

Aus dem Funktionsbereich für Parodontologie  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. T. Kocher)  
der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Dr. hc. G. Meyer)  
im Zentrum für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde  
(Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Dr. hc. Georg Meyer)  
und dem Friedrich-Loeffler-Institut für Medizinische Mikrobiologie  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. I. Steinmetz)  
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:  
Untersuchungen zur oralen Inokulation und Kolonisation mit  
parodontal-pathogenen Bakterien im murinen Modell.

Inaugural – Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin  
(Dr. med. dent.)

der  
Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
2012

vorgelegt von: Malte Jan Dominik  
geboren am: 29.04.1982  
in: Oldenburg

Dekan: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Hayo K. Kroemer

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Kocher

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ivo Steinmetz

Dritter Gutachter: Prof. Dr. S. Jepsen (Bonn)

Ort, Raum: Hörsaal der neuen Zahnklinik, W.-Rathenau-Str. 42a, Greifswald

Tag der Disputation: 12.03.2013

Für meine Frau und meine Eltern.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Pathogenese und Klinik der Parodontitis.....	2
1.2 Tiermodelle in der Parodontitisforschung .....	3
1.2.1 Methoden der Parodontitis marginalis Induktion im murinen Modell .....	4
1.2.2 Methoden zum Nachweis von Attachment- und Knochenverlust .....	5
1.3 Zielstellung der Arbeit.....	6
2 Material und Methode .....	8
2.1 Geräte und Material.....	8
2.1.1 Geräte .....	8
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	9
2.1.3 Chemikalien, Zellkulturmedien und Zusätze .....	9
2.1.4 Antibiotika / Antimykotika .....	10
2.1.5 Basislösungen und Kits.....	10
2.1.6 Software.....	11
2.2 Mäuse .....	11
2.2.1 Rechtliche Grundlagen.....	11
2.2.2 Mausstamm .....	11
2.3 Verwendete Bakterien und deren Anzucht .....	12
2.3.1 Bebrütungstechniken .....	12
2.3.2 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	13
2.3.2.1 Herstellen des Zellkulturmediums ( <i>AaGM</i> ).....	13
2.3.2.2 Anlegen einer Bakterien-Stocklösung .....	13
2.3.2.3 Anzucht von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> 1005.....	14
2.3.2.4 Anzucht von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 29523 .....	15

2.3.3	<i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	15
2.3.3.1	Anlegen einer Bakterien-Stocklösung .....	15
2.3.3.2	Anzucht von <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 53977 und DSM 20709 .....	16
2.3.4	Keimzahlbestimmung.....	16
2.4	Infektion der Mäuse .....	16
2.4.1	Antibiotikabehandlung vor der Infektion .....	16
2.4.2	Infektionsverlauf .....	17
2.4.3	Gavage bei der Maus.....	17
2.4.4	Infektion über das Futter .....	18
2.4.5	Infektionsdosis .....	18
2.5	Einteilung der Untersuchungsgruppen .....	19
2.6	Nachweis der Bakterien aus der Maulhöhle .....	20
2.6.1	Kultureller Nachweis .....	20
2.6.1.1	Herstellung der Selektivagarplatten für <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	20
2.6.1.2	Abstrichentnahme und Aufbereitung .....	21
2.6.1.3	Anzahl und Zeitpunkt der Abstriche .....	22
2.6.2	Molekularbiologische Nachweise von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> und <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	22
2.6.2.1	Präparation von <i>Porphyromonas gingivalis</i> -DNS .....	22
2.6.2.2	Polymerase-Kettenreaktion .....	23
2.6.2.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	24
2.6.3	Bestimmung des Antikörpertiter bei <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> infizierten Tieren .....	25
2.6.3.1	Blutentnahme .....	25
2.6.3.2	ELISA .....	25
2.7	Messmethoden zur Bestimmung des Knochenabbaus .....	26
2.7.1	Töten der Mäuse .....	26
2.7.2	Mazeration des Mäuseschädels.....	26
2.7.2.1	Färbung mit Toluidinblau.....	27

2.7.2.2	Einscannen der Mäusekiefer .....	27
2.7.2.3	Morphometrische Vermessungsmethode.....	28
2.8	Fehlerbestimmung und Reproduzierbarkeit .....	30
2.9	Statistische Methoden .....	31
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Kolonisation der Maulhöhle mit den Bakterien <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> und <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	33
3.1.1	Kolonisationsnachweis von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> in der Maulhöhle nach Infektion ...	33
3.1.2	Kolonisationsnachweis von <i>Porphyromonas gingivalis</i> in der Maulhöhle nach Infektion .....	35
3.2	Nachweis von Serum-Antikörpern gegen <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> nach Infektion.....	36
3.3	Knochenabbaus nach der Infektion .....	38
3.3.1	Erzielter Knochenabbau nach Infektion mit <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> in den verschiedenen Gruppen....	38
3.3.2	Erzielter Knochenabbau nach Infektion mit <i>Porphyromonas gingivalis</i> in den verschiedenen Gruppen .....	39
3.3.3	Ergebnisse der Reproduzierbarkeit der Messungen des Knochenabbaus .....	41
3.3.3.1	Ergebnisse zur Bestimmung des eigenen Messfehlers...	41
3.3.3.2	Reproduzierbarkeitsmessungen durch drei Untersucher	42
4	Diskussion .....	43
4.1	Infektionsmodell mit <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .	43
4.2	Infektionsmodell mit <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	45
5	Zusammenfassung .....	47
6	Literaturverzeichnis.....	48
7	Abbildungsverzeichnis .....	53
8	Tabellenverzeichnis .....	55
9	Anhang .....	57
9.1	Anhang A.....	57

Eidesstattliche Erklärung.....	69
Danksagung.....	70

## Abkürzungsverzeichnis

*A.a.* - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

*AaGM* - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans Growth Medium*

AKR – Alveolarknochenrand

ATCC – American Type Culture Collection

CMC - Carboxymethylcellulose

CFU - Colony Forming Units

DNS – Desoxyribonukleinsäure

DSMZ – Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

ELISA – Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay / Enzymgekoppelter  
Immunoabsorbenttest

EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure (-acetat)

h – Stunde

ICC – Intra-Klassen-Korrelationskoeffizient

L – Liter

M – Molar

ml - Milliliter

nm – Nanometer

ORP - Orientierungspunkt

PBS - Phosphate Buffered Saline

*P.g.* - *Porphyromonas gingivalis*

PCR - Polymerase Ketten (Chain) Reaktion

rif - Rifampicin

SZG - Schmelz-Zement-Grenze

TSB - Tryptone Soy Broth

U/min. – Umdrehungen pro Minute

UV - Ultraviolett

µg - Mikrogramm

µl – Mikroliter

V - Volt

° C – Grad Celsius



# 1 Einleitung

## 1.1 Pathogenese und Klinik der Parodontitis

Bei der Parodontitis handelt es sich um eine bakterielle, entzündliche Erkrankung aller Bestandteile des Zahnhalteapparates, siehe Abbildung 1, die mit alveolarem Knochenabbau, Verlust des Stütz- und Haltegewebes und im Endstadium mit Zahnverlust einhergeht. Der Parodontitis geht immer eine Zahnfleischentzündung (Gingivitis) voraus, welche durch Plaque, Konkremente und die damit einhergehende Besiedlung des Sulkusbereiches durch aerobe, später dann zunehmend anaerobe Bakterien ausgelöst wird. Allerdings entsteht nicht aus jeder Gingivitis eine Parodontitis. Auch ist nicht bekannt, wann und warum eine bestehende Gingivitis in eine Parodontitis übergeht [1, 2].

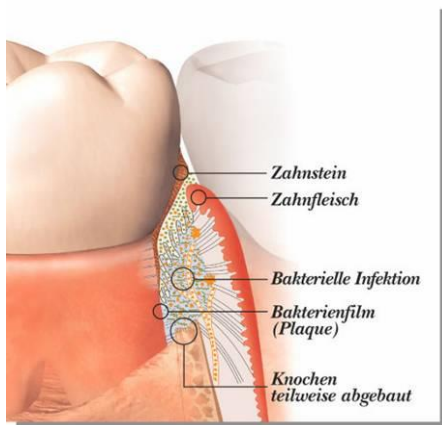


Abbildung 1: Schematischer Überblick der Parodontitis marginalis mit den dazugehörigen Komponenten: bakterielle Infektion, Plaque, Zahnstein und Knochenabbau; Quelle: <http://www.dr Schmidt.de/bilder/parodontose/parodontose-1.gif>

Die Parodontitis wird eingeteilt in die chronisch und die aggressive Form, wobei beide entweder lokal oder generalisiert ablaufen können [3]. Unter den multifaktoriellen Ursachen für die Parodontitis, wie z.B. das Mundhygieneverhalten, die genetische Disposition, das soziale Umfeld, systemische Erkrankungen oder die Immunabwehr, ist die Anwesenheit bestimmter Mikroorganismen maßgeblich. Für die parodontale Destruktion werden ca. 10 – 30 Bakterienspezies verantwortlich gemacht [4, 5], unter denen die Gram-negativen Bakterien *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), welches mit der chronischen Form der Parodontitis marginalis und horizontalem Knochenabbau in Verbindung gebracht wird [6] und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), das besonders bei der aggressiven Parodontitis mit vertikalem

Knochenabbau an einzelnen Zähnen eine tragende Rolle spielt [7-11], von großer Bedeutung sind.

## 1.2 Tiermodelle in der Parodontitisforschung

Die Parodontitis ist eine Erkrankung, die durch alle Gesellschaftsschichten geht und in allen Altersklassen vorhanden ist. [12] Um dieses so weit verbreitete Krankheitsbild besser zu verstehen, ist es von Interesse, einzelne Faktoren und Abschnitte des Krankheitsverlaufs sowie deren Zusammenhänge zu untersuchen. Um darüber Aussagen zu erhalten, bedarf es also eines Modells, welches möglichst variabel, das heißt, eine höchstmögliche Anzahl von veränderbaren Faktoren bietet und so verschiedene Herangehensmöglichkeiten, je nach Fragestellung, erlaubt. [13-20]. Außerdem sind die exakte Reproduzierbarkeit und eine Vergleichbarkeit mit dem Menschen wichtige Voraussetzungen [21, 22]. Die Vergleichbarkeit zum Menschen ist von besonderer Bedeutung, da eine möglichst hohe Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine Behandlung beim Menschen die Ergebnisse umso relevanter werden lässt. Für die Parodontitisforschung eignen sich daher tierexperimentelle Modelle. Um den komplexen Ablauf der Parodontitis in vivo zu studieren, wurden bisher beispielsweise Affen, Hunde, Schafe, Katzen, Hamster, Kaninchen, Meerschweinchen sowie Mäuse und Ratten eingesetzt [21-34]. Einfache Haltungsbedingungen sowie die Verfügbarkeit von Tieren mit definierten genetischen Deletionen haben dazu geführt, dass insbesondere Ratten und Mäuse besonders häufig eingesetzt werden [21, 23, 24, 35]. Durch die Verfügbarkeit von Inzuchtmäusen, deren genetischer Hintergrund sowie Funktionen des Immunsystems gut bekannt sind, eignet sich das murine Modell besonders gut, um Wirtsfaktoren in vivo bei experimenteller Parodontitis zu untersuchen. Da zudem *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* nicht zur normalen murinen oralen Standortflora gehören, kann eine spezifische Wirtsantwort auf diese beiden Bakterien bei Mäusen studiert werden. Das Parodont, der Plaqueaufbau, sowie die Histopathologie der parodontalen Läsionen weisen Ähnlichkeiten zum Menschen auf, was die Maus zu einem geeigneten Modellorganismus macht [10, 21, 36, 37]. Die kleine orale Kavität und eine andere Zusammensetzung der oralen Standortflora sowie eine Entzündungsantwort, die sich von der des Menschen unterscheidet, stellen jedoch Nachteile in diesem System dar [21].

### 1.2.1 Methoden der Parodontitis marginalis Induktion im murinen Modell

Das Erzeugen von Parodontitis kann invasiv mittels Injektion in die Gingiva sowie durch Legen von Ligaturen aber auch nicht-invasiv über die Schlundelung (Gavage) oder Inokulation mit Futter erfolgen.

Bei der Injektion werden Lipopolysaccharide (Endotoxine) z.B. von *A. actinomycetemcomitans* in das parodontale Gewebe injiziert. Dabei konnte ein Knochenabbau beobachtet werden, der mit dem Endotoxin in Zusammenhang gebracht wurde [10, 38-43]. Für die Ligatur stehen verschiedene Materialien wie beispielsweise Stahldraht, Nylon, Seide oder Gummi zur Verfügung [44-52], die um den Zahnhals platziert werden und dort als Anhaftstelle für Plaque dienen. Die mechanische Reizung des Parodonts wird genutzt, damit Bakterien in das parodontale Gewebe eindringen können und dort zu einer Parodontitis führen. Die Ligatur kann auch direkt mit Bakterien präpariert werden und so die Besiedelung des parodontalen Gewebes vereinfachen [53-55]. Die invasive Technik geht jedoch immer mit Gewebeschädigung einher und entspricht nicht dem natürlichen Infektionsverlauf.

Bei der nicht-invasiven Inokulation werden durch Gavage oder Gabe per Futter, Bakterien in die Maulhöhle eingebracht. Die Gavage, wie von Wray *et al.* [10] beschrieben, wurde auch in anderen Arbeiten verwendet, um *P. gingivalis* zu inokulieren [7, 56] und dabei wurde bei verschiedenen Inzuchtmausstämmen der erzielte Knochenabbau verglichen [57]. Die AKR/J, DBA2/J, BALB/cByJ, und BALB/cJ -Mausstämme reagierten am empfindlichsten, d.h. mit dem meisten Knochenabbau nach der Infektion mit *P. gingivalis*. Die A/J, A/HeJ, 129/J, SJL/J, und C57BL/6J-Mausstämme zeigten hingegen keinen Knochenabbau [57].

Fine *et al.* und Schreiner *et al.* inokulieren *A. actinomycetemcomitans* bei Ratten über das Futter [58, 59]. Es liegen ebenfalls Studien mit *A. actinomycetemcomitans* und BALB/c-Mäusen vor, die einen Knochenabbau dokumentieren [10, 36]. Die Vorteile der Inokulation über das Futter bestehen darin, dass keine direkte Gewebeschädigung durch Nadeln erfolgt, die Tiere weniger Stress erfahren und der natürliche Krankheitsverlauf nicht abgekürzt wird.

## 1.2.2 Methoden zum Nachweis von Attachment- und Knochenverlust

Eine Kenngröße für das Vorhandensein und den Schweregrad einer Parodontitis marginalis ist der Attachmentverlust, der als die Distanz zwischen der Schmelz-Zement-Grenze und dem Boden der Zahnfleischtasche gemessen wird. Da diese am mazerierten Knochen nicht mehr vorhanden ist, wird der Alveolarknochenrand als Bezugspunkt gewählt, sodass man als messbare Größe den Knochenabbau von der Schmelz-Zement-Grenze zum Alveolarknochenrand erhält [60-66].

Um die feinen Strukturänderungen, Umbau-, sowie Abbauvorgänge an einem Mäusekiefer bestimmen zu können, bedarf es besondere, den filigranen Umständen angepasste Auswertungsmethoden, die die Vergrößerung des zu untersuchenden Bereichs ermöglichen. In der Literatur werden vier verschiedene Methoden zum Nachweis von Attachment- und Knochenverlust beschrieben und verglichen [50, 54, 59, 65]: Die histologische Aufarbeitung und Auswertung der Knochenschnitte, die morphometrische Untersuchung mit einem Auflichtmikroskop, die Mikroradiographie und die mikroradiologische Untersuchung mit einem Kleintier-Computer-Tomograph.

Die Untersuchung histologischer Schnitte des Kieferknochens ist von den oben genannten die aufwändigste. Die Präparate müssen fixiert, entkalkt und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet werden, die dann in der gewünschten Richtung gesägt und gefärbt werden. Der mehrwöchigen Aufbereitung schließt sich dann die Auswertung an. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die pathologische Beurteilung der parodontalen Veränderung möglich ist. Die Messung des Knochenabbaus erfolgt auch hier von der Schmelz-Zement-Grenze zum Alveolarknochenrand [45, 50, 54, 67-69].

