (1983). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **33**: 15-25.
63. Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease (2004). *J Periodontol* **75**: 37-43.
64. Jordan AR, Micheelis W. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) (2016). *Deutscher Zahnärzte Verl. DÄV, IDZ-Materialienreihe Bd. 35*: 617.
65. Kaneko C, Kobayashi T, Ito S, Sugita N, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Circulating levels of carbamylated protein and neutrophil extracellular traps are associated with periodontitis severity in patients with rheumatoid arthritis: A pilot case-control study (2018). *PLoS One* **13**: e0192365.
66. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression (2014). *J Dent Res* **93**: 1045-1053.
67. Kato S, Kowashi Y, Demuth DR. Outer membrane-like vesicles secreted by Actinobacillus actinomycetemcomitans are enriched in leukotoxin (2002). *Microb Pathog* **32**: 1-13.
68. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, Barthwal MK, Dikshit M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition (2012). *PLoS One* **7**: e48111.
69. Kilian M. Degradation of immunoglobulins A2, A2, and G by suspected principal periodontal pathogens (1981). *Infect Immun* **34**: 757-765.
70. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR. Basement membrane complexes with biological activity (1986). *Biochemistry* **25**: 312-318.
71. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. Communication among oral bacteria (2002). *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 486-505, table of contents.
72. 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 (1989). *Infect Immun* **57**: 3194-3203.
73. Kook JK, Park SN, Lim YK, Choi MH, Cho E, Kong SW, Shin Y, Paek J, Chang YH. Fusobacterium nucleatum subsp. fusiforme Gharbia and Shah 1992 is a later synonym of Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii Dzink et al. 1990 (2013). *Curr Microbiol* **66**: 414-417.
74. Kremer BH, Herscheid AJ, Papaioannou W, Quirynen M, van Steenberghe TJ. Adherence of Peptostreptococcus micros morphotypes to epithelial cells in vitro (1999). *Oral Microbiol Immunol* **14**: 49-55.
75. Kremer BH, Magee JT, van Dalen PJ, Martijn van Steenberghe TJ. Characterization of smooth and rough morphotypes of Peptostreptococcus micros (1997). *Int J Syst Bacteriol* **47**: 363-368.
76. Kulshrestha D, Siddeshappa S, Biswas J. Role of Immunoglobulin G and A in Periodontitis: A Review (2013). *Journal of Pure and Applied Microbiology* **70**: 673-676.
77. Kumar PS. Microbial dysbiosis: The root cause of periodontal disease (2021). *Journal of Periodontology* **92**: 1079-1087.
78. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis (2003). *J Dent Res* **82**: 338-344.
79. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release (1990). *J Immunol* **144**: 4226-4230.

80. Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption (1998). *Endocrinology* **139**: 1338-1345.
81. Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. The interaction between RTX toxins and target cells (1999). *Trends Microbiol* **7**: 356-361.
82. Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. Porphyromonas gingivalis invasion of gingival epithelial cells (1995). *Infect Immun* **63**: 3878-3885.
83. Lantz MS. Are bacterial proteases important virulence factors? (1997). *J Periodontal Res* **32**: 126-132.
84. Lawson PA, Gharbia SE, Shah HN, Clark DR, Collins MD. Intrageneric relationships of members of the genus Fusobacterium as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA (1991). *Int J Syst Bacteriol* **41**: 347-354.
85. Leiser OP, Blackburn JK, Hadfield TL, Kreuzer HW, Wunschel DS, Bruckner-Lea CJ. Laboratory strains of Bacillus anthracis exhibit pervasive alteration in expression of proteins related to sporulation under laboratory conditions relative to genetically related wild strains (2018). *PLoS One* **13**: e0209120.
86. Leiser OP, Merkley ED, Clowers BH, Deatherage Kaiser BL, Lin A, Hutchison JR, Melville AM, Wagner DM, Keim PS, Foster JT, Kreuzer HW. Investigation of Yersinia pestis Laboratory Adaptation through a Combined Genomics and Proteomics Approach (2015). *PLoS One* **10**: e0142997.
87. Listgarten MA, Lai CH. Comparative ultrastructure of Bacteroides melaninogenicus subspecies (1979). *J Periodontal Res* **14**: 332-340.
88. Liu P, Liu Y, Wang J, Guo Y, Zhang Y, Xiao S. Detection of fusobacterium nucleatum and fadA adhesin gene in patients with orthodontic gingivitis and non-orthodontic periodontal inflammation (2014). *PLoS One* **9**: e85280.
89. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation (1998). *N Engl J Med* **338**: 436-445.
90. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva (2005). *J Clin Periodontol* **32 Suppl 6**: 57-71.
91. Madianos PN, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlén G, Sandros J. Porphyromonas gingivalis FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro (1996). *Infect Immun* **64**: 660-664.
92. Magan-Fernandez A, Rasheed Al-Bakri SM, O'Valle F, Benavides-Reyes C, Abadia-Molina F, Mesa F. Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis (2020). *Cells* **9**: 1494.
93. Mainardi CL, Dixit SN, Kang AH. Degradation of type IV (basement membrane) collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leukocyte granules (1980). *J Biol Chem* **255**: 5435-5441.
94. Malik R, Changela R, Krishan P, Gugrani S, Bali D. Virulence factors of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - A status update (2015). *Journal of the International Clinical Dental Research Organization* **7**: 137-145.
95. Manson McGuire A, Cochrane K, Griggs AD, Haas BJ, Abeel T, Zeng Q, Nice JB, MacDonald H, Birren BW, Berger BW, Allen-Vercoe E, Earl AM. Evolution of invasion in a diverse set of Fusobacterium species (2014). *mBio* **5**: e01864.
96. Marttila E, Jarvensivu A, Sorsa T, Grenier D, Richardson M, Kari K, Tervahartiala T, Rautemaa R. Intracellular localization of Treponema denticola chymotrypsin-like proteinase in chronic periodontitis (2014). *J Oral Microbiol* **6**: 10.3402.
97. Meng Q, Gao Q, Mehrzarin S, Tangwanichgapong K, Wang Y, Huang Y, Pan Y, Robinson S, Liu Z, Zangiabadi A, Lux R, Papapanou PN, Guo XE, Wang H, Berchowitz LE, Han YW. Fusobacterium nucleatum secretes amyloid-like FadA to enhance pathogenicity (2021). *EMBO Rep* **22**: e52891.