Bei der Morphometrie mittels Auflichtmikroskop wird der zahntragende Kieferknochen mazeriert, gefärbt und die Vermessung von der Schmelz-Zement-Grenze zum Alveolarknochenrand erfolgt mit einem Auflichtmikroskop. Diese Methode ist in der Literatur weit verbreitet, da sie weniger zeitaufwändig ist als die histologische Untersuchung [7, 54, 65, 70]. Sie wurde schon 1967 von Stralfors *et al.* [64] angewandt und kam danach mit leichten Modifikationen immer wieder zum Einsatz, wie zum Beispiel 1978 bei Crawford *et al.* [60, 61], 1992 bei Evans *et al.* [70], 1994 und 1999 bei Baker *et al.* [7], wobei 1999 zum ersten Mal eine Video-Analysesystem das Messobjektiv ersetzte.

Bei der Radiographie wird ein Röntgenbild des bezahnten Kiefers, meist nach Vergrößerung, ausgemessen. Im Jahr 1989 verglichen Klausen *et al.* [65] die

radiologische mit der morphometrischen Auswertung, wobei zwischen beiden Methoden eine Korrelation gezeigt werden konnte und empfahl beide Methoden anzuwenden. 1992 verwendete Evans *et al.* [70] die von Klausen *et al.* beschriebene Messtechnik am Röntgenbild parallel zur morphometrischen Messung. Schreiner *et al.* [59] benutzten 2003 nur die radiologische Auswertung, da besonders auf den vertikalen Knochenabbau Wert gelegt wurde. Zur Bestimmung des mesialen und distalen Knochenabbaus an den Zähne benutzten Kesavalu *et al.* [71] 2007 ebenfalls die radiologische Auswertung.

Die Mikro-Computer-Tomographie könnte der neue Goldstandard in der Vermessung von Knochenabbau werden. 2003 verglichen von Stechow *et al.* [72] eine 2-dimensionale Mikro-CT-Messung mit einer 3-dimensionalen volumetrischen Mikro-CT-Messung und konnten zeigen, dass das 3-dimensionale Mikro-CT Beurteilungen von mikrostrukturellen Besonderheiten besser ermöglicht. Der Vorteil des Mikro-CT gegenüber der morphometrischen und histologischen Methode besteht in der Non-Invasivität. Im Jahr 2005 verglichen Wilensky *et al.* [56] die morphometrische Methode mit einer 3-dimensionalen Quantifizierung des Alveolarknochenabbaus mittels eines Mikro-CT. Wilensky *et al.* [56] konnten zeigen, dass die volumetrische Bestimmung des Knochenabbaus mit einem Mikro-CT hochsensitiv und damit der morphometrischen Methode überlegen ist. Li *et al.* [54] verglichen 2007 die histologische, morphometrische und Mikro-CT-Methode und kamen zu dem Ergebnis, dass alle drei Methoden eine effiziente Auswertung ermöglichen. Ebenfalls 2007 beschrieben Park *et al.* [73] die Entwicklung einer Mikro-CT-Methode für die Quantifizierung von zahntragendem Alveolarknochen in 3-D. Die Methode sei hoch verlässlich, reproduzierbar und es wird empfohlen die 3-D Mikro-CT-Methode den beiden dimensional Methoden, Röntgenbild sowie Histologie, vorzuziehen.

### **1.3 Zielstellung der Arbeit**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll ein experimentelles Parodontitis-Modell in der BALB/c Maus etabliert werden. Dabei sollen zwei nicht-invasive Inokulationsmethoden, die Gavage sowie die Inokulation über das Futter, zur Induktion einer Parodontitis marginalis untersucht und verglichen werden. Zur Infektion werden jeweils zwei Stämme der beiden Leitkeime der Parodontitis marginalis, *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*, eingesetzt. Diesbezüglich soll untersucht werden, ob diese Keime die murine Maulhöhle über einen längeren Zeitraum kolonisieren

können und nach welchen Zeitpunkten sie gegebenenfalls einen Knochenabbau induzieren. Um einen systemischen Effekt der experimentellen Parodontitis zu untersuchen, soll der Antikörpertiter der Mäuse gegenüber Parodontalkeimen über einen Zeitraum von mehreren Wochen bestimmt werden.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Geräte und Material

#### 2.1.1 Geräte

- Auflichtmikroskop SZH-10, Firma OLYMPUS Optical Co. GmbH
- BD GasPak EZ Kästen
- Biometra, BioDocAnalyse
- Biometra, Standard Power Pack P25
- Biometra, Elektrophoresekammer für Agarosegel
- Biometra, Thermocycler UNO II
- Brutschrank, Memmert
- ELISA-Reader Multiskan EX, Thermo
- Farb-Videokamera DXC-950P Power Had, Firma SONY Deutschland GmbH
- Gefrierschrank -20° C, Liebherr
- Lupe mit Licht
- Nadelhalter nach Castroviejo HM Art.Nr.: 1152TC/18, Carl Martin, Solingen
- PC, Pentium I, 200 Mhz, 128 MB RAM, 16 MB Matrox Millennium II  
Grafikkarte, Matrox Meteor PCI Frame-Grabber-Karte
- Pipetus®, Hirschmann Laborgeräte
- Transferpetter®, Brand
- Sicherheitswerkbank Clean Air, Cotech
- Sicherheitswerkbank Herasafe, Heraeus
- Vortexer, VWR International

#### Zentrifugen

- Biofuge 13 (Rotor 3765), Heraeus Sepatech
- Centrifuge 5417 (Rotor 00972), Eppendorf
- Tischzentrifuge EBA 85 (Rotor 0250), Hettich

#### Waagen

- Feinwaage MC1, Sartorius
- Rapido, Owa Labor VEB Nagema

#### Tierhaltungsutensilien

- 300 ml Trinkflasche, Firma EHRET

- Kunststoffkäfige, Firma EHRET
- Mausschrank „Ventilated Cabinet“, Firma Tecniplast

### **2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

- 96-Well-Platten, Greiner
- 15 ml Röhrchen, Sarstedt
- 50 ml Röhrchen / Falcon, BD
- Baumwollkugeln, Roecko
- BD GasPak EZ Anaerobic Container System / Campy Container System
- BD GasPak EZ Anaerobic Gas Generating Pouch System with Indikator
- BD GasPak EZ Campy Gas Generating Pouch System
- Einmalskalpell Präzisa plus, Dahlhauser
- Einmalspritzen 1 ml Dispomed®, Vfw
- Feeding Needles, fine science tools, Gauge 20, Length 38 mm, Ø 1,75 mm, # 18061-20
- Glaskanülen
- Hartfutter, SSniff Spezialdiät GMBH
- Impfösen (1 und 10 µl), Nerbe Plus
- Reaktionsgefäß (1,5 und 0,5 ml), Sarstedt
- Serologische Pipette (5, 10, 25 ml), Sarstedt
- Streueinlage Lignocel, H. Rettenmaier & Söhne
- Wattestäbchen, Unomedical
- Zellkulturflaschen mit Filterdeckel 250 ml
- Zellkulturplatten
- Zellschaber 30 cm, TPP

### **2.1.3 Chemikalien, Zellkulturmedien und Zusätze**

- Agar Bacteriological, Oxoid
- BSA- Bovines Serumalbumin, Fraktion V, Applichem
- Carboxymethylcellulose sodium salt, Sigma, als 2 % Lösung
- Columbia Blutagar mit 5 % Schafsblut, BD BBL™ Stacker™ Plates
- Ethanol 99 %, J.T. Baker



- Glycerin, steril-filtriert
- Natriumbicarbonat, Serva, als 10 % Lösung
- Natriumhypochlorid 12,5 %, 60 : 40 mit H<sub>2</sub>O
- Schaedler Agar mit Vit. K1 und 5 % Schafblut, BD BBL™ Stacker™ Plates
- Natriumfumerat, Sigma
- Natriumformiat, Fluka
- POD (horseradish peroxidase), avidin d gekoppelt mit 1 % BSA, 1:10000, Vercotlaboratories (Burlingame, Ca)
- Phenylenediaminedihydrochlorid, Sigma (p1526-10g)
- Sucrose, Serva, als 20 % Lösung
- Thioglycollate Medium mit Hemin und Vit. K, BD BBL™ Prepared Culture Media
- Tryptone Soy Broth (TSB), Oxoid
- Tuloidinblau 1:1 mit H<sub>2</sub>O
- Yeast Extract, Oxoid

#### **2.1.4 Antibiotika / Antimykotika**

- Bacitracin (75 mg / ml)
- Cotrim (Sulfamethoxazol 400 mg / Trimethoprim 80 mg)
- Nystatin (100 Units / ml)
- Rifampicin (70 µg / ml)
- Vancomycin (5 mg / ml)

#### **2.1.5 Basislösungen und Kits**

- Agarosegel: 50 ml Elektrophorese Puffer, 1 g Agarose, 50 µl Ethidiumbromid
- TAE-Elektrophorese-Puffer Stammlösung 20 x, 28,2 g Tris, 3,72 g EDTA, 250 ml Aqua dest., mit Essigsäure auf pH 7,9 einstellen und dann mit 500 ml Aqua dest. auffüllen
- Farbmarker (für PCR): 20 g Saccharose, 100 µl 0,5 Mol EDTA, eine Messerspitze 0,25 % Bromphenolblau, auf 50 ml mit Aqua dest. auffüllen

- Phosphate Buffered Saline (PBS): 0,2 M NaCl, 2,5 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, mit Aqua dest. auf einen Liter auffüllen, eingestellt auf pH 7,4
- QIAamp<sup>®</sup>DNS MiniKit (50) (Firma QIAGEN Cat. No. 51304)

### 2.1.6 Software

- analySIS Build 428 (Soft Imaging System GmbH, 48153 Münster)
- Ascent software for IEM5 Reader MF Version 2.6 (ELISA Software)
- BioDocAnalyze 2.1, Biometra
- Microsoft Word 2003 und 2007, 2010
- Microsoft Excel 2003 und 2007, 2010
- R (Statistik, free shareware, [www.r-project.org](http://www.r-project.org))
- SPSS für Windows Version 11.5.1 (Microsoft, USA)
- EndNote X4

## 2.2 Mäuse

### 2.2.1 Rechtliche Grundlagen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche an Mäusen wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) Mecklenburg-Vorpommern, als die dafür zuständige Behörde, genehmigt. Das Versuchsvorhaben hat das Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-044/05. Vor Beginn der Arbeit wurde ein Schein zum Erwerb der Sachkunde für die Durchführung von Tierversuchen an der Universität Greifswald erworben.

### 2.2.2 Mausstamm

Alle Tierexperimente wurden an weiblichen BALB/c-Mäusen im Alter zw. 4-20 Wochen durchgeführt. Die Tiere wurden von Charles River Wiga (Sulzfeld) bezogen. Die Mäuse wurden in einem Mausschrank „Ventilated Cabinet“ bei standardisierten Klimabedingungen und 12 h Lichtzyklus in Kunststoffkäfigen in Gruppen von 6-8 Tieren gehalten. Die Versorgung mit Trinkwasser und Futterpellets (sniff) erfolgte ad libidum.

## 2.3 Verwendete Bakterien und deren Anzucht

Folgende in Tabelle 1 beschriebene Stämme von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) und *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 1: Besonderheiten, Resistenzen und Herkunft der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Besonderheiten	Resistenzen	Herkunft
<b><i>A.a.</i> 1005</b>	Kommt als glatte und raue Form vor. Die kleinere raue Form kann an Kunststoff, Glas, Agargel und an anderen Flächen adhärieren. Serotyp f	Rifampicin und Nadalxinsäure	H. Schreiner, Columbia Dental School, USA
<b><i>A.a.</i> ATCC 29523</b>	-	-	ATCC, USA
<b><i>P.g.</i> DSM 20709</b>	Nach 8-10 Tagen Bebrütung kommt es zum Erscheinen der schwarzen Pigmentierung	-	DSMZ
<b><i>P.g.</i> ATCC 53977</b>	Nach 6-8 Tagen Bebrütung kommt es zum Erscheinen der schwarzen Pigmentierung	-	Wilensky <i>et al.</i> , Israel

### 2.3.1 Bebrütungstechniken

#### 1. Mikroaerophile Bebrütung

Die beimpften Blutagar-Platten wurden zusammen mit einem GasPak für mikroaerophile Bedingungen in eine luftdicht verschließbare Tüte (BD GasPak EZ Campy Gas Generating Pouch System (Abbildung 2)) gesteckt und bei 37 ° C inkubiert.

#### 2. Anaerobe Bebrütung

Die Bakterien wurden auf Schaedler-Platten geimpft und zusammen mit einem GasPak für anaerobe Bedingungen in eine luftdicht verschließbare Tüte gesteckt (BD GasPak EZ Anaerobic Gas Generating Pouch System mit Indikator) und bei 37°C inkubiert.



Abbildung 2: Foto des BD GazPak EZ Campy Gas Generating Pouch System für die anaerobe und mikroaerophile Bebrütung der verwendeten Bakterien. Quelle: [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/brochures/br\\_2\\_2540.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/brochures/br_2_2540.pdf)

### **2.3.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

*A. actinomycetemcomitans* ist ein mikroaerophiles, Gram-negatives Bakterium, welches als raue, adhärenente und als glatte Form vorkommt [58, 59] und dessen Pathogenität von der Fähigkeit abhängt, wie gut es an Flächen haften kann. Laborstämme, die immer wieder kultiviert werden, verlieren allerdings diese adhärenenten Fähigkeiten [9, 58, 59, 74]. Leukotoxische Serotypen von *A. actinomycetemcomitans* werden mit der aggressiven Parodontitis, bei der vertikale Knocheneinbrüche an einzelnen Zähnen das Krankheitsbild bestimmen, assoziiert [75-77].

#### **2.3.2.1 Herstellen des Zellkulturmediums (AaGM)**

Für das Zellkulturmedium wurden 30 g TSB und 6 g Hefeextrakt in 1000 ml Aqua dest. aufgelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 40 ml 20 %ige Dextroselösung, 40 ml 10%ige Natriumbicarbonatlösung, 1 ml Bacitracin und 1 ml Vancomycin hinzugegeben.

#### **2.3.2.2 Anlegen einer Bakterien-Stocklösung**

*A.a.1005*: Der auf eine Blutagar-Platte geimpfte *A.a.1005* wurde für 4 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert (siehe 2.3.1). Es wuchsen zwei morphologisch unterschiedliche Kolonieförmungen, eine matt erscheinende raue Form sowie eine glänzende glatte Form. Da für Versuchszwecke nur die raue Form verwendet werden sollte, wurden von der Platte ausschließlich raue Kolonieförmungen selektiert und auf eine neue Blutagar-Platte überimpft, die wiederum für 4 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen bebrütet

wurde. Mit einem Baumwolltupfer wurden die rau gewachsenen Kolonieförmungen in ein 15 ml Röhrcben mit 5 ml *AaGM* übertragen und unter mikroaerophilen Konditionen für 3 Tage inkubiert. Vor dem Einbringen der 5 ml Bakteriensuspension in eine 250 ml Zellkulturflasche mit 40 ml *AaGM*, wurden die Wände des Röhrcbens mit einer 1 µl Impföse für 2 min. abgeschabt um die adhärenenten Bakterien zu lösen. Die Zellkulturflasche wurde daraufhin für 4 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen bebrütet. Aus der Zellkulturflasche wurde das *AaGM* mit den nicht adhärenenten Bakterien verworfen und die am Boden haftende raue Form mit je 10 ml PBS zweimal gewaschen. Auf die gewaschenen Bakterien wurden 5 ml *AaGM* gegeben und diese mit einem Zellschaber abgelöst. Die Bakteriensuspension wurde in ein 15 ml Röhrcben transferiert, bei 3000 U/min. (Rotor 0250) für 10 min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde mit 0,5 ml Glycerin versetzt und in Portionen (Working Stocks) zu 40 µl aufgeteilt, die dann bei -20 ° C eingefroren wurden.

*A.a.29523*: Der auf eine Agar-Platte geimpfte *A.a. 29523* wurde für 4 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert. Da sich hier keine raue Form mehr eindeutig abgrenzen ließ, wurden alle auf der Agar-Platte gewachsenen Bakterien weiterverwendet. Die von der Agar-Platte mit einem Baumwolltupfer aufgenommenen Bakterien wurden in ein 15 ml Röhrcben mit 5 ml *AaGM* geimpft und für 3 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen bebrütet. Mit einer Pipette wurden 3,5 ml der Bakteriensuspension abgenommen, mit 1,5 ml Glycerin (Endkonzentration 30 %) versetzt und in 40 µl-Portionen (Working Stocks) bei -20 ° C eingefroren.

### **2.3.2.3 Anzucht von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 1005**

Aus dem Stock wurde *A.a.1005* auf eine Blut-Agar-Platte geimpft und für 4 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert. Alle rau gewachsenen Bakterienkolonien von dieser Platte wurden mit einem Baumwolltupfer in ein 15 ml Röhrcben mit 5 ml *AaGM* übertragen und unter mikroaerophilen Konditionen für 3 Tage inkubiert. Vor dem Einbringen der 5 ml Bakteriensuspension in eine 650 ml Zellkulturflasche mit 50 ml *AaGM* wurden die Wände des Röhrcbens mit einer 1 µl Impföse für 2 min. abgeschabt um die adhärenenten Bakterien zu lösen. Die Zellkulturflasche wurde für 4 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen bebrütet, dann wurde das *AaGM* mit den nicht-adhärenenten Bakterien verworfen und die am Boden haftende raue Form mit je 10 ml PBS zweimal gewaschen. In die Flasche wurden 5 ml *AaGM* gegeben und mit einem Zellschaber die

adhärenten Bakterien vom Boden der Flasche abgeschabt, worauf die gewonnene Bakteriensuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 4500 U/min. (Rotor 0250) für 10 min. zentrifugiert wurde. Der *AaGM*-Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde mit 2 ml CMC-Lösung resuspendiert.

#### **2.3.2.4 Anzucht von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523**

Aus dem Stock wurde *A.a.* 29523 auf eine Blutagar-Platte geimpft und für 4 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert. Von dieser Platte wurden alle Bakterien mit einem Baumwolltupfer in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml *AaGM* übertragen und unter mikroaerophile Konditionen für 3 Tage inkubiert. Das Röhrchen wurde bei 4500 U/min. (Rotor 0250) für 10 min. zentrifugiert und der *AaGM*-Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen, wobei nach jedem Waschen nochmals bei 4500 U/min. (Rotor 0250) für 10 min. zentrifugiert und der PBS-Überstand verworfen wurde, bevor es mit 2 ml CMC-Lösung resuspendiert wurde.

#### **2.3.3 *Porphyromonas gingivalis***

*P. gingivalis* ist ein obligat anaerobes, Gram-negatives Bakterium, das eine typische schwarze Pigmentierung aufweist, wenn es anaerob auf einem Schaedler-Agar kultiviert wird und es wird vermutet, dass dessen Pathogenität von der Fähigkeit abhängt, wie gut es an Flächen haften kann [78].

##### **2.3.3.1 Anlegen einer Bakterien-Stocklösung**

*P.g.* 53977 und 20709: *Porphyromonas gingivalis* wurde auf eine Schaedler-Platte geimpft und für 4 Tage unter anaeroben Bedingungen inkubiert (siehe 2.3.1). Mit einem Baumwolltupfer wurden alle Bakterien von der Platte in Thioglycollate Medium gebracht und für 4 Tage unter anaeroben Bedingungen bebrütet. 3 ml der Bakteriensuspension wurden mit 1,5 ml Glycerin (Endkonzentration 30 %) versetzt, in 40 µl-Portionen (Working Stocks) aufgeteilt und bei -20 ° C eingefroren.

### **2.3.3.2 Anzucht von *Porphyromonas gingivalis* ATCC 53977 und DSM 20709**

Aus dem Stock wurde *Porphyromonas gingivalis* auf eine Schaedler-Platte geimpft und für 4 Tage unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Mit einem Baumwolltupfer wurden alle Bakterien von der Platte in Thioglycollate Medium übertragen und für 4 Tage unter anaeroben Konditionen bebrütet. Das Medium wurde in ein 15 ml Röhrchen umgefüllt, bei 4500 U/min. (Rotor 0250) für 10 min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen, wobei es nach jedem Waschen nochmals bei 4500 U/min. (Rotor 0250) für 10 min. zentrifugiert und der PBS-Überstand verworfen wurde, bevor es mit 1 ml CMC-Lösung resuspendiert wurde.

### **2.3.4 Keimzahlbestimmung**

Um sicher zu stellen, dass die Tiere immer mit der gleichen Anzahl von Bakterien infiziert werden, wurde eine Keimzahlbestimmung der Infektionslösung durchgeführt. Es wurden jeweils 100 µl verschiedener Verdünnungsstufen der Bakteriensuspension in Doppelwerten auf Blutagar-Platten bzw. Schaedler-Platten ausplattiert, die dann für 4-5 Tage unter mikroaerophilen bzw. anaeroben Bedingungen bebrütet und daraufhin die Koloniezahl bestimmt wurde. Aus Platten der gleichen Verdünnungsstufe wurde das arithmetische Mittel der gezählten Kolonien gebildet und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert. Die absolute Keimzahl wurde durch die Bildung des arithmetischen Mittels der so bestimmten Werte verschiedener Verdünnungsstufen ermittelt. Alle Werte der einzelnen Infektionen wurden ebenfalls gemittelt und ergaben so einen durchschnittlichen Wert für alle Infektionen.

## **2.4 Infektion der Mäuse**

### **2.4.1 Antibiotikabehandlung vor der Infektion**

Bei allen Infektionsversuchen bekamen die Mäuse 10 Tage vor der ersten Infektion eine Antibiotikabehandlung mit Cotrim (Sulfamethoxazol 400 mg / Trimethoprim 80 mg pro 500ml) über das Trinkwasser. Auf diese Weise sollte die natürliche Standortflora im Maul reduziert werden, um die Besiedelung mit den jeweils inokulierten Bakterien zu erleichtern.

## 2.4.2 Infektionsverlauf

In Abbildung 3 ist dargestellt, nach welchen Schemata die Infektionen erfolgten. Bei den Infektionsexperimenten mit *A. actinomycetemcomitans*, welche nach dem Protokoll von Schreiner *et al.* [59] durchgeführt wurde, wurden die Tiere an acht aufeinanderfolgenden Tagen einmal pro Tag infiziert. Bei dem *P. gingivalis* Experiment, das nach dem Protokoll von Baker *et al.* [7] durchgeführt wurde, wurden 3 Inokulationen an jedem zweiten Tag vorgenommen.

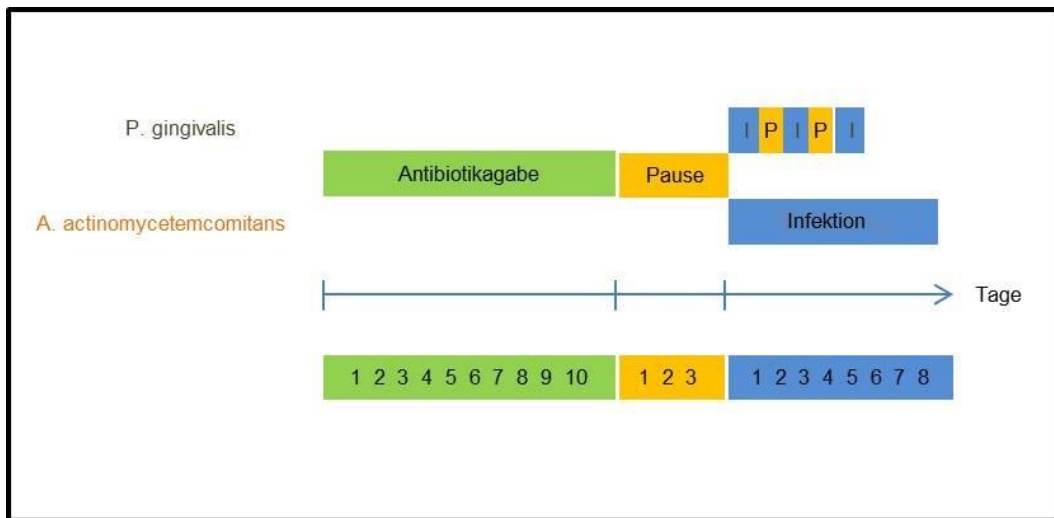


Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf der Experimente mit *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans*: Nach der 10-tägigen Antibiotikagabe wurde die Infektion mit einer Verzögerung von 2 Tagen gestartet. *A. actinomycetemcomitans* wurde jeden Tag, 8 Tage lang inokuliert, *P. gingivalis* wurde dreimal alle 2 Tage inokuliert (I = Infektion, P = Pause).

## 2.4.3 Gavage bei der Maus

Die Applikation der Bakterien / CMC-Lösung erfolgte mit Hilfe der Feeding Needle. Dazu wurde, wie in Abbildung 4 zu sehen, die Maus mit Daumen und Zeigefinger im Nacken genommen und so gedreht, dass man frontal auf das Maul sehen konnte. Die Feeding Needle wurde nun rechts oder links an der Zunge vorbei nach distal geschoben, bis sie im Oesophagus war, wo dann 50 µl der Bakterien / CMC-Lösung appliziert wurden. Wenn Flüssigkeit aus dem Maul austrat, war die Nadel nicht im Oesophagus platziert. Nach der Applikation der Bakterienlösung im Oesophagus wurde die Feeding Needle bis ins Maul zurückgezogen und dort die restlichen 50 µl der Bakterien / CMC-Lösung deponiert.





Abbildung 4: Applikation der Bakteriensuspension per Schlündelung (Gavage) in Maul und Oesophagus der BALB/c Maus. Quelle: Privatfoto Malte Jan Dominik

#### **2.4.4 Infektion über das Futter**

Das Hartfutter wurde mittels eines Mixers zu Pulver zerkleinert. Am Tag der Inokulation wurde das Futter den Tieren für mindestens 3 Stunden vor der Infektion entzogen. Für eine Maus wurden 400 mg Futterpulver mit 100  $\mu$ l Bakterien/CMC Suspension und 300  $\mu$ l Carboxymethylcellulose zu einem Teig geknetet. Der Teig wurde dann in die Futtervertiefung des Käfigs gelegt und von den Tieren in der Regel innerhalb von ca. 30 Minuten verzehrt. Die Tiere erhielten während der Infektionsperiode und 8 Tage im Anschluss zur weiteren Versorgung eine Weichkost, die sich aus gleichen Teilen Futterpulver und Aqua dest. zusammensetzte. Anschließend wurde wieder Hartfutter gegeben [59].

Die Kontrollgruppen bekamen im Infektionszeitraum Futterpulver mit CMC-Lösung ohne die Bakterien inokuliert. Die Art der Futterverabreichung entsprach jeweils jener der infizierten Tiere.

#### **2.4.5 Infektionsdosis**

In

Tabelle 2 ist die durchschnittliche Infektionsdosis für die Schlündelungsgruppen (Gavage) und die Futtergruppe aufgeführt.

Tabelle 2: Durchschnittliche Infektionsdosis der zwei Experimente nach der Infektionsart Gavage und Futter. In den Futter- und Gavagegruppen wurde eine Durchschnittliche Infektionsdosis von  $1 \times 10^8/100 \mu\text{l}$  erreicht. Bei A.a. 29523 wurde eine Infektionsdosis von  $7,8 \times 10^7/100 \mu\text{l}$  erreicht.

<b>A.a. Experiment</b>	<b>Infektionsart</b>	<b>Ø Infektionsdosis (CFU)</b>
<b>A.a. 1005 F</b>	Futter	$1 \times 10^8/100 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension
<b>A.a. 1005 G</b>	Gavage	$1 \times 10^8/100 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension
<b>A.a. 29523</b>	Gavage	$7,8 \times 10^7/100 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension
<b>P.g. Experiment</b>	<b>Infektionsart</b>	<b>Ø Infektionsdosis (CFU)</b>
<b>P.g. 53977</b>	Gavage	$1 \times 10^8/100 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension
<b>P.g. 20709</b>	Gavage	$1 \times 10^8/100 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension

## 2.5 Einteilung der Untersuchungsgruppen

*A. actinomycetemcomitans* (A.a.)-Experiment 1: Die Tiere waren zwischen 16 und 20 Wochen alt. Wie in Tabelle 3 dargestellt, wurde eine Gruppe à 5 Tiere und 7 Gruppen à 6 Tiere gebildet. Gruppe 1 und 5 waren die Kontrollgruppen. Gruppe 2 und 6 wurde A.a. 1005 mittels Gavage inokuliert. Gruppe 3 und 7 wurde mit A.a. 1005 mittels Futter inokuliert und Gruppe 4 und 8 erhielt A.a. 29523 ebenfalls per Gavage. Gruppe 1 bis 4 wurden nach 5 Wochen (T1) und die Gruppen 5 bis 8 nach 10 Wochen (T2) nach der letzten Inokulation getötet.

Im Experiment 2 wurde die Versuchsanordnung A.a. 1005 Futter mit 4-6 Wochen und im Experiment 3 mit 6-8 Wochen alten weiblichen BALB/c Mäusen reproduziert. Es wurden 8 Tiere pro Gruppe verwendet und die Infektionsdauer wurde auf 5 Wochen beschränkt, da nach diesem Zeitpunkt kein überproportionaler Anstieg des Knochenverlustes mehr erkennbar war.

*P. gingivalis* (P.g.)-Experiment: Die Tiere waren zwischen 16 und 20 Wochen alt. Es wurden 3 Gruppen à 6 Tiere gebildet. Gruppe 1 war die Kontrollgruppe, Gruppe 2 wurde P.g. ATCC 53977 mittels Gavage verabreicht und Gruppe 3 wurde per Gavage mit P.g. DSM 20709 inokuliert.

Tabelle 3: Einteilung der Untersuchungsgruppen: Anzahl der Mäuse in den Gruppen, Zuordnung zur Inokulationsmethode und die Todeszeitpunkte der jeweiligen Gruppen.

\* eine Maus verstorben von anfangs 6 Tiere auf 5 Tiere am Ende des Experiments (nach der ersten Inokulation; Ursache vermutlich versehentliche Applikation von Bakteriensuspension in die Lunge)

	Gruppe	Anzahl	Bakterium	Art der Inokulation	Versuchsdauer (T1 und T2)
<b>A.a.</b> <b>Experiment 1</b>	1	n = 5	Kontrolle	Gavage	5 Wochen
	2	n = 6*	A.a. 1005	Gavage	
	3	n = 6	A.a. 1005	Futter	
	4	n = 6	A.a. 29523	Gavage	
	10 Wochen	5	n = 6	Kontrolle	Gavage
		6	n = 6	A.a. 1005	Gavage
		7	n = 6	A.a. 1005	Futter
		8	n = 6	A.a. 29523	Gavage
<b>A.a.</b> <b>Experiment 2</b>	1	n = 8	Kontrolle	Gavage	5 Wochen
	2	n = 8	A.a. 1005	Futter	
<b>A.a.</b> <b>Experiment 3</b>	1	n = 8	Kontrolle	Gavage	5 Wochen
	2	n = 8	A.a. 1005	Futter	
<b>P.g.</b> <b>Experiment</b>	1	n = 6	Kontrolle	Gavage	6 Wochen
	2	n = 6	P.g. 53977	Gavage	6 Wochen
	3	n = 6	P.g. 20709	Gavage	6 Wochen

## 2.6 Nachweis der Bakterien aus der Maulhöhle

### 2.6.1 Kultureller Nachweis

#### 2.6.1.1 Herstellung der Selektivagarplatten für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Rifampicinagar-Platten (rifpl): 1000 ml Aqua dest. wurden mit 30 g TSB und 6 g Hefeextrakt sowie 15 ml Agar Bacteriologica gemischt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50 ° C im Wasserbad wurden 70 µl / ml Rifampicin (gelöst in 1 ml Ethanol), sowie 100 units / L Nystatin zugegeben. Dann wurden die Platten unter einer

Sicherheitswerkbank (Herasafe) gegossen und nach dem Erstarren im Kühlschrank gelagert.

BHI Agarplatten: 100 ml Aqua dest. wurden mit 5 g Hefeextrakt, 1,5 g Natriumfumarat, 1 g Natriumformiat und 15 g Agar Bacteriologica gemischt und bei 121 ° C für 15 min. autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50 ° C im Wasserbad wurden 9 µg / ml Vancomycin zugegeben und die Platten unter einer Sicherheitswerkbank (Herasafe) gegossen und nach dem Erstarren im Kühlschrank gelagert.