98. Meng W, Paunel-Gorgulu A, Flohe S, Hoffmann A, Witte I, MacKenzie C, Baldus SE, Windolf J, Logters TT. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice (2012). *Crit Care* **16**: R137.
99. Merkley ED, Sego LH, Lin A, Leiser OP, Kaiser BLD, Adkins JN, Keim PS, Wagner DM, Kreuzer HW. Protein abundances can distinguish between naturally-occurring and laboratory strains of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague (2017). *PLoS One* **12**: e0183478.
100. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis (2015). *Periodontol 2000* **69**: 7-17.
101. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis (2000). *J Periodontol* **71**: 1699-1707.
102. Micheelis W, Schiffner U. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV) (2006). *Deutscher Zahnärzte Verl. DÄV, IDZ-Materialienreihe Bd. 31*: 502.
103. Mikamo H, Kawazoe K, Sato Y, Tamaya T. Elastase activity of anaerobes isolated from amniotic fluid with preterm premature rupture of membranes (1999). *Am J Obstet Gynecol* **180**: 378-380.
104. Mikkelsen H, Duck Z, Lilley KS, Welch M. Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* (2007). *J Bacteriol* **189**: 2411-2416.
105. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases (1994). *Periodontol 2000* **5**: 66-77.
106. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions (2018). *J Periodontol* **89 Suppl 1**: S17-s27.
107. Murphy EC, Frick IM. Gram-positive anaerobic cocci--commensals and opportunistic pathogens (2013). *FEMS Microbiol Rev* **37**: 520-553.
108. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance (2020). *ScientificWorldJournal* **2020**: 2146160.
109. Ng J, Ng LK, Mayrand D, Dillon JA. Aminopeptidase activities in *Peptostreptococcus* spp. are statistically correlated to gelatin hydrolysis (1998). *Can J Microbiol* **44**: 303-306.
110. Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils (2004). *Immunology* **111**: 273-281.
111. Ota-Tsuzuki C, Alves Mayer MP. Collagenase production and hemolytic activity related to 16S rRNA variability among *Parvimonas micra* oral isolates (2010). *Anaerobe* **16**: 38-42.
112. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work (1976). *Lab Invest* **34**: 235-249.
113. Palkova Z. Multicellular microorganisms: laboratory versus nature (2004). *EMBO Rep* **5**: 470-476.
114. Palmer LJ, Chapple IL, Wright HJ, Roberts A, Cooper PR. Extracellular deoxyribonuclease production by periodontal bacteria (2012). *J Periodontal Res* **47**: 439-445.
115. Pan CQ, Lazarus RA. Ca²⁺-dependent activity of human DNase I and its hyperactive variants (1999). *Protein Sci* **8**: 1780-1788.
116. Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O, Dahlen G. Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression (1997). *J Periodontol* **68**: 651-666.
117. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kerschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions (2018). *J Periodontol* **89 Suppl 1**: S173-s182.

118. Parker H, Albrett AM, Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide (2012). *Journal of Leukocyte Biology* **91**: 369-376.
119. Pelt P, Zimmermann B, Ulbrich N, Bernimoulin JP. Effects of lipopolysaccharide extracted from *Prevotella intermedia* on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts in vitro (2002). *Arch Oral Biol* **47**: 859-866.
120. Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus* (2010). *J Immunol* **185**: 7413-7425.
121. Potempa J, Banbula A, Travis J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses (2000). *Periodontol 2000* **24**: 153-192.
122. Potempa J, Pike R, Travis J. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain (1995). *Infect Immun* **63**: 1176-1182.
123. Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Polymerase chain reaction (1992). *Natl Med J India* **5**: 115-119.
124. Ruan Y, Shen L, Zou Y, Qi Z, Yin J, Jiang J, Guo L, He L, Chen Z, Tang Z, Qin S. Comparative genome analysis of *Prevotella intermedia* strain isolated from infected root canal reveals features related to pathogenicity and adaptation (2015). *BMC Genomics* **16**: 122.
125. Saglie R, Newman MG, Carranza FA, Jr., Pattison GL. Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans (1982). *J Periodontol* **53**: 217-222.
126. Salari MH, Kadkhoda Z. Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic periodontitis (2004). *J Oral Sci* **46**: 157-161.
127. Sapna G, Gokul S, Bagri-Manjrekar K. Matrix metalloproteinases and periodontal diseases (2014). *Oral Diseases* **20**: 538-550.
128. Saxer G, Krepps MD, Merkley ED, Ansong C, Deatherage Kaiser BL, Valovska MT, Ristic N, Yeh PT, Prakash VP, Leiser OP, Nakhleh L, Gibbons HS, Kreuzer HW, Shamoo Y. Mutations in global regulators lead to metabolic selection during adaptation to complex environments (2014). *PLoS Genet* **10**: e1004872.
129. Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease (2006). *Periodontol 2000* **40**: 77-93.
130. Shah HN, Collins MD. *Bacteroides buccalis*, sp. nov., *Bacteroides denticola*, sp. nov., and *Bacteroides pentosaceus*, sp. nov., new species of the genus *Bacteroides* from the oral cavity (1981). *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* **2**: 235-241.
131. Shenker BJ, DiRienzo JM. Suppression of human peripheral blood lymphocytes by *Fusobacterium nucleatum* (1984). *The Journal of Immunology* **132**: 2357-2362.
132. Shibata Y, Fujimura S, Nakamura T. Purification and partial characterization of an elastolytic serine protease of *Prevotella intermedia* (1993). *Appl Environ Microbiol* **59**: 2107-2111.
133. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. Role of *Fusobacterium nucleatum* in Periodontal Health and Disease (2011). *Current Issues in Molecular Biology* **13**: 25-36.
134. Sjodin A, Svensson K, Lindgren M, Forsman M, Larsson P. Whole-genome sequencing reveals distinct mutational patterns in closely related laboratory and naturally propagated *Francisella tularensis* strains (2010). *PLoS One* **5**: e11556.
135. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology (2005). *Periodontol 2000* **38**: 135-187.
136. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque (1998). *J Clin Periodontol* **25**: 134-144.

137. Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald JR, DeLeo FR, Cole RL, Hoff JS, Musser JM. In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence (2002). *J Bacteriol* **184**: 1430-1437.
138. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Konttinen YT, Lindy O, Saari H, Uitto VJ. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases (1992). *Infection and Immunity* **60**: 4491-4495.
139. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mantyla P. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation (2006). *Ann Med* **38**: 306-321.
140. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease (1991). *J Periodontol* **62**: 504-509.
141. Sugiyama A, Uehara A, Iki K, Matsushita K, Nakamura R, Ogawa T, Sugawara S, Takada H. Activation of human gingival epithelial cells by cell-surface components of black-pigmented bacteria: augmentation of production of interleukin-8, granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and expression of intercellular adhesion molecule 1 (2002). *J Med Microbiol* **51**: 27-33.
142. Sundberg MW, Meares CF, Goodwin DA, Diamanti CI. Selective binding of metal ions to macromolecules using bifunctional analogs of EDTA (1974). *J Med Chem* **17**: 1304-1307.
143. Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B, Tärnvik A. Degradation of Human Immunoglobulins G and M and Complement Factors C3 and C5 by Black-Pigmented Bacteroides (1985). *Journal of Medical Microbiology* **19**: 85-94.
144. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures (1992). *Infect Immun* **60**: 4932-4937.
145. Tanabe S, Bodet C, Grenier D. Peptostreptococcus micros cell wall elicits a pro-inflammatory response in human macrophages (2007). *J Endotoxin Res* **13**: 219-226.
146. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis (1995). *J Periodontol* **66**: 852-859.
147. Uitto VJ, Grenier D, Chan EC, McBride BC. Isolation of a chymotrypsinlike enzyme from *Treponema denticola* (1988). *Infect Immun* **56**: 2717-2722.
148. Uitto VJ, Schwartz D, Veis A. Degradation of basement-membrane collagen by neutral proteases from human leukocytes (1980). *Eur J Biochem* **105**: 409-417.
149. Uzel NG, Teles FR, Teles RP, Song XQ, Torresyap G, Socransky SS, Haffajee AD. Microbial shifts during dental biofilm re-development in the absence of oral hygiene in periodontal health and disease (2011). *J Clin Periodontol* **38**: 612-620.
150. van Dalen PJ, van Deutekom-Mulder EC, de Graaff J, van Steenberghe TJM. Pathogenicity of *Peptostreptococcus micros* morphotypes and *Prevotella* species in pure and mixed culture (1998). *Journal of Medical Microbiology* **47**: 135-140.
151. van Dalen PJ, van Steenberghe TJ, Cowan MM, Busscher HJ, de Graaff J. Description of two morphotypes of *Peptostreptococcus micros* (1993). *Int J Syst Bacteriol* **43**: 787-793.
152. Vega BA, Belinka Jr. BA, Kachlany SC. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin (LtxA; Leukothera®): Mechanisms of Action and Therapeutic Applications (2019). *Toxins* **11**: 489.
153. Vitkov L, Klappacher M, Hannig M, Krautgartner WD. Extracellular neutrophil traps in periodontitis (2009). *J Periodontal Res* **44**: 664-672.
154. Wei GX, van der Hoeven JS, Smalley JW, Mikx FH, Fan MW. Proteolysis and utilization of albumin by enrichment cultures of subgingival microbiota (1999). *Oral Microbiol Immunol* **14**: 348-351.

155. White PC, Chicca IJ, Cooper PR, Milward MR, Chapple IL. Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis: A Web of Intrigue (2016). *J Dent Res* **95**: 26-34.
156. Xu M, Yamada M, Li M, Liu H, Chen SG, Han YW. FadA from *Fusobacterium nucleatum* utilizes both secreted and nonsecreted forms for functional oligomerization for attachment and invasion of host cells (2007). *J Biol Chem* **282**: 25000-25009.
157. Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* (2006). *J Periodontol Res* **41**: 554-559.
158. Yanagisawa M, Kuriyama T, Williams DW, Nakagawa K, Karasawa T. Proteinase activity of *Prevotella* species associated with oral purulent infection (2006). *Curr Microbiol* **52**: 375-378.
159. Yilmaz O, Verbeke P, Lamont RJ, Ojcius DM. Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells (2006). *Infect Immun* **74**: 703-710.
160. Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis* (2002). *Cell Microbiol* **4**: 305-314.
161. Yilmaz O, Young PA, Lamont RJ, Kenny GE. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion (2003). *Microbiology (Reading)* **149**: 2417-2426.
162. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis (2013). *Expert Rev Mol Med* **15**: e7.
163. Zappa U, Reinking-Zappa M, Graf H, Espeland M. Cell populations and episodic periodontal attachment loss in humans (1991). *J Clin Periodontol* **18**: 508-515.
164. Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases (1999). *Microb Pathog* **26**: 275-280.

8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Anaerobenbox in Brutschrank (links), noch verschlossene Gaspaks (rechts)..... | 22 |
| Abbildung 2: Kultivierter Wildstamm der Spezies <i>P. micra</i> auf Schaedler-Agarplatte | 23 |
| Abbildung 3: 24 Stunden inkubierte Flüssigkulturen und Kontrolle (K)..... | 24 |
| Abbildung 4: Anaerobe Kammer mit Hauptkammer, Armschleusen und Schleuse.. | 25 |
| Abbildung 5: Inkubierte DNA-Agarplatte mit kreisförmiger Bakterienkultur (mittig) und angrenzend abgebaute DNA (klar), nicht abgebaute DNA auf der Platte (trüb) und beigelegter Größenreferenz (Lineal) | 27 |
| Abbildung 6: Elektrophoresekammer mit positiver Elektrode (rot), negativer Elektrode (schwarz) und Stromquelle (links) und Gelform zum Gießen des Gels (rechts)..... | 30 |
| Abbildung 7: Unter UV-Licht visualisierte DNA-Banden in dem Agarosegel der Bakterienstämme 3. bis 10. Bande von links, negativer Kontrolle (linke Bande) und positiven Kontrollen (acht Banden von rechts) mit Größenreferenz links | 32 |
| Abbildung 8: MagNA Pure LC, Plattform mit positionierten Pipettenspitzen und Einweg-Kunststoffbehältnissen und robotischem Arm (rechts hinten) ... | 33 |
| Abbildung 10: Magna Lyser mit Rotor (links), Green beads Gefäß mit den Keramikperlen (rechts)..... | 34 |
| Abbildung 11: Ablauf PCR (Garibyan und Avashia, 2013) | 36 |
| Abbildung 12: Agarosegel nach Elektrophorese unter Raumlampe (links) und unter UV-Licht (rechts) mit 100 BP DNA-Leiter (je erste Bande von links), negative Kontrollen (vierte Spalte von rechts oben, dritte Spalte von rechts unten) und die getesteten <i>Fusobacterium</i> -Wildstämme (dazwischen liegenden Banden)..... | 38 |
| Abbildung 13: Strukturformel des p-Nitroanilins | 39 |
| Abbildung 15: Strukturformel von N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-N-nitroanilid..... | 40 |
| Abbildung 16: Chymotrypsinaktivität von 24 Stunden inkubierten Bakterienproben aus Überständen (B1-C11) und aus Bakterienzellen (F1-G11), negative Kontrolle Überstand (A1), negative Kontrolle Bakterienzellen (E1) und positive Kontrolle Überstand (A2) und positive Kontrolle Bakterienzellen (E2) | 41 |
| Abbildung 17: Strukturformel von N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid | 42 |
| Abbildung 18: Elastaseaktivität von 24 Stunden inkubierten Bakterienproben aus Überständen (B1-C11) und Bakterienzellen (F1-G11), negative Kontrolle Überstand (A1), negative Kontrolle Bakterienzellen (E1) und positive Kontrolle Überstand (A2) und positive Kontrolle Bakterienzellen (E2) | 43 |
| Abbildung 19: Mittelwerte der Flächen des DNA-Abbaus auf DNA-Agarplatten der negativen Kontrollproben (K1-, K2-), der Wildstämme der Gattung | |

| | |
|--|----|
| Prevotella, Segatella und Hoylesella (P108 - P166) und der Kontrollstämme (P28, P59, P96, P97) | 44 |
| Abbildung 20: Mittelwerte der gewanderten Strecke der DNA bei der Elektrophorese für die Proben aus Bakterienzellen (schwarz) und Überständen (grau). Negative Kontrollproben (K1-, K2-) und Prevotella, Segatella und Hoylesella-Wildstämme (P108 – P166). | 46 |
| Abbildung 21: Mittelwerte der Chymotrypsinaktivität der P. micra-Wildstämme nach 24 Stunden Inkubation mit chromogenem Peptid von den Proben der Bakterienzellen (schwarz) und den Proben der Überstände (grau). Positive Kontrolle (K+), Negative Kontrolle K-, P. micra-Wildstämme (P81 - 170) und Kontrollstamm (A.n.). | 50 |
| Abbildung 22: Mittelwerte der Elastaseaktivität der P. micra-Wildstämme nach 24 Stunden Inkubation mit chromogenem Peptid der Proben aus Bakterienzellen (schwarz) und der Proben aus Überständen (grau). Positive Kontrolle (K+), Negative Kontrolle (K-), P. micra-Wildstämme (P81 – P170) und Kontrollstamm (A.n.). | 53 |

9 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Anzahl und Gattungen der Wildstämme dieser vorgelegten Studie..... | 21 |
| Tabelle 2: Ergebnis DNase-Aktivität der Prevotella-Wildstämme auf DNA-Agarplatten | 46 |
| Tabelle 3: Ergebnis DNase-Aktivität in DNA-Lösung | 48 |
| Tabelle 4: Ergebnis FadA-Nachweis | 49 |
| Tabelle 5: Ergebnisse Chymotrypsinaktivität..... | 51 |
| Tabelle 6: Ergebnisse Elastaseaktivität..... | 54 |

10 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| LPS | Lipopolysaccharid |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IL-8 | Interleukin-8 |
| MMP-2 | Matrix-Metalloproteinase-2 |
| MMP-9 | Matrix-Metalloproteinase-9 |
| MMP-1 | Matrix-Metalloproteinase-1 |
| MMP-8 | Matrix-Metalloproteinase-8 |
| NET | Neutrophil extracellular trap |
| IgG | Immunglobulin G |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| DNasen | Desoxyribonuklease |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| FadA | Fusobacterium Adhesin A |
| RANTES | Regulated and normal T cell expressed and secreted |
| PBS | Posphatgepufferte Salzlösung |
| NTC | Negativer Temperaturkoeffizient |
| UV | Ultraviolett |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| BHI | Brain heart infusion |

11 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich bei der vorgelegten Arbeit unterstützt und begleitet haben:

An erster Stelle ein herzliches Dankeschön an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Karin Huth für die Überlassung dieses spannenden Themas und ihre herausragende Betreuung bei dieser Arbeit.

Großer Dank an Herrn Prof. Dr. Reinhard Hickel, den Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Prodekan der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, diese Doktorarbeit in seiner Einrichtung durchführen zu dürfen.

Ganz besonders großer Dank gebührt meinem Betreuer Herr Dr. Maximilian Kollmuß. Seine Betreuung, sein Engagement und seine Fachkompetenz waren stets erstklassig. Auch seine kontinuierliche Förderung im Rahmen von Seminaren habe ich sehr geschätzt und genossen.

Ein weiteres Dankeschön an Frau Brigitte Hackl, die als MTA im Forschungslabor bei technischen Fragen immer sehr hilfsbereit war.

Als letztes ein großes Dankeschön an meine Eltern, die mich immer auf meinem Weg bedingungslos unterstützt haben.

12 Anhang

12.1 Ethikvotum



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Herrn
 Prof. Dr. med. dent. Karin Huth
 Klinikum der Universität München
 Zahnklinik
 Goethestr. 70
 80336 München

Vorsitzender:
 Prof. Dr. W. Eisenmenger
 Telefon+49 (0)89 440055191
 Telefax+49 (0)89 440055192
 Ethikkommission@
 med.uni-muenchen.de
www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Anschrift:
 Pettenkoferstr. 8a
 D-80336 München

18.05.2016/sc

Unser Zeichen: **178-16** (bitte bei Schriftwechsel angeben)

**Beratung nach geltendem Fakultätsrecht
 Ergänzung zum Votum vom 18.04.2016**

Studientitel: Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie
 Antragsteller: Prof. Dr. med. dent. Karin Huth, Klinikum der Universität München, Zahnklinik, Goethestr. 70, 80336 München

Sehr geehrte Frau Prof. Dr. Huth,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 25.04.2016 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen

- Antragsformular
- Studienprotokoll
- Patienteninformaton u. Einverständniserklärung
- CD mit allen genannten Dokumenten.

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Allgemeine Hinweise:

- Änderungen im Verlauf der Studie sind der EK zur erneuten Prüfung vorzulegen.
- Schwerwiegende unerwartete Ereignisse im Rahmen der Studie sind der EK mitzuteilen.
- Das Ende der Studie ist anzuzeigen und das Ergebnis vorzulegen.
- Die ärztliche und juristische Verantwortung bei der Durchführung der Studie verbleibt uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern.

Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mitglieder der Kommission:
 Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. C. Bausewein, PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. B. Emmerich, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. K. Hahn, Dr. B. Henrikus, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. D. Nowak, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. A. Yassouridis, Dr. Ch. Zach

178-16 2
18.05.2016

SEITE 2 VON 2

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr.-W. Eisenmenger
Vorsitzender der Ethikkommission

12.2 Verwendete Wildstämme

| Nummer des Wildstamms | Spezies |
|-----------------------|------------------------------|
| P 108 | <i>Prevotella nigrescens</i> |
| P 112 | <i>Segatella baroniae</i> |
| P 116 | <i>Segatella buccae</i> |
| P 117 | <i>Prevotella denticola</i> |
| P 118 | <i>Prevotella denticola</i> |
| P 119 | <i>Prevotella denticola</i> |
| P 126 | <i>Hoylesella loescheii</i> |
| P 128 | <i>Prevotella nigrescens</i> |
| P 129 | <i>Prevotella nigrescens</i> |
| P 133 | <i>Prevotella nigrescens</i> |
| P 138 | <i>Segatella salivae</i> |
| P 162 | <i>Prevotella denticola</i> |
| P 166 | <i>Prevotella denticola</i> |

| Nummer des Wildstamms | Spezies |
|-----------------------|--|
| P 28 | <i>Fusobacterium naviforme</i> |
| P 29 | <i>Fusobacterium naviforme / nucleatum</i> |
| P 30 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 33 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 34 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 35 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 37 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 38 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 39 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 41 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 42 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 43 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 44 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 45 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 46 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 47 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 50 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 51 | <i>Fusobacterium nucleatum / naviforme</i> |
| P 53 | <i>Fusobacterium nucleatum /naviforme</i> |
| P 54 | <i>Fusobacterium nucleatum /naviforme</i> |
| P 55 | <i>Fusobacterium nucleatum / naviforme</i> |
| P 57 | <i>Fusobacterium sp.</i> |
| P 58 | <i>Fusobacterium sp.</i> |
| P 59 | <i>Fusobacterium sp.</i> |
| P 60 | <i>Fusobacterium sp.</i> |
| P 61 | <i>Fusobacterium sp. / nucleatum</i> |
| P 63 | <i>Fusobacterium sp.</i> |
| P 64 | <i>Fusobacterium sp.</i> |
| P 161 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| P 165 | <i>Fusobacterium canifelinum</i> |
| P 171 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> |