### **2.6.1.2 Abstrichentnahme und Aufbereitung**

Den Tieren wurde ein mit PBS benetztes Baumwollkugelchen, welches mit einem chirurgischen Nadelhalter nach Castroviejo festgehalten wurde, für 30 Sekunden an den Gaumen, Alveolarfortsatz und die Zähne gehalten und so ein Abstrich genommen. Das Kugelchen wurde dann in ein 15 ml Röhrchen mit 1 ml PBS getan und für 30 Sekunden durch Vortexen gemischt. 100 µl dieser Suspension wurden bei den *A. actinomycetemcomitans*-Experimenten einmal unverdünnt auf eine Selektivagarplatte (rifpl), sowie je einmal 1:10 verdünnt auf eine Selektivagarplatte (rifpl) und eine Blutagar-Platte ausgestrichen. Die Kontrollen wurden unverdünnt auf eine Selektivagarplatte (rifpl), eine Blutagar-Platte und eine BHI Selektivagarplatte mit Vancomycin ausplattiert. *A. actinomycetemcomitans* 29523 wurde einmal unverdünnt auf eine Blutagar-Platte und eine BHI Selektivagarplatte, sowie einmal 1:10 verdünnt auf eine Blutagar-Platte ausgestrichen.

Beim *P. gingivalis*-Experiment wurden je 100 µl dieser Suspension unverdünnt auf zwei Schaedler-Platten ausgestrichen.

Nach 3-5 Tagen im Brutschrank unter mikroaerophilen bzw. anaeroben Bedingungen wurden die Bakterien nach Aussehen und beurteilt und vielversprechende Kolonien wurden selektiert, neu ausplattiert oder, wenn genug Kolonien vorhanden waren, in 0,5 ml Reaktionsgefäße mit Aqua dest. für eine anschließende PCR Verifizierung geimpft. *P. gingivalis* wurde nicht in Aqua dest. überführt, in diesem Fall erfolgte eine DNS Aufreinigung von der Platte (siehe 2.6.2.1).

### 2.6.1.3 Anzahl und Zeitpunkt der Abstriche

Beim *A. actinomycetemcomitans*-Experiment 1 wurden insgesamt 4 Abstriche genommen, die zwischen 12 bis 20 Tagen auseinander lagen. Bei den *A. actinomycetemcomitans*-Experimenten 2 und 3 wurden jeweils 3 Abstriche genommen, die ebenfalls 14 Tage auseinander lagen. Beim *P. gingivalis*-Experiment wurden 3 Abstriche genommen, die 14 Tage auseinander lagen. In der Tabelle 4 sind Zeitpunkte und Anzahl der Tiere von denen Abstriche entnommen wurden aufgeführt.

Tabelle 4: Anzahl der Abstriche für die verschiedenen Experimente mit Zeitpunkt und Anzahl der Tiere von denen der Abstrich gewonnen wurde.

Abstrich Nummer	Zeitpunkt (nach letzter Infektion)	Anzahl der Mäuse
<b><i>A. actinomycetemcomitans</i>-Experiment 1</b>		
1	15 Tage	46
2	35 Tage	46
3	57 Tage	24
4	69 Tage	24
<b><i>A. actinomycetemcomitans</i>-Experiment 2 und 3</b>		
1	10 Tage	16
2	22 Tage	16
3	34 Tage	16
<b><i>P. gingivalis</i>-Experiment</b>		
1	14 Tage	18
2	28 Tage	18
3	41 Tage	18

### 2.6.2 Molekularbiologische Nachweise von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis*

#### 2.6.2.1 Präparation von *Porphyromonas gingivalis*-DNS

Die Präparation der *P. gingivalis*-DNS wurde nach den Anweisungen des Herstellers Firma QIAGEN (siehe 2.1.5) mit einem DNSMiniKit durchgeführt.

## 2.6.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

### 2.6.2.2.1 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-Primer

- a\_act\_forward: 5'-AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC-3'
- a\_act\_reverse: 5'-ATG CCA ACT TGA AGT TAA AT-3'

Die zu erwartende Amplikonlänge beträgt 557 Basenpaare. [79]

*Porphyromonas gingivalis*-Primer

- P.g. forward: 5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3'
- P.g. reverse: 5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT-3'

Die zu erwartende Amplikonlänge beträgt 404 Basenpaare. [80]

### 2.6.2.2.2 Ablauf der PCR

Für die qualitative *in vitro* DNS-Amplifikation mit Hilfe der PCR wurden Oligonukleotide (s.o.) als Primer eingesetzt und mit Hilfe einer thermostabilen DNS-Polymerase Sequenzabschnitte des 16S-rRNS-Gens vervielfältigt.

Der Standard-Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Tabelle 5: Standard-Reaktionsansatz der PCR

	Konzentration	Ansatz für A.a.:	Ansatz für P.g.:
<b>Aqua dest.</b>	1:1	30,6µl	20µl
<b>dNTPs</b>	125 mM	5µl	8µl
<b>10x Reaktionspuffer</b>		5µl	5µl
<b>Primer forward</b>	10 pmol/µl	1µl	5µl
<b>Primer reverse</b>	10 pmol/µl	1µl	5µl
<b>Taq-DNS-Polymerase</b>	5 U /µl	0,4µl	0,4µl
<b>DNS-Matrize</b>		7µl	10µl

Die DNS von *P. gingivalis* wurde mittels der unter 2.6.2.1 beschriebenen Art und Weise präpariert. Für *A. actinomycetemcomitans* war keine Aufreinigung notwendig, sodass die DNS direkt aus der bei den Abstrichen gewonnenen Suspension entnommen werden

konnte. Die Komponenten der Ansätze wurden in ein Reaktionsgefäß (0,5 ml) pipettiert und unter Verwendung des nachfolgend beschriebenen PCR-Programms in einem Thermocycler amplifiziert.

Reaktionsprogramm für *A. actinomycetemcomitans*:

1. Denaturierung		5 m. 94°C	
2. Amplifikation	a. Denaturierung	30 s. 94°C	} 35x
	b. Anlagerung der Primer	30 s. 55°C	
	c. DNS-Synthese	30 s. 72°C	
3. Elongation		7 m. 72°C	
4. Aufbewahrung		4°C	

Reaktionsprogramm für *P. gingivalis*:

1. Denaturierung		2 m. 94°C	
2. Amplifikation	a. Denaturierung	15 s. 94°C	} 35x
	b. Anlagerung der Primer	15 s. 60°C	
	c. DNS-Synthese	45 s. 72°C	
3. Elongation		5 m. 72°C	
4. Aufbewahrung		4°C	

### 2.6.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der DNS-Fragmente nach ihrer Länge zu analytischen Zwecken erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel in TAE-Puffer. Sie wurden mit einer Laufzeit von 20 min. und einer Spannung von 123 V durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit dem Farbmarker Bromphenolblau versetzt, der die Lauffront der Elektrophorese markierte. Nach der Auftrennung der DNS wurde das eingelagerte Ethidiumbromid (siehe 2.1.5) durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Eine Positivprobe wurde immer mitgeführt, um die korrekte Einordnung der DNS-Banden zu gewährleisten. Zur Dokumentation wurde die Gerät-Software Kombination BioDocAnalyse 2.1 von Biometra verwendet.



### **2.6.3 Bestimmung des Antikörpertiter bei *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infizierten Tieren**

#### **2.6.3.1 Blutentnahme**

Kurz vor ihrer Tötung wurde den Tieren retroorbital mit einer Glaskanüle Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Es wurden ca. 200 µl Blut entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Das Vollblut wurde daraufhin bei 10 ° C mit 8000 U/min. (Rotor 00972) für 10 min. abzentrifugiert und der serumhaltige Überstand in 0,5 ml Reaktionsgefäßen pipettiert und bei -20 ° C eingefroren.

#### **2.6.3.2 ELISA**

Um 96-Well-Mikrotiterplatten mit *A. actinomycetemcomitans*-Antigen zu beschichten, wurde *A. actinomycetemcomitans* 1005 auf Blutagar-Platten angezüchtet und mit je 3 ml PBS pro Platte, durch Ablösung mit einem Baumwolltupfer, abgeschwemmt. Es wurde die optische Dichte bei 650 nm gemessen und die CFU mit einer Verdünnungsreihe bestimmt. Die Bakterien wurden für 30 min. bei 80 ° C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Eine Sterilkontrolle wurde auf eine Blutagar-Platte ausplattiert und unter mikroaerophilen Bedingungen bebrütet.

Die Beschichtung von 96-Well-Mikrotiterplatten erfolgte mit 20 µl inaktivierter Bakteriensuspension. Die Platten wurden bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Absättigung mit 150 µl 1 %igem BSA pro Well für 30-60 min. bei Raumtemperatur. Nach der Absättigung wurde das BSA aus den Platten ausgeklopft und die Platten bei -20°C eingefroren.

Das zu testende Serum wurde mit PBS auf 1:100 verdünnt und in die erste Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Das Serum wurde dann in einer Reihe der 96-Well Platte 1:2 verdünnt.

Arbeitsablauf:

1. Die beschichteten Platten wurden aufgetaut und 1 x mit PBS gewaschen.
2. In Doppelansätzen wurden je 20 µl der vorbereiteten Verdünnungsreihen in die beschichteten Platten pipettieren, als Leerkontrolle wurde BSA mitgeführt.
3. Die Platten wurden bei Raumtemperatur (ca. 18 – 21 ° C) für 2 Stunden inkubiert, und anschließend dreimal mit PBS waschen.

4. 20 µl gebrauchsfertiger Antikörper wurden (IgG Gesamt Goat-anti-Mouse mit 1 % BSA auf 1:100 verdünnt) in jedes Well geben.
5. Inkubation bei Raumtemperatur (ca. 18 – 21 ° C) für eine Stunde, anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen.
6. 20 µl POD (siehe 2.1.3) wurden je Well pipettieren.
7. 15 min. Inkubation bei Raumtemperatur, dann wurde dreimal mit PBS gewaschen.
8. Während der 15 minütigen Inkubation wurde frisches Substrat wie folgt angesetzt (für eine 96-Well-Mikrotiterplatte): 8 mg Phenylenediaminedihydrochlorid mit 20 ml frisch angesetztem Puffer (12,85 ml 0,2 M Natriumhydrogenphosphat + 12,15 ml 0,1 M Citronensäure-Monohydrat + 25 ml Aqua dest.) vermischen und direkt vor der Verwendung 8 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hinzugeben.
9. 200 µl dieses Substrats in jedes Well pipettieren.
10. 20 min. Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln.
11. Bei 450 nm Messung der Platten im ELISA-Reader Multiskan EX, Thermo.

Die Ergebnisse wurden im Programm Microsoft Excel dargestellt. Für die Auswertung wurde die erste Verdünnungsstufe herangezogen (1:100) und die Mittelwerte mit Standardabweichung verglichen.

Die Gruppeneinteilung der Mäuse erfolgte wie unter Punkt 2.5 und der

Tabelle 3 beschrieben.

## **2.7 Messmethoden zur Bestimmung des Knochenabbaus**

### **2.7.1 Töten der Mäuse**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und anschließend dekapitiert.

### **2.7.2 Mazeration des Mäuseschädels**

Die Mazeration erfolgte wie von Kuhr *et al.* [55] beschrieben, mit leichten Modifikationen.

Der Schädel wurde in der sagitalen Ebene geteilt und alternierend wurde die linke oder rechte Seite mit einem Einmalskalpell entfleischt. Die andere Seite wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Es wurde darauf geachtet, dass der Alveolarfortsatz und die Zähne nicht beschädigt wurden. Der entfleischte Schädel wurde 1 Woche in Leitungswasser bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  biologisch mazeriert und danach mit 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 6 Stunden sowie 1 %  $\text{NaHCl}$  für 10 min. chemisch mazeriert.

#### **2.7.2.1 Färbung mit Toluidinblau**

Die Färbung des Alveolarfortsatzes erfolgte mit Toluidinblau 1:1 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, um die Schmelz-Zement-Grenze sichtbar zu machen. Die Färbezeit betrug 10 min. und wurde in den Vorversuchen ermittelt. Nach der Färbung wurden die Kiefer luftgetrocknet.

#### **2.7.2.2 Einscannen der Mäusekiefer**

Mit einem Auflichtmikroskop, kombiniert mit einer Farb-Videokamera, der Bildanalyse-Software *analySIS 3.0* sowie einem Computers wurden Bilder der bukkalen und palatinalen Seite der Oberkieferzähne aufgenommen und ausgewertet (Abbildung 5).

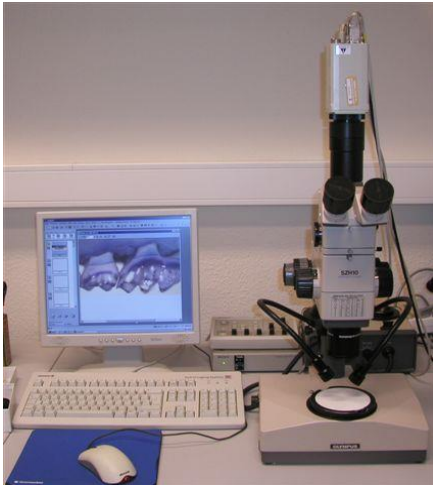


Abbildung 5: Digitales Auflichtmikroskop mit angeschlossenem PC zur morphometrischen Vermessung der aufbereiteten Kiefer; Quelle: Das Foto wurde freundlicherweise von Kerstin Scholz, Parodontologie Greifswald, zur Verfügung gestellt

Um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten, wurden die Zähne so ausgerichtet, dass die disto-palatinale und disto-bukale Höckerspitze des zweiten Molaren auf einer horizontalen Ebene lagen. Es wurde darauf geachtet, dass die Interdentalräume zwischen 1. und 2., sowie 2. und 3. Molaren frei durchgängig waren. Unter diesen Bedingungen konnte für alle Kiefer die gleiche Aufnahmeposition unabhängig vom Durchführenden eingestellt werden.

Unter 70-facher Vergrößerung im Live-Bild-Modus der Kamera wurden diese Parameter eingestellt und dann drei Teilbilder aufgenommen, die mit Hilfe der Software analysis → Multiple-Image-Alignment zu einem Bild zusammengefügt wurden. Jede der drei Einzelaufnahmen zeigte dabei einen Teil der Zahnreihe, wobei sich die Einzelbilder leicht überschneiden, damit das Programm übereinstimmende Bereiche finden konnte. Das so entstandene „Panoramabild“ der Zahnreihe wurde dann gespeichert.

### **2.7.2.3 Morphometrische Vermessungsmethode**

Die Messreihenfolge war vom 3. zum 1. Molaren an jeweils 6 Messstrecken auf der palatinalen sowie bukkalen Seite des Kiefers. 6 definierte Punkte auf jeder Seite waren Orientierungspunkt (ORP) für die Strecken. ORP waren am 3. Molar der distale Übergang des Höckers zur distalen Randleiste und die mesiale Höckerspitze bzw. der Mittelpunkt des Höckers. Am zweiten Molar die mesialen und distalen Höckerspitzen und am ersten Molar die distale Höckerspitze und die mesiale Schmelz-Zement-Grenze

(SZG). In senkrechter oder diagonaler Verlängerung dieser Orientierungspunkte erfolgte die Messung ab der SZG, entweder senkrecht oder markanten Konturen der Zahnwurzel folgend, zum Alveolarknochenrand (AKR).

Genaue Beschreibungen der Messstrecken sind aus

Tabelle 6 und Tabelle 7 ersichtlich:

### Bukkal

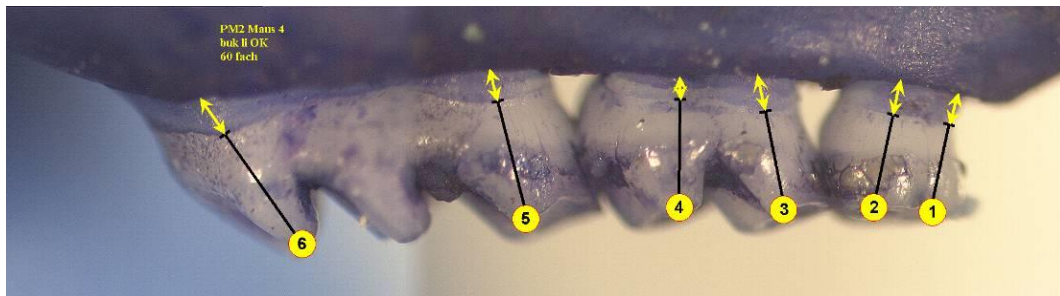


Abbildung 6: Auflichtmikroskopaufnahme, 60fach vergrößert, der bukkalen Seite des Mäusekiefers. Die gelben Pfeile stellen die zu vermessenen Strecken dar. Die Zahlen sind die Referenzpunkte zum Wiederfinden der Messstrecken an allen Tieren und die Kennzeichnung der Anzahl der Messstrecken.

Tabelle 6: Beschreibung der bukkalen Messstrecken an den untersuchten Zähnen. ORP= Orientierungspunkt (Gelber Kreis mit Zahl), SZG= Schmelz-Zement-Grenze, AKR= Alveolarknochenrand

Nr.	Zahn	Beschreibung
1	3. Molar	vom ORP 1 vertikal zur SZG, ab dort senkrecht zum AKR
2	3. Molar	vom ORP2 vertikal zur SZG, ab dort vertikal zum AKR
3	2. Molar	vom ORP 3 diagonal zur SZG, von dort vertikal zum AKR
4	2. Molar	vom ORP 4 leicht diagonal zur SZG, von dort vertikal zum AKR
5	1. Molar	vom ORP vertikal zur SZG, von dort den Wurzelkonturen folgend zum AKR
6	1. Molar	vom ORP 6 der mesialen Wurzelkontur folgend zum AKR

### Palatinal

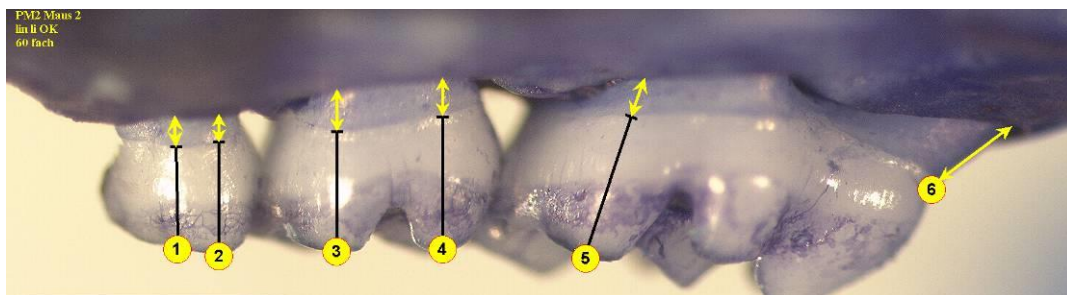


Abbildung 7: Auflichtmikroskopaufnahme, 60fach vergrößert, der palatinalen Seite des Mäusekiefers. Die gelben Pfeile stellen die zu vermessenen Strecken dar. Die Zahlen sind die Referenzpunkte zum Wiederfinden der Messstrecken an allen Tieren und die Kennzeichnung der Anzahl der Messstrecken.

Tabelle 7: Beschreibung der palatinalen Messstrecken an den untersuchten Zähnen. ORP= Orientierungspunkt (Gelber Kreis mit Zahl), SZG= Schmelz-Zement-Grenze, AKR= Alveolarknochenrand

Nr.	Zahn	Beschreibung
1	3. Molar	vom ORP 1 senkrecht zur SZG, ab da vertikal zum AKR
2	3. Molar	vom ORP 2 vertikal zur SZG, ab dort vertikal zum AKR
3	2. Molar	vom ORP 3 senkrecht zur SZG, von dort vertikal zum AKR
4	2. Molar	vom ORP 4 senkrecht zur SZG, von dort vertikal zum AKR
5	1. Molar	vom ORP 5 diagonal zur SZG, von dort diagonal AKR
6	1. Molar	vom ORP 6 der mesialen Wurzelkontur folgend zum AKR

## 2.8 Fehlerbestimmung und Reproduzierbarkeit

Da alle Messungen der Stecken freihand mit Hilfe des Bildanalyseprogramms *analySIS Build* erfolgten, war es notwendig, den eigenen Messfehler und die Reproduzierbarkeit der Messmethode zu bestimmen. Zur Bestimmung des eigenen Messfehlers wurde am Beispiel des dritten bukkalen Messpunktes des Kiefers der Maus 02 die Messung 20 mal wiederholt und die Daten in einer Excel Tabelle aufgelistet und ausgewertet. Außerdem wurden an 6 verschiedenen Kiefer alle Messpunkt zu zwei Zeitpunkten, welche 7 Tage auseinander lagen, vermessen. Für die Messung der Reproduzierbarkeit wurden alle 12 Messpunkte an allen Kiefern von 2 Untersuchern und eine Teilstichprobe von einem dritten Untersucher vermessen.

Die teilweise bis auf die zweite Stelle hinter dem Komma übereinstimmenden Messwerte an verschiedenen Zeitpunkten sind auf die Messsoftware zurückzuführen. Dazu eine Erläuterung: Das aufgenommene Bild besteht aus einzelnen Pixeln. Eine Strecke bzw. ein Umfang auf dem Bild wird als Abstand zwischen dem Pixel am Anfang der Strecke und dem Pixel am Ende der Strecke gemessen. Jeder Mikroskopvergrößerung ist eine bestimmte Pixelbreite und Pixelhöhe zugeordnet. Der gemessene Wert kann also immer nur ein Vielfaches der Pixelbreite bzw. Pixelhöhe der jeweiligen Vergrößerung sein und nicht jede beliebige Zahl einnehmen.

Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms *SPSS* ausgewertet. In einem Bland-Altman-Diagramm fand der Vergleich der drei Untersucher satt.

Des Weiteren wurde mit Hilfe von *SPSS* der Intra-Klassen-Korrelationskoeffizient (ICC) berechnet. Dieser ist ein Maß der Übereinstimmung von Messwerten bzw. für die Zuverlässigkeit (Reliabilität) einer Messmethode.

Die ICC basiert auf einem varianzanalytischen Ansatz. Man unterscheidet zwischen der Varianz *zwischen* den Messwerten, die teilweise auf eine systematische Merkmalsvariation zurückgeführt wird, und der Varianz *innerhalb* der Messwerte, die auf eine mangelhafte Beobachterübereinstimmung hinweist. Man spricht auch von einer Fehlervarianz.

Sind bei geringer Varianz *innerhalb* der Beobachtungsfälle gleichzeitig die Unterschiede *zwischen* den Beobachtungsfällen relativ groß, so kann von einer zuverlässigen Beobachtung ausgegangen werden.



Bei einer perfekten Reliabilität ist ICC=1, d.h. die Beobachter haben durchgehend die gleichen Messwerte beobachtet und die Beobachtersvarianz ist Null. Bei nicht vorhandener Reliabilität geht die ICC gegen 0.

## 2.9 Statistische Methoden

Zunächst wurde mittels multivariater Varianzanalysen untersucht, ob sich die gemessenen Attachmentverlust-Werte hinsichtlich Messpunkt (1 bis 6), Fläche (bukkal, palatinal) und Stamm (für AA 3 Gruppen, für P.g. 2 Gruppen, jeweils plus Kontrollgruppe) unterscheiden. Aufgrund globaler statistischer Signifikanz ( $p < 0,05$ ) der Faktoren „Messpunkt“ und „Fläche“ sowie des Interaktionsterms „Messpunkt\*Fläche“ wurden in einem weiteren Schritt homogene Gruppen für die Messpunkte innerhalb der Flächen bestimmt (Post-hoc-Tests). Bei gleichen Varianzen innerhalb der Gruppen wurde als Post-Hoc-Test der Tukey-HSD-Test gewählt, bei ungleichen Varianzen der Dunnett-T3-Test.

Weitere Varianzanalysen bezüglich des Einflusses von „Stamm“ auf die abhängige Variable „Attachmentverlust“ wurden separat für die Flächen und Messpunkte durchgeführt.

Um Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten (nach 5 und nach 10 Wochen bzw. nach 6 Wochen) hinsichtlich der gemessenen Attachmentverluste an den einzelnen Messpunkten (6 bukkal und 6 palatinal) zu finden, wurden Varianzanalysen durchgeführt. Der Vergleich der Stämme in Bezug auf die abhängige Variable (AV) erfolgt mittels varianzanalytischer Methoden.

In einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit dem festen Faktor „Stamm“ wird folgende Nullhypothese überprüft: „Es gibt keinen Unterschied zwischen den Stufen des Faktors „Stamm“. Nur wenn beim globalen Test des Faktors „Stamm“ statistische Signifikanz ( $p < 0,10$ ) vorliegt, werden in einem zweiten Schritt die einzelnen Stämme untereinander verglichen (Post-hoc-Tests). Bei gleichen Varianzen innerhalb der Gruppen wird als Post-Hoc-Test der Bonferroni-Test gewählt, welcher die Fehlerrate für jeden Test auf den Quotienten aus der experimentellen Fehlerrate und der Gesamtanzahl der paarweisen Tests anpasst. Als Kennwerte werden Mittelwert und Standardfehler sowie das 95 %-Konfidenzintervall angegeben.

Der Intra-Klassen-Korrelation ist ein parametrisches statistisches Verfahren zur Quantifizierung der Übereinstimmung (Interrater-Reliabilität) zwischen mehreren

Beurteilern (Ratern) in Bezug auf mehrere Beobachtungsobjekte. Das dazugehörige Maß, der Intra-Klassen-Korrelationskoeffizient (engl. Intra-Class-Correlation oder ICC) setzt intervallskalierte Daten voraus und wird in der Regel berechnet, wenn mehr als zwei Beobachter vorhanden sind oder/und mehrere Beobachtungszeitpunkte miteinander verglichen werden sollen.

Zur Bestimmung der Interrater-Reliabilität wird die Varianz zwischen verschiedenen Ratings in Bezug auf dasselbe Messobjekt (=Beobachtungsgegenstand, Fall, Person/Merkmalsträger usw.) verglichen mit der über alle Ratings und Messobjekte entstandenen Varianz.

Von einer reliablen Beobachtung kann ausgegangen werden, wenn die Unterschiede zwischen den Messobjekten relativ groß ist (was auf systematische Unterschiede zwischen den beobachteten Fällen hinweist) und gleichzeitig die Varianz zwischen den Beobachtern in Bezug auf die Messobjekte klein. Bei großer Urteilskonkordanz (also geringer Varianz zwischen den Einschätzungswerten) liegt der ICC dann hoch.

Wie bei anderen Korrelationskoeffizienten kann der ICC Werte zwischen -1.0 (in der Praxis werden i.d.R. Werte  $> 0.0$  gemessen) und +1.0 annehmen. Im Streudiagramm für die beiden Messwerte bedeutet der Intraklassenkorrelationskoeffizient ICC die Abweichung der Werte von der Winkelhalbierenden [81-86].

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Kolonisation der Maulhöhle mit den Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis***

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Kolonisationsfähigkeit der eingesetzten Bakterien überprüft werden. Um eine erfolgreiche Kolonisation nach Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis* in der Maulhöhle nachzuweisen, wurden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt: Der kulturelle Nachweis mittels Anzucht (aus dem Abstrich aus der Maulhöhle) und die darauf folgende molekularbiologische Bestätigung des kulturellen Nachweises mittels PCR-Verfahren (siehe 2.6).

#### **3.1.1 Kolonisationsnachweis von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in der Maulhöhle nach Infektion**

Es wurde mit zwei Bakterienstämmen, *A.a.* 1005 und *A.a.* 29523, sowie zwei Inokulationsarten, Gavage und Futter, gearbeitet. *A.a.* 1005 wurde einmal per Gavage und einmal per Futter inokuliert. *A.a.* 29523 wurde per Gavage inokuliert. Es wurden 4 Abstriche nach der Infektion aus der Maulhöhle der Tiere genommen (

Tabelle 8). Nach der Entnahme der Abstriche zum Kolonisationsnachweis konnten bei 12 von 36 infizierten Mäusen während der Inkubationszeit *A. actinomycetemcomitans* aus der Maulhöhle auf Blutagar-Platten und Selektivplatten kultiviert und mittels PCR-Verfahren bestätigt werden. (Bsp.: Abbildung 8)

Dies gelang bei 8 Tieren beim Abstrich 1 (15 Tage nach letzter Infektion) und bei weiteren 4 Mäusen beim Abstrich 2 (35 Tage nach letzter Infektion), wobei bei den Abstrichen 3 und 4 (57 beziehungsweise 69 Tage nach letzter Infektion) kein *A. actinomycetemcomitans* mehr kultiviert und per PCR-Verfahren bestätigt werden konnte (

Tabelle 8, Bsp.: Abbildung 8).

Tabelle 8: Kultureller Nachweis mit PCR-Bestätigung von *A. actinomycetemcomitans* in 2 % Agarosegelen nach Färbung mit Ethidiumbromid bei den Tieren aus den 5 Gruppen zu 4 Zeitpunkten. Kein Tier, welches bei Abstrich 1 (15 Tage) positiv war, wurde im Abstrich 2 (35 Tage) erneut positiv getestet. Die positiven Mäuse bei Abstrich 2 sind Mäuse, die im Abstrich 1 noch negativ waren. Nach 57 Tagen und nach 69 Tagen wurde in keinem der Abstriche *A. actinomycetemcomitans* nachgewiesen.

	Abstrich 1	Abstrich 2	Abstrich 3	Abstrich 4
Tage nach der Infektion	15 Tage	35 Tage	57 Tage	69 Tage
Gruppe				
Negativ-Kontrolle n = 11	-	-	-	-
<i>A.a.</i> 1005 Gavage n = 11	1 Tier	1 Tier	-	-
<i>A.a.</i> 1005 Futter n = 12	6 Tiere	2 Tiere	-	-
<i>A.a.</i> 29523 Gavage n = 12	1 Tier	1 Tier	-	-

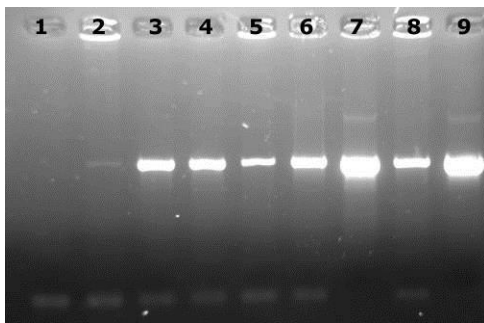


Abbildung 8: Molekularbiologischer (PCR) Nachweises von *A. actinomycetemcomitans* aus dem Experiment 1. In allen auf diesem Bild untersuchten Abstrichen konnte *A. actinomycetemcomitans* nachgewiesen werden, außer in dem Kontrollabstrich. 1= negativ Kontrolle, 2= Experiment 1 Maus14, 3= Experiment 1 M37, 4= Experiment 1 M38, 5= Experiment 1 M39, 6= Experiment 1 M20, 7= Experiment 1 M32, 8= Experiment 1 M17, 9= Positivkontrolle;

Bei den Kontrolltieren konnte erwartungsgemäß zu keinem Zeitpunkt *A. actinomycetemcomitans* rekultiviert werden. Eine Rekultivierung von *A. actinomycetemcomitans* war bei zwei Tieren der Gruppe *A. a.* 1005 Gavage (18,2%) und bei zwei Tier der Gruppe *A. a.* 29523 Gavage (16,6%) erfolgreich (

Tabelle 8). Bei Tieren, die mit *A. a.* 1005 über das Futter infiziert wurden, konnte der Erreger jedoch bei mehreren Tieren nachgewiesen werden (66,6%,

Tabelle 8). Aus keiner Maus, die im Abstrich 1 positiv war, konnte im Abstrich 2 erneut *A. actinomycetemcomitans* rekultiviert werden. Die positiven Mäuse bei Abstrich 2 sind Mäuse, die im Abstrich 1 noch negativ waren.

Da die Infektion, die mit *A. actinomycetemcomitans* 1005 über das Futter erfolgte, am vielversprechendsten waren, wurden für die Reproduktion der Experimente ebenfalls diese Infektionsbedingungen gewählt (Experimente 2 und 3). In Experiment 2 war bei 62,5 % der Tiere eine positive Rekultivierung von *A. actinomycetemcomitans* erfolgreich. Dies gelang allerdings nur beim ersten Abstrich, der 10 Tage nach der letzten Inokulation erfolgte, während bei den Abstrichen nach 22 bzw. 34 Tagen jedoch kein Nachweis mittels kultureller Anzucht und anschließender PCR-Bestätigung mehr gelang.