| Nummer des Wildstamms | Spezies |
|-----------------------|-------------------------|
| P 81 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 82 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 83 | <i>Parvimonas micra</i> |

| | |
|-------|-------------------------|
| P 84 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 86 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 90 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 91 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 92 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 93 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 94 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 95 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 96 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 97 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 98 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 99 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 100 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 101 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 102 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 103 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 104 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 106 | <i>Parvimonas micra</i> |
| P 170 | <i>Parvimonas micra</i> |

| Bezeichnung des Wildstamms | Spezies |
|----------------------------|-------------------------------|
| A.n. | <i>Actinomyces naeslundii</i> |

12.3 Rezepte der Methodiken

Nährmedium Flüssigkultur zur Anzucht der Keime:

11,1 g BHI-Pulver (Bacto™ Brain Heart Infusion, BD)
 150 mg L-Cystein (L-Cystein für biochemische Zwecke, Merck, Deutschland)
 3 ml Hämin-Stammlösung
 60 µl Vitamin-K₁-Stammlösung
 300 ml Reinstwasser (H₂O, Barnstead MicroPure, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA)

Hämin-Stammlösung für Nährmedium:

50 mg Hemin (Hämin from bovine, ≥90%, Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
 1 ml 1N Natronlauge (NaOH, Natronlauge 1 mol/l - 1 N Maßlösung, Carl Roth, Deutschland)
 99 ml sterilem destillierten Wasser (H₂O, Wasser für Injektionszwecke, Berlin-Chemie, Deutschland)

Vitamin-K₁-Stammlösung für Nährmedium:

0,15 ml Phyllochinon (Phytonadion, Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material, Supelco, Pennsylvania, USA)
 30 ml Ethanol 95% (Ethanol 95% (v/v), ExtraPure, SLR, ThermoFisher Scientific).

DNA-Agarplatten Versuch DNase-Aktivität:

24,975 BHI-Pulver (Bacto™ Brain Heart Infusion, BD)
9,11g Agar (Bacteriological agar for molecular biology, Sigma-Aldrich)
0,137g Magnesiumchlorid (MgCl₂, Magnesium chloride hexahydrate
SigmaUltra minimum 99.0%, Sigma-Aldrich)
0,0925 g Calciumchlorid (CaCl₂, Calcium chloride dihydrate for molecular
biology approx. 99%, Sigma-Aldrich)
1,35 g Lachsspermium-DNA (Deoxyribonucleic acid low molecular weight
from salmon sperm, Sigma-Aldrich)
675 ml Reinstwasser (H₂O, Barnstead MicroPure, ThermoFisher Scientific)

DNase-Reaktionspuffer Versuch DNase-Aktivität:

0,121 g Tris (Tris Pufferan ≥99,9% Ultra Quality, Carl Roth)
0,051 g Magnesiumchlorid (MgCl₂, Magnesium chloride hexahydrate
SigmaUltra minimum 99.0%, Sigma-Aldrich)
0,007 g Calciumchlorid (CaCl₂, Calcium chloride dihydrate for molecular
biology approx. 99%, Sigma-Aldrich)
100 ml Reinstwasser (H₂O, Barnstead MicroPure, ThermoFisher Scientific)

0,8% Agarose-Gel mit Ethidiumbromid Versuch DNase-Aktivität:

2,0 g Agarose (Biozym LE Agarose For gel electrophoresis, Biozym,
Deutschland)
250 ml 1 X TBE-Puffer aus 25 ml 10 X TBE (TBE-Puffer 10x konzentriert 1L,
Apotheke Klinikum der Universität München, Deutschland) und 225 ml
destilliertem Wasser (H₂O Produkt)
12,5 µl Ethidiumbromid (Ethidium bromide solution, 10 mg/ml Molecular
biology tested suitable for gel electrophoresis DNA isolation procedures,
Sigma-Aldrich)

6X Laufpuffer Elektrophorese Versuch DNase-Aktivität:

15,0 g Ficoll 400
0,06 g Bromphenolblau
0,06 g Xyloncyanol
1,1 g Titriplex III
100 ml Wasser für Injektionszwecke

Proteinase-K-Lösung Magna-Pure-LC Versuch FadA:

1,2 Elutionspuffer (Elution Buffer, Vial 6, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III Roche)
1 Vial Proteinase K (Proteinase K, Vial 8, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III Roche)

Einmarprodukte Magna-Pure-LC Versuch FadA:

Pipettenspitzen (MagNA Pure LC Reaction Tips (small) und MagNA Pure LC Reaction Tips (large), Roche)
Pipettenspitzenhalter (MagNa Pure LC Tip Stands, Roche)
Prozessierungsbehälter (MagNA Pure LC Processing Cartridges, Roche)
Reagenzgefäße (MagNA pure LC Reagent Tub (large), Roche) und (MagNA Pure LC Medium Reagent Tub 20, Roche)
Elutionsbehälter (MagNA pure sample cartridges, Roche)
Deckel (MagNA Pure LC Tub Lids (large) und (MagNA Pure LC Tub Lids (small, medium), Roche)
Ausgabebehältnis und Probebehältnis (MagNA pure sample cartridges, Roche)
Auffangbeutel (Solid Waste Bag, Roche)

Reagenzien Magna-Pure-LC Versuch FadA:

31,2 ml Waschpuffer I (Wash Buffer I, Bottle 1, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, Roche)
18,4 ml Waschpuffer II (Wash Buffer II, Bottle 2, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, Roche)
15,4 ml Waschpuffer III (Wash Buffer III, Bottle 3, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, Roche)
10,8 ml Lysepuffer (Lysis/Binding Buffer, Bottle 4, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, Roche)
5,8 ml (Magnetic Glass Partivles Suspension, Vial 5, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, Roche)
12,3 ml Elutionpuffer (Elution Buffer, Bottle 6, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, Roche)

Mastermix PCR Versuch FadA:

200 µl Reaktionspuffer (5X Green GoTaq Reaction buffer, Promega, Wisconsin, USA)
50 µl 20,6 µM FadA-R-Lösung pipettiert
50 µl 20,0 µM FadA-F-Lösung
20 µl Nucleotidmix (dNTP Mix, Promega)
575 µl H₂O dest. Ster., 200 µl Reaktionspuffer
5 µl Taq-Polymerase (GoTaq G2 DANN Polymerase, Promega)

Daten PCR Thermocycler Versuch FadA:

Denaturierung: 4 Minuten bei 95°C
30 Zyklen:
Denaturierung: 30 Sekunden bei 95°C
Primerhybridisierung: 30 Sekunden bei 55,8°C
Elongation: 40 Sekunden bei 72°C
Finale Elongation 6 Minuten bei 72°C

1,5% Agarose-Gel mit Ethidiumbromid Versuch FadA:

9,38 g Agarose (Biozym LE Agarose For gel electrophoresis, Biozym, Deutschland)
625 ml ml 1 X TBE-Puffer aus 62,5 ml 10 X TBE (TBE-Puffer 10x konzentriert 1L, Apotheke Klinikum der Universität München, Deutschland) und 562,5 ml destilliertem Wasser (H₂O Produkt)
31,25 µl Ethidiumbromid (Ethidium bromide solution, 10 mg/ml Molecular biology tested suitable for gel electrophoresis DNA isolation procedures, Sigma-Aldrich)

Peptidlösung Versuch Chymotrypsinaktivität :

120 µl gelöstes N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-N-nitroanilid (25 mg N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-N-nitroanilid (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-N-nitroanilid, Sigma-Aldrich) gelöst in 903 µl DMSO (Dimethyl sulfoxide, sterile filtered, ≥99.7% Sigma-Aldrich))
1080 µl PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline sterile filtered endotoxin testet, Sigma-Aldrich)

1mM-HCl-2mM-CaCl₂-Lösung für Alpha-Chymotrypsin:

14,7 mg Calciumchlorid (CaCl₂, Calcium chloride dihydrate for molecular biology approx. 99%, Sigma-Aldrich)
50 µl 1M HCl (Salzsäure (1N) 1mol/l-2N Maßlösung, Carl Roth)
50 ml Reinstwasser (H₂O, Barnstead MicroPure, Thermo Scientific)

Peptidlösung Versuch Elastaseaktivität:

120 µl des gelösten N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid (5 mg N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide gelöst in 250 µl DMSO (Dimethyl sulfoxide, sterile filtered, ≥99.7% Sigma-Aldrich))
1080 µl 100 mM Tris-Puffer, pH= 8,0

100 mM Tris-Puffer, pH = 8,0, Versuch Elastaseaktivität:

2,42 g Tris (Tris Pufferan ≥99,9% Ultra Quality, Carl Roth)

200 ml Reinstwasser (H₂O, Barnstead MicroPure, Thermo Scientific, MA, USA)
 wurde unter Zugabe von 1M HCL (Salzsäure (1N) 1mol/l-2N Maßlösung, Carl Roth) der pH-Wert des Puffers auf 8,0 eingestellt.

12.4 Daten der statistischen Auswertung

a) DNase-Aktivität von Wildstämmen der Gattung *Prevotella*:

| Test auf Normalverteilung Shapiro-Wilk-Test | |
|--|--------------------|
| DNase-Aktivität auf DNA- Agarplatten: | |
| Stamm | Signifikanz |
| K1- | 0,000 |
| K2- | 0,000 |
| P28 | 0,000 |
| P59 | 0,000 |
| P96 | 0,000 |
| P97 | 0,000 |
| P108 | 0,243 |
| P112 | 0,942 |
| P116 | 0,000 |
| P117 | 0,000 |
| P118 | 0,780 |
| P119 | 0,241 |
| P126 | 0,924 |
| P128 | 0,866 |
| P129 | 0,931 |
| P133 | 0,000 |
| P138 | 0,661 |
| P162 | 0,970 |
| P166 | 0,597 |

| Test der Varianzhomogenität Levene-Test | | | | |
|--|-------------------------|------------|------------|--------------------|
| Variable | Levene-Statistik | df1 | df2 | Signifikanz |
| DNase-Aktivität auf DNA-Agarplatten | 7,400 | 18 | 36 | <0,001 |

| Kruskal-Wallis-Test | | | |
|-------------------------------------|-------------------|----------------------|--|
| Variable | Gesamtzahl | Teststatistik | Asymptotische Signifikanz (zweiseitiger Test) |
| DNase-Aktivität auf DNA-Agarplatten | 55 | 52,412 | <0,001 |

| Dunn's-Test | | |
|---|--------------------|--|
| Ausschnitt DNase-Aktivität auf DNA-Agarplatten | | |
| Paarweise-Vergleich | Signifikanz | Angepasste Signifikanz (Bonferroni-Korrektur) |
| K1-, K2- | 1,000 | 1,000 |
| K1-, P28 | 1,000 | 1,000 |
| K1-, P59 | 1,000 | 1,000 |
| K1-, P96 | 1,000 | 1,000 |
| K1-, P97 | 1,000 | 1,000 |
| K1-, P118 | 0,331 | 1,000 |
| K1-, P117 | 0,293 | 1,000 |
| K1-, P126 | 0,204 | 1,000 |
| K1-, P116 | 0,164 | 1,000 |
| K1-, P138 | 0,120 | 1,000 |
| K1-, P119 | 0,067 | 1,000 |
| K1-, P166 | 0,028 | 1,000 |
| K1-, P162 | 0,014 | 1,000 |
| K1-, P129 | 0,006 | 1,000 |
| K1-, P108 | 0,003 | 0,509 |
| K1-, P133 | 0,007 | 1,000 |
| K1-, P128 | 0,002 | 0,361 |
| K1-, P112 | 0,001 | 0,194 |

| |
|----------------------------------|
| Test auf Normalverteilung |
|----------------------------------|

| Shapiro-Wilk-Test | | |
|---------------------------------------|--|-----------------------------------|
| DNase-Aktivität in DNA-Lösung: | | |
| Stamm | Signifikanz Bakterienzellen | Signifikanz Überstände |
| K1- | 0,000 | 0,157 |
| K2- | 0,637 | 0,000 |
| P108 | 0,174 | 0,303 |
| P112 | 0,668 | 1,000 |
| P116 | 0,948 | 0,213 |
| P117 | 0,680 | 0,659 |
| P118 | 0,188 | 0,045 |
| P119 | 0,770 | 0,363 |
| P126 | 0,442 | 0,057 |
| P128 | 0,878 | 0,439 |
| P129 | 0,140 | 0,475 |
| P133 | 0,000 | 0,079 |
| P138 | 0,906 | 0,843 |
| P162 | 0,125 | 0,878 |
| P166 | 0,637 | 0,520 |
| | | |

| Test der Varianzhomogenität Levene-Test | | | | |
|---|------------------------------|------------|------------|--------------------|
| Variable | Levene- Statistik | df1 | df2 | Signifikanz |
| DNase-Aktivität in DNA- Lösung Bakterienzellen | 4,836 | 14 | 30 | <0,001 |
| DNase-Aktivität in DNA- Lösung Überstände | 5,619 | 14 | 30 | <0,001 |

| Kruskal-Wallis-Test | | | |
|---|-------------------|----------------------|--|
| Variable | Gesamtzahl | Teststatistik | Asymptotische Signifikanz (zweiseitiger Test) |
| DNase-Aktivität in DNA-Lösung Bakterienzellen | 45 | 31,702 | 0,004 |
| DNase-Aktivität in DNA-Lösung Überstände | 45 | 38,881 | <0,001 |