Im Experiment 3 war bei keinem der infizierten Tiere eine positive Rekultivierung mittels kultureller Anzucht und anschließender PCR-Bestätigung nach dem Abstrich an Tag 10, 22, 34 nach der letzten Infektion erfolgreich.

### 3.1.2 Kolonisationsnachweis von *Porphyromonas gingivalis* in der Maulhöhle nach Infektion

Auch bei *P. gingivalis* wurden zwei Bakterienstämme, *P.g.* 53977 und *P.g.* 20709, eingesetzt. Beide wurden in Anlehnung an das Protokoll von Baker *et al.* [7] per Gavage inokuliert.

Insgesamt wurde bei 3 von 18 Mäusen während der Inkubationszeit *P. gingivalis* aus der Maulhöhle isoliert (Tabelle 9) und mit der PCR via Gelelektrophorese identifiziert (Abbildung 9).

Tabelle 9: kultureller Nachweis mit PCR-Bestätigung von *P. gingivalis* in den 3 Gruppen zu 3 Zeitpunkten. 41 Tagen nach Infektion mit *P.g.* 53977 konnte bei zwei Tieren und bei Infektion mit *P.g.* 20709 bei einem Tier eine erfolgreiche Kolonisation gezeigt werden. In der Kontrollgruppe wurde kein *P. gingivalis* gefunden.

	Abstrich 1	Abstrich 2	Abstrich 3
<b>Tage nach Infektion</b>	<b>14 Tage</b>	<b>28 Tage</b>	<b>41 Tage</b>
<b>Gruppe</b>			
<b>Kontrolle n = 6</b>	-	-	-
<b><i>P.g.</i> 53977 Gavage n = 6</b>	-	-	2 Tiere
<b><i>P.g.</i> 20709 Gavage n = 6</b>	-	-	1 Tier



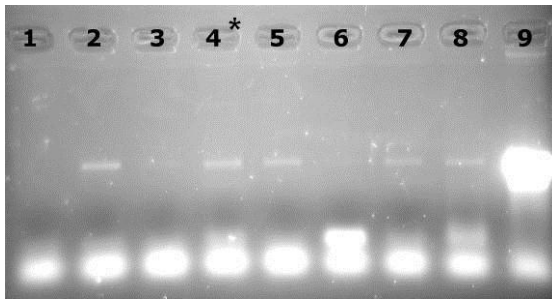


Abbildung 9: Molekularbiologischer (PCR) Nachweis von *P. gingivalis* bei Tieren aus den 3 Gruppen beim letzten Abstrich nach 41 Tagen. Bei 4 von 6 Tieren wurde auf diesem Bild ein positiver Nachweis erbracht. 1= negativ Kontrolle, 2= *P.g.* 53977, 3= *P.g.* 20709, 4= Maus62 (Tier aus der Kontrollgruppe), 5= M53, 6= M54, 7= M56, 8= M49, 9= positiv Kontrolle; 4\* = eine Verunreinigung während des PCR-Verfahrens, diese Probe wurde nochmals nachgeprüft, wobei sie dann negativ ausfiel. (Daten nicht abgebildet)

Bei allen drei Tieren erfolgte der kulturelle Nachweis mit PCR-Bestätigung beim dritten Abstrich (41 Tage nach der letzten Infektion) wie in Tabelle 9 dargestellt.

### 3.2 Nachweis von Serum-Antikörpern gegen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nach Infektion

Am Beispiel von *A. actinomycetemcomitans* sollte im Rahmen dieser Arbeit abschließend untersucht werden, ob nach der oralen Applikation der Erreger eine nachweisbare systemische humorale Immunantwort entwickelt wird. Zu diesem Zweck wurde den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten (T1 und T2) nach der Infektion Serum entnommen und auf Antikörper gegen *A. actinomycetemcomitans* getestet. Ein leichter Titeranstieg konnte nach 5 Wochen bei der *A.a.* 1005 Gavage Gruppe und bei der *A.a.* 29523 Gavage Gruppe festgestellt werden. Bei der Futtergruppe war zu diesem Zeitpunkt noch keinen Anstieg nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigt die Auswertung der *A. actinomycetemcomitans* Experimente 2 und 3, bei denen nur mit Inokulation mittels Futter gearbeitet wurde, nach 5 Wochen schon eine tendenzielle Entwicklung eines Titers in der Futter Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 10).

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, konnte nach 10 Wochen jedoch ein eindeutiger Titer bei der *A.a.* 1005 Futter Gruppe festgestellt werden. Im Vergleich der infizierten Tiere mit der Kontrollgruppe zeigte sich, dass die Tiere der *A.a.* 1005 Futter Gruppe nach 10 Wochen einen deutlich höheren Titer entwickelten, als die Tiere der *A.a.* 1005 Gavage Gruppe oder der *A.a.* 29523 Gavage Gruppe.

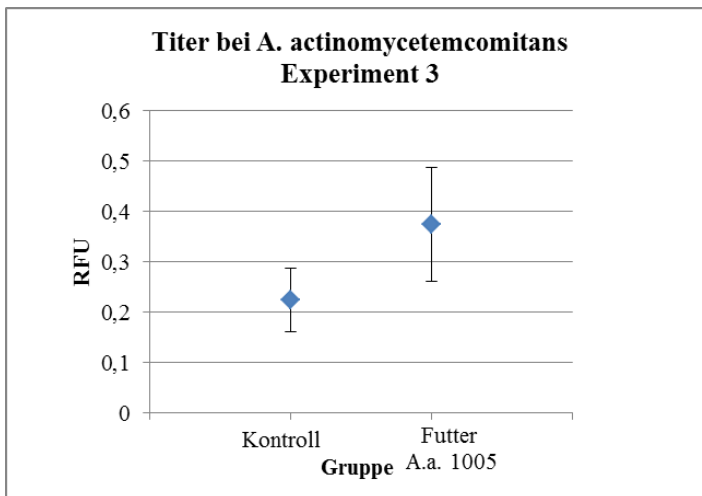


Abbildung 10: Der Antikörpertiter (Mittelwert und Standardabweichung) der infizierten Gruppe A.a. 1005 Futter ( $0,38 \pm 0,11$ ) zeigt eine tendenzielle d.h. nicht signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe ( $0,22 \pm 0,06$ ).

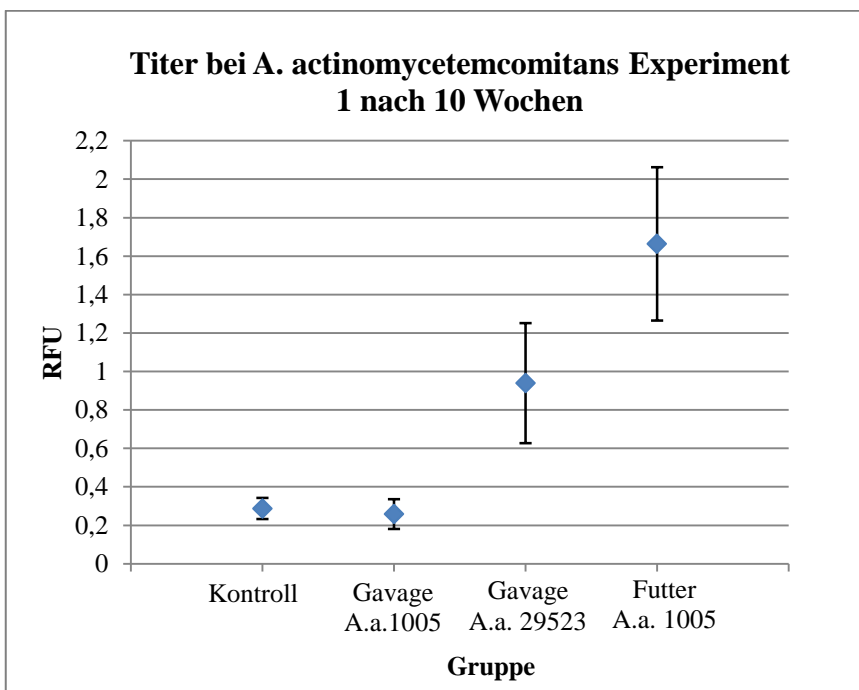


Abbildung 11: Antikörpertiter im *A. actinomycetemcomitans* Experiment 1 (Mittelwert und Standardabweichung). Die Futtergruppe ( $1,66 \pm 0,4$ ) hat einen eindeutig signifikant erhöhten Titer gegenüber der Kontrollgruppe ( $0,28 \pm 0,06$ ) sowie gegenüber der Gavage A.a. 1005 Gruppe ( $0,26 \pm 0,08$ ). Der Titer der A.a. 29523 Gruppe ( $0,94 \pm 0,31$ ) ist ebenfalls signifikant erhöht.

### 3.3 Knochenabbau nach der Infektion

Im zweiten Teil der Arbeit sollte herausgefunden werden, ob die Bakterien nach der Kolonisation nun auch einen Knochenabbau im Sinne einer Parodontitis marginalis verursacht haben. Die resultierenden Messergebnisse wurden getrennt nach den inokulierten Bakterien betrachtet und die ermittelten Intra-Klassen-Korrelation sowie die Inter- und Intra-rater Vergleiche gezeigt. (Erläuterungen siehe 2.9)

#### 3.3.1 Erzielter Knochenabbau nach Infektion mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in den verschiedenen Gruppen

Um den Einfluss einer Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* auf den Knochenabbau zu untersuchen, wurden Bakterien der Stämme *A.a.* 1005 per Gavage und per Inokulation mittels Futter sowie *A.a.* 29523 per Gavage den Tieren verabreicht. Die Quantifizierung des Knochenverlustes erfolgte mittels morphometrischer Messung mit einem Auflichtmikroskop. Wie schon in Material und Methoden (2.7.2.3) erläutert, wurden pro Kieferhälfte 12 Messungen vorgenommen, um den alveolären Knochenverlust zu vermessen. Die Daten der verschiedenen Stämme und Inokulationsmethoden wurden daraufhin miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass es zu einem signifikant höheren Knochenabbau 10 Wochen nach der Inokulation von *A.a.* 1005 über das Futter im Vergleich zur Kontrolle kam ( $p= 0.0497$ ). Eine positive Tendenz gegenüber der Kontrollgruppe ist in der *A.a.* 1005 Gavage Gruppen 10 Wochen ( $p= 0.083$ ) erkennbar. In den Gruppen *A.a.* 1005 Gavage nach 5 Wochen, *A.a.* 1005 Futter nach 5 Wochen und *A.a.* 29523 nach 5 und 10 Wochen konnten kein Anstieg des Knochenabbaus festgestellt werden (siehe Abbildung 12).

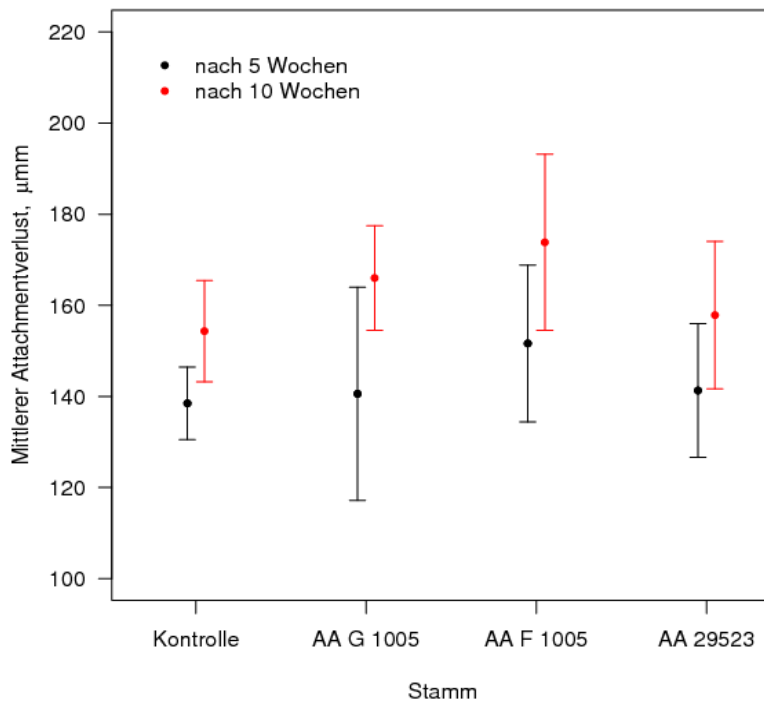


Abbildung 12: Darstellung des mittleren Knochenabbaus (Mittelwert und Standardabweichung in  $\mu\text{m}$ ) für alle Gruppen (G= Gavage, F= Futter, AA29523 wurde per Gavage inokuliert) und beide Infektionszeiträume im *A. actinomycetemcomitans*-Experiment 1. Es besteht zum Zeitpunkt 10 Wochen bei *A.a.* F 1005 ein signifikanter Unterschied des Knochenabbaus gegenüber der Kontrollgruppe. In den anderen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied im Knochenabbau zur Kontrollgruppe zu keinem der beiden Zeitpunkte (5 und 10 Wochen).

In der Tabelle 11 und der Tabelle 12 (siehe Anhang 9.1) wurde der Knochenabbau nach 5 Wochen und nach 10 Wochen in Bezug auf den Messpunkt und die bukkale oder palatinale Seite des Kiefers aufgetragen.

### 3.3.2 Erzielter Knochenabbau nach Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* in den verschiedenen Gruppen

Um den Einfluss einer Infektion mit *P. gingivalis* auf den Knochenabbau zu untersuchen, wurden Bakterien der Stämme *P.g.* 53977 und *P.g.* 20709 per Gavage inokuliert. 42 Tagen nach der ersten Infektion wurden die Tiere getötet und es wurden an 12 definierten Stellen pro Kieferhälfte Messungen des Knochenabbaus vorgenommen. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, gab es einen tendenziell höheren Knochenabbau bei Mäusen die mit *P. g.* 53977 infiziert wurden ( $p= 0.25$ ), der allerdings bei der geringen Anzahl untersuchter Tiere statistisch nicht signifikant ist. Die Tiere, die mit *P.g.* 20709

infiziert wurden, zeigten kein Knochenabbau. (Siehe auch Anhang 9.1 für die gemessenen Werte in Tabelle 13.)

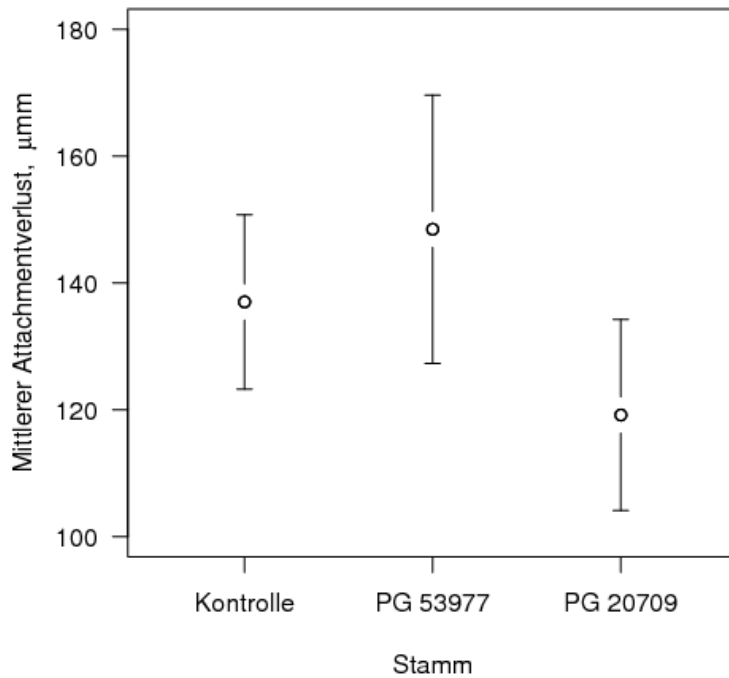


Abbildung 13: Darstellung des mittleren Knochenabbaus (Mittelwert und Standardabweichung in  $\mu\text{m}$ ) für alle Gruppen des *P. gingivalis*-Experiments. Es konnte kein signifikant erhöhter Knochenabbau in den infizierten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden.

### 3.3.3 Ergebnisse der Reproduzierbarkeit der Messungen des Knochenabbaus

#### 3.3.3.1 Ergebnisse zur Bestimmung des eigenen Messfehlers

Für die Bestimmung des eigenen Messfehlers wurde der bukkale Messpunkt 3 der Maus 2 20-mal von einem Untersucher vermessen. In der Tabelle 15 (siehe Anhang 9.1) sind die einzelnen Daten zur Fehlerbestimmung aufgelistet.

Für die Bestimmung der Intra-Rater-Reliabilität wurden bei 6 Kiefern alle 12 Messpunkte zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen. Die zwei Messungen erfolgten mit einem zeitlichen Abstand von 7 Tagen. Als Beispiel sind in der Tabelle 10 die Werte für alle Messpunkte eines Kiefers dargestellt. Die anderen Messungen sind in Tabelle 16: Intra-Rater-Reabilität im Anhang 9.1 aufgelistet.

Tabelle 10: Bukkale und palatinale Messwerte eines Kiefers zu zwei verschiedenen Zeitpunkten von einem Untersucher vermessen (mit Mittelwerten und Standardabweichung).

<b>Maus 2 Bukkal</b>	<b>Messpunkt</b>	<b>Zeitpkt 1</b>	<b>Zeitpkt 2</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
	1	89,9	97,1	93,5	5,1
	2	95,9	101,6	98,8	4
	3	103,8	103,9	103,8	0,01
	4	110,7	119,6	115,2	6,3
	5	111,3	103,9	107,6	5,3
	6	130,8	136,7	133,7	4,1
<b>Maus 2 Palatinal</b>	<b>Messpunkt</b>	<b>Zeitpkt 1</b>	<b>Zeitpkt 2</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
	1	76,5	81,3	78,9	3,4
	2	79,7	90,3	85	7,5
	3	142,2	149	145,6	4,8
	4	137,7	128,7	133,2	6,4
	5	166,3	159,9	163,1	4,6
	6	380,5	352,2	366,4	20

Mit Hilfe des „Two-way mixed Anova Tests“ wurden alle Messpunkte mit denselben Messpunkten auf den anderen 6 Kiefern verglichen und Mittelwert sowie Standardabweichungen ermittelt (Tabelle 17 im Anhang 9.1).

Bei den Messungen an zwei Zeitpunkten wurde eine ICC von 0,997 (0,996-0,998) erreicht. (Der ICC kann Werte von -1 (keine Übereinstimmung) bis +1 (totale Übereinstimmung) annehmen.)

### **3.3.3.2 Reproduzierbarkeitsmessungen durch drei Untersucher**

Um die Anwendbarkeit der Messmethode für andere Untersucher gewährleisten zu können, wurde die Reproduzierbarkeit bestimmt. Es wurde der Intraclass Correlation Coefficient (ICC) ermittelt, wobei von 22 Flächen (palatinal oder bukkal) die jeweiligen 6 Messstrecken durch drei Untersucher vermessen und verglichen wurden (Tabelle 18 im Anhang 9.1). Die Werte für die jeweiligen Messpunkte von allen drei Untersuchern sind in Tabelle 19 im Anhang 9.1 nebeneinander gestellt.

Die niedrigste Übereinstimmung findet sich bei Messpunkt 3 mit dem ICC = 0,8599 und die höchste bei Messpunkt 6 mit dem ICC = 0,9337.

### **ICC für Interrater**

Der ICC Gesamt ist 0,908. Das ist eine gute Übereinstimmung zwischen den Daten aller Untersucher (Tabelle 20 im Anhang 9.1).

In der Abbildung 14, der Abbildung 15 und der Abbildung 16, die sich im Anhang 9.1 befinden, ist die Differenz der Messwerte jeweils von zwei unterschiedlichen Untersuchern in Bezug zu dem Mittelwert dargestellt. In den Bland-Altman-Diagrammen wurden Messungen von je zwei Untersuchern gegenüber gestellt, indem die Differenzen zwischen Untersucher 1 und 2, 1 und 3 sowie 2 und 3 gegen den Mittelwert der zu Vergleichenden aufgetragen wurde. Es wurden der Mittelwert, der Mittelwert plus  $1.96 \cdot \text{Standardabweichung}$  und der Mittelwert minus  $1.96 \cdot \text{Standardabweichung}$  (gestrichelte Linien) sowie die Nulllinie eingezeichnet.

Für die Messungen der Strecken zeigten alle drei Untersucher eine gute Übereinstimmung: ICC zwischen 0,880 und 0,931.

## 4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein murines Parodontitis-Modell mit *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* in Anlehnung an mehrere in der Literatur beschriebene Modellen etabliert und charakterisiert. Es wurden hierfür zwei nicht-invasive Inokulationsmethoden, Gavage und Inokulation über das Futter, hinsichtlich der Fähigkeit zur Kolonisierung der Maulhöhle und der Induktion von Knochenabbau miteinander verglichen.

### 4.1 Infektionsmodell mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Da der Stamm *A. actinomycetemcomitans* 1005 in einem Rattenmodell von Schreiner *et al.* [59] erfolgreich eingesetzt wurde, entschieden wir uns, zunächst diesen Stamm in unserem murinen Parodontitis-Modell einzusetzen. Der Stamm weist außerdem eine Rifampicin-Resistenz auf, die zum Selektieren der Bakterien nach dem Maulabstrich von großem Vorteil ist. Wir konnten bei den Mäusen, so wie Schreiner *et al.* [59] bei der Ratte, eine gute Kolonisation der Maulhöhle mittels der Inokulation über das Futter feststellen (Kolonisationsnachweis bei 8 von 12 Tieren). Im Vergleich dazu zeigte die Inokulation mittels Gavage eine weitaus schlechtere Kolonisation der Maulhöhle mit *A.a.* 1005 (Kolonisationsnachweis bei nur 2 von 11 Tieren). Der Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Bakterien bei der Inokulation über das Futter länger in der Maulhöhle verweilen. Während in den Modellen von Fine *et al.* [58] und Schreiner *et al.* [59] noch nach 8 beziehungsweise 12 Wochen *A. actinomycetemcomitans* 1005 bei der Ratte rekultiviert werden konnte, ließen sich die Bakterien in unserem Modell lediglich an Tag 15 und 35 nachweisen, aber nicht mehr an Tag 57 und 69 nach Infektion. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass in einer Übersichtsarbeit von Graves *et al.* [23] beschrieben wird, dass *A. actinomycetemcomitans* sich nur vorübergehend in der Maulhöhle von Mäusen ansiedeln kann. Die Autoren vertreten die These, dass *A. actinomycetemcomitans* einen engen Wirtsbereich hat und Spezies-spezifisch nur an bestimmte Zellen bindet. Unsere Daten zeigen ebenfalls, dass die Besiedelung der Maulhöhle von Mäusen mit *A. actinomycetemcomitans* zwar Initial gelingt, aber möglicherweise nicht dauerhaft anhält, da sich der Erreger nach 8-10 Wochen in der Maulhöhle nicht mehr nachweisen ließ. Diese Daten könnten tatsächlich dafür sprechen, dass sich *A. actinomycetemcomitans* in der Maulhöhle von Ratten leichter ansiedeln kann



als in der Maulhöhle von Mäusen. Dies müsste allerdings in weitergehenden Studien vergleichend weiter untersucht werden.

Nach der erfolgreichen Inokulation wurde auch der erzielte Knochenabbau der *A.a.* 1005 Futter Gruppe mit der *A.a.* 1005 Gavage Gruppe verglichen. Es zeigte sich, dass keine der Gruppen 5 Wochen nach der Inokulation einen signifikanten Anstieg des Knochenabbaus gegenüber der Kontrollgruppe aufwies. Erst 10 Wochen nach der Inokulation gab es einen signifikanten Anstieg in der *A.a.* 1005 Futter Gruppe ( $p=0,0497$ ). In der *A.a.* 1005 Gavage Gruppe war der Knochenabbau zur Kontrollgruppe zwar nicht statistisch signifikant, aber zumindest tendenziell erkennbar ( $p=0,083$ ). Diese Daten zeigen, dass die Art der Inokulation einen großen Einfluss auf die erfolgreiche Etablierung einer Parodontitis hat. Die Inokulation über das Futter stellt in diesem Zusammenhang einen zuverlässigen experimentellen Infektionsweg dar.

Außerdem ist die Infektion über das Futter technisch einfach durchzuführen und setzt die Tiere nicht unnötigem Stress aus wie zum Beispiel bei der Durchführung der Gavage. Zudem steht diese Methode dem natürlichen Entstehen und Ablauf einer Parodontitis näher als die Gavage und anderen invasive Inokulationsmethoden.

Korrelierend mit einer erfolgreichen Kolonisation und einem erhöhten Knochenabbau bei *A.a.* 1005 infizierten Tieren über das Futter war zu erwarten, dass auch der Serum-Antikörper-Titer gegenüber *A. actinomycetemcomitans* bei diesen Tieren höher sein würde. Nach 5 Wochen zeigte sich bereits eine Tendenz, und nach 10 Wochen war der Titer deutlich höher als bei den Referenzgruppen (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11). Dies zeigt, dass das vorliegende Parodontitis-Infektionsmodell eine systemische humorale Immunantwort induzieren kann.

Neben *A.a.* 1005 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der *A.a.* Stamm ATCC 29523 für die Induktion einer Parodontitis durch Gavage eingesetzt. Während bei *A.a.* 1005 durch Gavage zumindest ein tendenziell erhöhter Knochenabbau nach 10 Wochen festgestellt werden konnte ( $p=0,083$ ), war bei der Infektion mit *A. a.* 29523 durch Gavage ( $p=0,64$ ) keine Tendenz für einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe zu erkennen. Dies zeigt, dass neben der Inokulationsmethode auch die Wahl des Bakterienstammes einen großen Einfluss auf den Knochenabbau und die damit verbundene Induktion einer Parodontitis im murinen Modell hat. Diese Faktoren tragen

mit großer Wahrscheinlichkeit auch dazu bei, bestehenden Unterschiede in den Parodontitis-Modellen verschiedener Arbeitsgruppen zu erklären, in denen unterschiedliche invasive und nicht-invasive Inokulationsmethoden sowie verschiedene Bakterienstämme eingesetzt werden [10, 36]. In zahlreichen anderen systemischen Infektionsmodellen zeigen sich außerdem unterschiedliche Maus-Inzuchtstämme gegenüber manchen Erregern unterschiedlich empfänglich [7, 57, 87-89]. Die Wahl des Inzuchtstammes hat daher sicherlich auch Einfluss auf das Ausmaß einer Parodontitis-Induktion, der im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht werden konnte.

## 4.2 Infektionsmodell mit *Porphyromonas gingivalis*

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Induktion einer Parodontitis durch den *P. gingivalis* Stamm 53977 im Maus-Modell untersucht werden. Da in mehreren Arbeiten ein erfolgreicher Knochenabbau durch Gavage erfolgte [7, 56], wurde diese Inokulationsmethode für die *P. gingivalis*-Infektion gewählt.

Baker *et al.* [7] konnte bei allen eingesetzten Mäusen eine Kolonisation mit *P. gingivalis* 53977 nach 42 Tagen dokumentieren. Unsere Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass *P. gingivalis* sich 41 Tage nach Infektion noch im Maul der Tiere nachweisen lässt. Eine 100%ige Kolonisation der Tiere mit *P. gingivalis* konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Baker *et al.* [7, 57, 90] zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied im Knochenabbau zwischen den infizierten Tieren und der Kontrollgruppe. Der durchschnittliche Knochenabbau der *P. gingivalis* 53977 infizierten Tiere war mit 125-170  $\mu\text{m}$  deutlich kleiner als in den Arbeiten von Baker *et al.* [7, 57, 87, 90], die einen durchschnittlichen Knochenabbau von 250 - 300  $\mu\text{m}$  gegenüber der Kontrollgruppe zeigen konnte. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass in einer vergleichbaren Studie von Wilensky *et al.* [56] nach *P.g.* 53977 Infektion zunächst kein signifikanter Unterschied im Knochenabbau festgestellt werden konnte, wenn allein die morphometrische Messmethode angewandt wurde. Mittels Auswertung im Kleintier-CT konnte jedoch eine signifikante Zunahme des Knochenabbaus verifiziert werden [56]. Da sich in den hier vorliegenden Ergebnissen mit der morphometrischen Messung zumindest eine leichte Tendenz zu höherem Knochenabbau zeigte, könnten CT-basierte Messungen unter Umständen zu einem deutlicheren Unterschied im Knochenabbau zwischen infizierten und Kontrolltieren kommen.

Interessanterweise zeigte sich ein anderer *P. gingivalis*-Stamm (20709), der im Rahmen dieser Arbeit in dem Infektionsmodell eingesetzt wurde, tendenziell eher protektiv, da der Knochenabbau etwas geringer ausfiel als bei der nicht-infizierten Kontrollgruppe. Auf die Induktion einer Parodontitis hat die Wahl des *P. gingivalis*-Stammes also ebenfalls einen erheblichen Einfluss, wie dies auch schon bei der Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* beschrieben wurde.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die nicht-invasiven Inokulationsmethoden Gavage und Inokulation über das Futter zur Induktion einer Parodontitis im murinen Modell untersucht und verglichen. Für die experimentelle Infektion wurden *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* eingesetzt. Untersucht wurde, ob diese Keime die Maulhöhle von BALB/c Mäusen über einen längeren Zeitraum kolonisieren können und wann sie einen Knochenabbau induzieren.

Es konnte eine gute Kolonisation mit dem Stamm *A. actinomycetemcomitans* 1005 erzielt werden, wenn die Infektion über Futtergabe erfolgte. Auch kam es zu einem signifikant erhöhten Knochenabbau bei der Infektion über Futtergabe. Ein deutlich erhöhter Antikörpertiter gegenüber *A. actinomycetemcomitans* bei den infizierten Tieren zeigt an, dass die Infektion auch eine systemische humorale Immunantwort auslöste. Im Gegensatz zu der Inokulation über das Futter konnte bei der Infektion mittels Gavage jedoch keine befriedigende Kolonisation der Maulhöhle erreicht werden. Es kam unter dieser Infektionsmethode zwar tendenziell zu einem Knochenabbau, der aber statistisch nicht signifikant war.

Nach *P. gingivalis* Infektion konnte zwar eine Kolonisation nach der Infektion nachgewiesen werden. Allerdings konnte nach Infektion per Gavage kein signifikanter Knochenbau im Vergleich zu der Kontrollgruppe erzeugt werden.

Die erhobenen Daten zeigen, dass die Induktion einer Parodontitis in weiblichen BALB/c Mäusen mit dem Stamm *A. actinomycetemcomitans* 1005 mittels Inokulation über das Futter eine vielversprechende Methode darstellt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Plagmann, H.-C., *Lehrbuch der Parodontologie*. 2 ed. 1998/2004. 710.
2. Schroeder, H.E. and M.A. Listgarten, *The gingival tissues: the architecture of periodontal protection*. *Periodontol* 2000, 1997. **13**: p. 91-120.
3. Armitage, G.C., *Development of a classification system for periodontal diseases and conditions*. *Ann Periodontol*, 1999. **4**(1): p. 1-6.
4. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *Evidence of bacterial etiology: a historical perspective*. *Periodontol* 2000, 1994. **5**: p. 7-25.
5. Wolf, H.F., E.M. Rateitschak, and K.H. Rateitschak, *Parodontologie*. 3 ed. 2004, Stuttgart, New York: Georg Thieme.
6. Socransky, S.S., et al., *Microbial complexes in subgingival plaque*. *J Clin Periodontol*, 1998. **25**(2): p. 134-44.
7. Baker, P.J., R.T. Evans, and D.C. Roopenian, *Oral infection with Porphyromonas gingivalis and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice*. *Arch Oral Biol*, 1994. **39**(12): p. 1035-40.
8. Slots, J., B.G. Rosling, and R.J. Genco, *Suppression of penicillin-resistant oral Actinobacillus actinomycetemcomitans with tetracycline. Considerations in endocarditis prophylaxis*. *J Periodontol*, 1983. **54**(4): p. 193-6.
9. Kachlany, S.C., et al., *Genes for tight adherence of Actinobacillus actinomycetemcomitans: from plaque to plague to pond scum*. *Trends in microbiology*, 2001. **9**(9): p. 429-37.
10. Wray, D. and L. Grahame, *Periodontal bone loss in mice induced by different periodontopathic organisms*. *Arch Oral Biol*, 1992. **37**(6): p. 435-8.
11. Zambon, J.J., *Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease*. *J Clin Periodontol*, 1985. **12**(1): p. 1-20.
12. IDZ, *Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie*. 2006.
13. Lalla, E., et al., *Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(8): p. 1405-11.
14. Li, L., et al., *Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model*. *Circulation*, 2002. **105**(7): p. 861-7.
15. Loesche, W.J., *Periodontal disease as a risk factor for heart disease*. *Compendium*, 1994. **15**(8): p. 976, 978-82, 985-6 passim; quiz 992.
16. Loesche, W.J., *Periodontal disease: link to cardiovascular disease*. *Compend Contin Educ Dent*, 2000. **21**(6): p. 463-6, 468, 470 passim; quiz 484.
17. Mercado, F., et al., *Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease?* *J Clin Periodontol*, 2000. **27**(4): p. 267-72.
18. Offenbacher, S., et al., *Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight*. *J Periodontol*, 1996. **67**(10 Suppl): p. 1103-13.
19. Scannapieco, F.A. and J.M. Mylotte, *Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia*. *J Periodontol*, 1996. **67**(10 Suppl): p. 1114-22.
20. Seymour, G.J., et al., *Relationship between periodontal infections and systemic disease*. *Clin Microbiol Infect*, 2007. **13 Suppl 4**: p. 3-10.
21. Genco, C.A., T. Van Dyke, and S. Amar, *Animal models for Porphyromonas gingivalis-mediated periodontal disease*. *Trends Microbiol*, 1998. **6**(11): p. 444-9.