| Dunn's-Test | | |
|---|--------------------|--|
| Ausschnitt DNase-Aktivität in DNA-Lösung Bakterienzellen | | |
| Paarweise-Vergleich | Signifikanz | Angepasste Signifikanz (Bonferroni-Korrektur) |
| K1-, K2- | 1,000 | 1,000 |
| K1-, P138 | 0,446 | 1,000 |
| K1-, P166 | 0,256 | 1,000 |
| K1-, P126 | 0,157 | 1,000 |
| K1-, P118 | 0,131 | 1,000 |
| K1-, P117 | 0,113 | 1,000 |
| K1-, P162 | 0,079 | 1,000 |
| K1-, P129 | 0,040 | 1,000 |
| K1-, P116 | 0,019 | 1,000 |
| K1-, P119 | 0,009 | 1,000 |
| K1-, P133 | 0,009 | 1,000 |
| K1-, P128 | 0,003 | 0,590 |
| K1-, P108 | 0,003 | 0,482 |
| K1-, P112 | <0,001 | 0,056 |

| Dunn's-Test | | |
|--|--------------------|--|
| Ausschnitt DNase-Aktivität in DNA-Lösung Überstände | | |
| Paarweise-Vergleich | Signifikanz | Angepasste Signifikanz (Bonferroni-Korrektur) |
| K1-, K2- | 0,926 | 1,000 |
| K1-, P138 | 0,504 | 1,000 |
| K1-, P118 | 0,419 | 1,000 |
| K1-, P126 | 0,276 | 1,000 |
| K1-, P116 | 0,208 | 1,000 |
| K1-, P166 | 0,148 | 1,000 |
| K1-, P119 | 0,103 | 1,000 |
| K1-, P117 | 0,062 | 1,000 |
| K1-, P162 | 0,029 | 1,000 |
| K1-, P129 | 0,004 | 0,688 |
| K1-, P108 | 0,003 | 0,437 |
| K1-, P128 | 0,002 | 0,288 |
| K1-, P133 | 0,001 | 0,198 |
| K1-, P112 | <0,001 | 0,095 |

| Test auf Normalverteilung Shapiro-Wilk-Test | |
|--|--------------------|
| Variable | Signifikanz |
| DNA-Agarplatten | 0,006 |
| DNA-Lösung Bakterienzellen | <0,001 |
| DNA-Lösung Überstände | <0,001 |

| Korrelation nach Spearman | | | |
|--|--------------------------------|---------------|-------------------------------|
| Variablen | Korrelationskoeffizient | Anzahl | Signifikanz (2-seitig) |
| DNA-Lösung Bakterienzellen / DNA-Lösung Überstände | 0,830 | 45 | <0,001 |
| DNA-Lösung Überstände / DNA-Agarplatten | 0,898 | 37 | <0,001 |

b) Chymotrypsinaktivität und Elastaseaktivität von Wildstämmen der Art *P. micra*

| |
|--|
| Test auf Normalverteilung Shapiro-Wilk-Test |
|--|

| Chymotrypsinaktivität | | |
|------------------------------|--|-----------------------------------|
| Stamm | Signifikanz Bakterienzellen | Signifikanz Überstände |
| K+ | 0,221 | 0,384 |
| K- | 0,405 | 0,322 |
| P81 | 0,417 | 0,607 |
| P82 | 0,066 | 0,868 |
| P83 | 0,545 | 0,857 |
| P84 | 0,142 | 0,430 |
| P86 | 0,423 | 0,716 |
| P90 | 0,068 | 0,033 |
| P91 | 0,007 | 0,489 |
| P92 | 0,468 | 0,262 |
| P93 | 0,193 | 0,037 |
| P94 | 0,383 | 0,030 |
| P95 | 0,830 | 0,429 |
| P96 | 0,177 | 0,797 |
| P97 | 0,240 | 0,600 |
| P98 | 0,006 | 0,405 |
| P99 | 0,010 | 0,202 |
| P100 | 0,019 | 0,228 |
| P101 | 0,546 | 0,851 |
| P102 | 0,061 | 0,741 |
| P103 | 0,026 | 0,404 |
| P104 | 0,780 | 0,945 |
| P106 | 0,215 | 0,168 |
| P170 | 0,293 | 0,837 |
| A.n. | 0,072 | 0,818 |

| Test der Varianzhomogenität Levene-Test | | | | |
|--|------------------------------|------------|------------|--------------------|
| Variable | Levene- Statistik | df1 | df2 | Signifikanz |
| Chymotrypsinaktivität Bakterienzellen | 1,493 | 24 | 75 | 0,099 |
| Chymotrypsinaktivität Überstände | 3,103 | 24 | 75 | <0,001 |

| Kruskal-Wallis-Test | | | |
|---------------------------------------|-------------------|----------------------|--|
| Variable | Gesamtzahl | Teststatistik | Asymptotische Signifikanz (zweiseitiger Test) |
| Chymotrypsinaktivität Bakterienzellen | 97 | 40,300 | 0,020 |
| Chymotrypsinaktivität Überstände | 100 | 63,526 | <0,001 |

| Dunn's-Test | | |
|---|--------------------|--|
| Ausschnitt Chymotrypsinaktivität Bakterienzellen | | |
| Paarweise-Vergleich | Signifikanz | Angepasste Signifikanz (Bonferroni-Korrektur) |
| K-, P104 | 0,914 | 1,000 |
| K-, A.n. | 0,744 | 1,000 |
| K1- P90 | 0,105 | 1,000 |
| K-, P91 | 0,105 | 1,000 |
| K-, P170 | 0,053 | 1,000 |
| K-, P102 | 0,043 | 1,000 |
| K-, K+ | 0,038 | 1,000 |
| K-, P95 | 0,044 | 1,000 |
| K-, P86 | 0,023 | 1,000 |
| K-, P92 | 0,018 | 1,000 |
| K-, P83 | 0,018 | 1,000 |
| K-, P82 | 0,012 | 1,000 |
| K-, P94 | 0,011 | 1,000 |
| K-, P96 | 0,005 | 1,000 |
| K-, P93 | 0,005 | 1,000 |
| K-, P81 | 0,004 | 1,000 |
| K-, P98 | 0,004 | 1,000 |
| K-, P84 | 0,003 | 0,771 |
| K-, P97 | 0,002 | 0,600 |
| K-, P101 | 0,002 | 0,587 |
| K-, P106 | 0,004 | 1,000 |
| K-, P99 | 0,002 | 0,454 |
| K-, P103 | 0,001 | 0,382 |

| | | |
|----------|-------|-------|
| K-, P100 | 0,001 | 0,373 |
|----------|-------|-------|

| Dunn's-Test | | |
|--|--------------------|--|
| Ausschnitt Chymotrypsinaktivität Überstände | | |
| Paarweise-Vergleich | Signifikanz | Angepasste Signifikanz (Bonferroni-Korrektur) |
| K-, P104 | 0,956 | 1,000 |
| K-, A.n. | 0,927 | 1,000 |
| K1- P90 | 0,394 | 1,000 |
| K-, P91 | 0,249 | 1,000 |
| K-, P170 | 0,002 | 0,500 |
| K-, P102 | <0,001 | 0,025 |
| K-, K+ | <0,001 | 0,005 |
| K-, P95 | 0,018 | 1,000 |
| K-, P86 | 0,025 | 1,000 |
| K-, P92 | 0,196 | 1,000 |
| K-, P83 | 0,004 | 1,000 |
| K-, P82 | 0,005 | 1,000 |
| K-, P94 | 0,005 | 1,000 |
| K-, P96 | 0,140 | 1,000 |
| K-, P93 | 0,284 | 1,000 |
| K-, P81 | 0,003 | 0,919 |
| K-, P98 | 0,033 | 1,000 |
| K-, P84 | 0,030 | 1,000 |
| K-, P97 | 0,003 | 0,919 |
| K-, P101 | 0,045 | 1,000 |
| K-, P106 | 0,023 | 1,000 |
| K-, P99 | 0,009 | 1,000 |
| K-, P103 | 0,019 | 1,000 |
| K-, P100 | 0,006 | 1,000 |

| Test auf Normalverteilung Shapiro-Wilk-Test | |
|--|--------------------|
| Variable | Signifikanz |
| | |

| | |
|--|--------|
| Chymotrypsinaktivität Bakterienzellen | <0,001 |
| Chymotrypsinaktivität Überstände | <0,001 |

| Korrelation nach Spearman | | | |
|--|--------------------------------|----------|-----------------------------------|
| Variablen | Korrelationskoeffizient | n | Signifikanz (2-seitig) |
| Chymotrypsinaktivität Bakterienzellen 24 h / Chymotrypsinaktivität Überstände 24 h | 0,110 | 97 | <0,285 |
| Chymotrypsinaktivität Bakterienzellen 1 h / Chymotrypsinaktivität Überstände 24 h | 0,551 | 50 | <0,001 |

| Test auf Normalverteilung Shapiro-Wilk-Test | | |
|--|--|-----------------------------------|
| Elastaseaktivität | | |
| Stamm | Signifikanz Bakterienzellen | Signifikanz Überstände |
| K+ | 0,718 | 0,160 |
| K- | 0,224 | 0,857 |
| P81 | 0,183 | 0,055 |
| P82 | 0,789 | 0,930 |
| P83 | 0,496 | 1,000 |
| P84 | 0,982 | 0,898 |
| P86 | 0,648 | 0,887 |
| P90 | 0,978 | 0,149 |
| P91 | 0,823 | 0,719 |
| P92 | 0,838 | 0,670 |
| P93 | 0,302 | 0,791 |
| P94 | 0,291 | 0,300 |
| P95 | 0,559 | 0,734 |
| P96 | 0,750 | 0,765 |
| P97 | 0,830 | 0,087 |
| P98 | 0,565 | 0,861 |
| P99 | 0,280 | 0,109 |
| P100 | 0,199 | 0,007 |
| P101 | 0,106 | 0,927 |

| | | |
|------|-------|-------|
| P102 | 0,430 | 0,066 |
| P103 | 0,055 | 0,398 |
| P104 | 0,008 | 0,989 |
| P106 | 0,387 | 0,733 |
| P170 | 0,504 | 0,914 |
| A.n. | 0,262 | 0,131 |

| Test der Varianzhomogenität Levene-Test | | | | |
|--|-------------------------|------------|------------|--------------------|
| Variable | Levene-Statistik | df1 | df2 | Signifikanz |
| Elastaseaktivität Bakterienzellen | 2,464 | 24 | 75 | 0,002 |
| Elastasaktivität Überstände | 2,209 | 124 | 75 | 0,005 |

| Kruskal-Wallis-Test | | | |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------|--|
| Variable | Gesamtzahl | Teststatistik | Asymptotische Signifikanz (zweiseitiger Test) |
| Elastaseaktivität Bakterienzellen | 100 | 64,280 | <0,001 |
| Elastaseaktivität Überstände | 100 | 34,126 | 0,082 |

| Dunn's-Test | | |
|---|--------------------|--|
| Ausschnitt Elastaseaktivität Bakterienzellen | | |
| Paarweise-Vergleich | Signifikanz | Angepasste Signifikanz (Bonferroni-Korrektur) |
| K-, P104 | 0,688 | 1,000 |
| K-, A.n. | 0,845 | 1,000 |
| K1- P90 | 0,249 | 1,000 |
| K-, P91 | 0,157 | 1,000 |
| K-, P170 | 0,119 | 1,000 |
| K-, P102 | 0,003 | 0,783 |

| | | |
|----------|--------|-------|
| K-, K+ | <0,001 | 0,001 |
| K-, P95 | 0,006 | 1,000 |
| K-, P86 | 0,005 | 1,000 |
| K-, P92 | 0,097 | 1,000 |
| K-, P83 | 0,007 | 1,000 |
| K-, P82 | <0,001 | 0,221 |
| K-, P94 | <0,001 | 0,008 |
| K-, P96 | 0,037 | 1,000 |
| K-, P93 | 0,113 | 1,000 |
| K-, P81 | 0,034 | 1,000 |
| K-, P98 | 0,006 | 1,000 |
| K-, P84 | 0,003 | 0,849 |
| K-, P97 | 0,001 | 0,356 |
| K-, P101 | 0,036 | 1,000 |
| K-, P106 | 0,005 | 1,000 |
| K-, P99 | 0,004 | 0,454 |
| K-, P103 | 0,010 | 0,382 |
| K-, P100 | <0,001 | 0,161 |

| Test auf Normalverteilung Shapiro-Wilk-Test | |
|--|-------------|
| Variable | Signifikanz |
| Elastaseaktivität Bakterienzellen | <0,001 |
| Elastaseaktivität Überstände | <0,001 |

| Korrelation nach Spearman | | | |
|---|-------------------------|--------|---------------------------|
| Variablen | Korrelationskoeffizient | Anzahl | Signifikanz (2-seitig) |
| Elastaseaktivität Bakterienzellen 24 h / Chymotrypsinaktivität Bakterienzellen 1 h | 0,841 | 50 | <0,001 |
| Elastaseaktivität Bakterienzellen 24 h / Chymotrypsinaktivität Bakterienzellen 24 h | 0,065 | 97 | 0,524 |

13 Eidesstattliche Versicherung

Zimmer, Jacob Martin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Untersuchung von parodontalen Wildstämmen der Gattung Prevotella, Fusobacterium und Parvimonas auf charakteristische Virulenzfaktoren“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Inning, den 21.12.23

Ort, Datum

Jacob Zimmer

Unterschrift Doktorand