22. Cloyer, F., *Dental disease in animal*. British Dental Journal, 1947. **82**: p. 31-35.
23. Graves, D.T., et al., *The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases*. J Clin Periodontol, 2008. **35**(2): p. 89-105.
24. Seto, H., M. Ninomiya, and T. Nagata, [*Alveolar bone resorption in animal models of periodontitis*]. Clin Calcium, 2006. **16**(2): p. 248-54.
25. Yaffe, A., J. Ehrlich, and S. Shoshan, *Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog*. J Periodontol, 1984. **55**(11): p. 623-8.
26. Nisengard, R.J. and E.H. Beutner, *Relation of immediate hypersensitivity to periodontitis in animals and man*. J Periodontol, 1970. **41**(4): p. 223-7.
27. Kennedy, J.E. and A.M. Polson, *Experimental marginal periodontitis in squirrel monkeys*. J Periodontol, 1973. **44**(3): p. 140-4.
28. Ismaiel, M.O., et al., *Periodontitis in sheep: a model for human periodontal disease*. J Periodontol, 1989. **60**(5): p. 279-84.
29. Volozhin, A.I. and S.I. Vinogradova, [*The pathogenesis of experimental periodontitis in rabbits*]. Stomatologiia (Mosk), 1991(4): p. 10-2.
30. Rabinowitz, J.L., et al., *Lipid composition and biosynthesis in the gingiva of the domestic cat*. J Periodontol, 1991. **62**(8): p. 495-8.
31. Jordan, H.V., *Rodent model systems in periodontal disease research*. J Dent Res, 1971. **50**(2): p. 236-42.
32. Kopczyk, R.A., S.R. Saxe, and J.A. Lenox, *Method of managing dogs for dental research*. J Dent Res, 1971. **50**(3): p. 784.
33. Jordan, H.V. and J. Van Houte, *The hamster as an experimental model for odontopathic infections*. Prog Exp Tumor Res, 1972. **16**: p. 539-56.
34. Hefti, A., [*Relative gnotobiosis: a possibility for studying periodontal diseases in the rat*]. SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd, 1979. **89**(7): p. 689-98.
35. Bundesverbraucherschutzministerium. *Aigner appelliert an Wirtschaft und Wissenschaft, Versuchstierzahlen weiter zu senken*. 2009; Available from: [http://www.bmelv.de/cln\\_102/SharedDocs/Pressemitteilungen/2008/187-AI-Versuchstierdaten2007.html](http://www.bmelv.de/cln_102/SharedDocs/Pressemitteilungen/2008/187-AI-Versuchstierdaten2007.html)  
[http://www.bmelv.de/cln\\_135/DE/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/tierschutz\\_nod\\_e.html](http://www.bmelv.de/cln_135/DE/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/tierschutz_nod_e.html).
36. Garlet, G.P., et al., *Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration*. Microbes Infect, 2005. **7**(4): p. 738-47.
37. Klausen, B., *Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article*. J Periodontol, 1991. **62**(1): p. 59-73.
38. Nishida, E., et al., *Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide*. J Periodontal Res, 2001. **36**(1): p. 1-8.
39. Tsutsui, T. and S. Hanazawa, [*Mouse interleukin-1 production by Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4 lipopolysaccharide and augmenting effect of indomethacin on its production*]. Meikai Daigaku Shigaku Zasshi, 1990. **19**(2): p. 277-85.
40. Ishihara, Y., et al., *Role of interleukin-1 and prostaglandin in in vitro bone resorption induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide*. J Periodontal Res, 1991. **26**(3 Pt 1): p. 155-60.

41. Kesavalu, L., B. Chandrasekar, and J.L. Ebersole, *In vivo* induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*, 2002. **17**(3): p. 177-80.
42. Teng, Y.T., *Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in Actinobacillus actinomycetemcomitans-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo*. *Infect Immun*, 2002. **70**(9): p. 5269-73.
43. Garlet, G.P., et al., *The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **147**(1): p. 128-38.
44. Rovin, S., E.R. Costich, and H.A. Gordon, *The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats*. *J Periodontal Res*, 1966. **1**(3): p. 193-204.
45. Heijl, L., et al., *Periodontal disease in gnotobiotic rats*. *J Periodontal Res*, 1980. **15**(4): p. 405-19.
46. Labelle, R.E. and E.M. Schaffer, *The effects of cortisone and induced local factors on the periodontium of the albino rat*. *J Periodontol*, 1966. **37**(6): p. 483-90.
47. Bissada, N.F., E.M. Schaffer, and A. Lazarow, *Effect of alloxan diabetes and local irritating factors on the periodontal structures of the rat*. *Periodontics*, 1966. **4**(5): p. 233-40.
48. Weiner, G.S., T.J. DeMarco, and N.F. Bissada, *Long term effect of systemic tetracycline administration on the severity of induced periodontitis in the rat*. *J Periodontol*, 1979. **50**(12): p. 619-23.
49. Gyorfi, A., et al., *Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat*. *J Clin Periodontol*, 1994. **21**(9): p. 601-5.
50. Carranza, F.A., Jr., et al., *Histometric evaluation of periodontal bone loss in rats. I. The effect of marginal irritation, systemic irradiation and trauma from occlusion*. *J Periodontal Res*, 1971. **6**(1): p. 65-72.
51. Yokota, M., [*Histopathologic study on experimental periodontitis in rats (author's transl)*]. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 1975. **17**(1): p. 14-28.
52. Abiko, Y., [*Histopathological study of experimental periodontitis in rats-- ultrastructures, permeability, immunohistochemistry, and morphometric analysis in both pocket and long junctional epithelial*]. *Shikwa Gakuho*, 1989. **89**(12): p. 1819-47.
53. Kimura, S., et al., *Induction of experimental periodontitis in mice with Porphyromonas gingivalis-adhered ligatures*. *J Periodontol*, 2000. **71**(7): p. 1167-73.
54. Li, C.H. and S. Amar, *Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model*. *J Periodontol*, 2007. **78**(6): p. 1120-8.
55. Kuhr, A., et al., *Observations on experimental marginal periodontitis in rats*. *J Periodontal Res*, 2004. **39**(2): p. 101-6.
56. Wilensky, A., et al., *Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected mice using micro-computed tomography*. *J Periodontol*, 2005. **76**(8): p. 1282-6.
57. Baker, P.J., M. Dixon, and D.C. Roopenian, *Genetic control of susceptibility to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in mice*. *Infect Immun*, 2000. **68**(10): p. 5864-8.

58. Fine, D.H., et al., *Colonization and persistence of rough and smooth colony variants of Actinobacillus actinomycetemcomitans in the mouths of rats*. Archives of oral biology, 2001. **46**(11): p. 1065-1078.
59. Schreiner, H.C., et al., *Tight-adherence genes of Actinobacillus actinomycetemcomitans are required for virulence in a rat model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7295-300.
60. Crawford, J.M., M.A. Taubman, and D.J. Smith, *The effects of local immunization with periodontopathic microorganisms on periodontal bone loss in gnotobiotic rats*. J Periodontal Res, 1978. **13**(5): p. 445-59.
61. Crawford, J.M., M.A. Taubman, and D.J. Smith, *The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms*. J Periodontal Res, 1978. **13**(4): p. 316-25.
62. Taubman, M.A., et al., *Immune response and periodontal bone loss in germfree rats immunized and infected with Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontal Res, 1983. **18**(4): p. 393-401.
63. Taubman, M.A., et al., *Periodontal bone loss and immune response to ovalbumin in germfree rats fed antigen-free diet with ovalbumin*. Infect Immun, 1981. **32**(1): p. 145-52.
64. Stralfors, A., H. Thilander, and A. Bergenholtz, *Correlation between caries and periodontal disease in the hamster*. Arch Oral Biol, 1967. **12**(10): p. 1213-6.
65. Klausen, B., R.T. Evans, and C. Sfantescu, *Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats*. Scand J Dent Res, 1989. **97**(6): p. 494-9.
66. Klausen, B., C. Sfantescu, and R.T. Evans, *Asymmetry in periodontal bone loss of gnotobiotic Sprague-Dawley rats*. Arch Oral Biol, 1991. **36**(9): p. 685-7.
67. Carranza, F.A., Jr., *Histometric evaluation of periodontal pathology. A review of recent studies*. J Periodontol, 1967. **38**(6): p. Suppl:741-50.
68. Gibbons, R.J. and S.S. Socransky, *Enhancement of alveolar bone loss in gnotobiotic mice harbouring human gingival bacteria*. Arch Oral Biol, 1966. **11**(8): p. 847-8.
69. Briner, W.W., et al., *Effect of chlorhexidine on plaque, gingivitis and alveolar bone loss in beagle dogs after seven years of treatment*. J Periodontal Res, 1980. **15**(4): p. 390-4.
70. Evans, R.T., et al., *Periodontopathic potential of two strains of Porphyromonas gingivalis in gnotobiotic rats*. Arch Oral Biol, 1992. **37**(10): p. 813-9.
71. Kesavalu, L., et al., *Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease*. Infect Immun, 2007. **75**(4): p. 1704-12.
72. von Stechow, D., et al., *Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography*. J Endod, 2003. **29**(4): p. 252-6.
73. Park, C.H., et al., *Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair*. J Periodontol, 2007. **78**(2): p. 273-81.
74. Fives-Taylor, P.M., et al., *Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Periodontol 2000, 1999. **20**: p. 136-67.
75. Haraszthy, V.I., et al., *Evidence for the role of highly leukotoxic Actinobacillus actinomycetemcomitans in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis*. J Periodontol, 2000. **71**(6): p. 912-22.
76. Zambon, J.J., Haraszthy, V.I., Lally, E.T., and Denmuth, D.R., *The microbiology of early-onset periodontitis: association of highly toxic Actinobacillus actinomycetemcomitans strains with localized juvenile periodontitis*. J Periodontol, 1996. **67**



- (3): p. 282–290.
77. Gainet, J., et al., *Neutrophil dysfunctions, IL-8, and soluble L-selectin plasma levels in rapidly progressive versus adult and localized juvenile periodontitis: variations according to disease severity and microbial flora*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 5013-9.
  78. Xie, H., N. Kozlova, and R.J. Lamont, *Porphyromonas gingivalis genes involved in fimA regulation*. Infect Immun, 2004. **72**(2): p. 651-8.
  79. Alsina, M., E. Olle, and J. Frias, *Improved, low-cost selective culture medium for Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(2): p. 509-13.
  80. Fouad, A.F., et al., *PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(9): p. 3223-31.
  81. Fleiss, J.L.C., J., *The equivalence of weighted kappa and the intraclass correlation coefficient as measures of reliability*. Educational and Psychological Measurement, 1973. **33**: p. 613-619.
  82. Muller, R. and P. Buttner, *A critical discussion of intraclass correlation coefficients*. Stat Med, 1994. **13**(23-24): p. 2465-76.
  83. Shrout, P.E. and J.L. Fleiss, *Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability*. Psychol Bull, 1979. **86**(2): p. 420-8.
  84. Asendorpf, J.W., H. G., *Maße der Beobachterübereinstimmung: Ein systematischer Vergleich*. Zeitschrift für Sozialpsychologie, 1979. **10**: p. 243-252.
  85. McGraw, K.O.W., S. P., *Forming inferences about some intraclass correlation coefficients*. Forming inferences about some intraclass correlation coefficients., 1996. **1**: p. 30-46.
  86. Wirtz, M.C., F. , *Beurteilerübereinstimmung und Beurteilerreliabilität*. 2002, Göttingen: Hogrefe. 287.
  87. Baker, P.J., et al., *Adhesion molecule deficiencies increase Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in mice*. Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3103-7.
  88. Niederman, R., et al., *Infection-mediated early-onset periodontal disease in P/E-selectin-deficient mice*. J Clin Periodontol, 2001. **28**(6): p. 569-75.
  89. Baker, P.J., et al., *T cell knockout mice have diminished alveolar bone loss after oral infection with Porphyromonas gingivalis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2002. **34**(1): p. 45-50.
  90. Baker, P.J., et al., *Heterogeneity of Porphyromonas gingivalis strains in the induction of alveolar bone loss in mice*. Oral Microbiol Immunol, 2000. **15**(1): p. 27-32.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Überblick der Parodontitis marginalis mit den dazugehörigen Komponenten: bakterielle Infektion, Plaque, Zahnstein und Knochenabbau; Quelle: <a href="http://www.dr.schmidt.de/bilder/parodontose/parodontose-1.gif">http://www.dr.schmidt.de/bilder/parodontose/parodontose-1.gif</a> ..	2
Abbildung 2: Foto des BD GazPak EZ Campy Gas Generating Pouch System für die anaerobe und mikroaerophile Bebrütung der verwendeten Bakterien. ....	13
Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf der Experimente mit <i>P. gingivalis</i> und <i>A. actinomycetemcomitans</i> : Nach der 10-tägigen Antibiotikagabe wurde die Infektion mit einer Verzögerung von 2 Tagen gestartet. <i>A. actinomycetemcomitans</i> wurde jeden Tag, 8 Tage lang inokuliert, <i>P. gingivalis</i> wurde dreimal alle 2 Tage inokuliert (I = Infektion, P = Pause). ....	17
Abbildung 4: Applikation der Bakteriensuspension per Schlündelung (Gavage) in Maul und Oesophagus der BALB/c Maus. Quelle: Privatfoto Malte Jan Dominik .....	18
Abbildung 5: Digitales Auflichtmikroskop mit angeschlossenem PC zur morphometrischen Vermessung der aufbereiteten Kiefer; Quelle: Das Foto wurde freundlicherweise von Kerstin Scholz, Parodontologie Greifswald, zur Verfügung gestellt .....	27
Abbildung 6: Auflichtmikroskopaufnahme, 60fach vergrößert, der bukkalen Seite des Mäusekiefers. Die gelben Pfeile stellen die zu vermessenen Strecken dar. Die Zahlen sind die Referenzpunkte zum Wiederfinden der Messstrecken an allen Tieren und die Kennzeichnung der Anzahl der Messstrecken. ....	28
Abbildung 7: Auflichtmikroskopaufnahme, 60fach vergrößert, der palatinalen Seite des Mäusekiefers. Die gelben Pfeile stellen die zu vermessenen Strecken dar. Die Zahlen sind die Referenzpunkte zum Wiederfinden der Messstrecken an allen Tieren und die Kennzeichnung der Anzahl der Messstrecken. ....	29
Abbildung 8: Molekularbiologischer (PCR) Nachweises von <i>A. actinomycetemcomitans</i> aus dem Experiment 1. In allen auf diesem Bild untersuchten Abstrichen konnte <i>A. actinomycetemcomitans</i> nachgewiesen werden, außer in dem Kontrollabstrich. 1= negativ Kontrolle, 2= Experiment 1 Maus14, 3= Experiment 1 M37, 4= Experiment 1 M38, 5= Experiment 1 M39, 6= Experiment 1 M20, 7= Experiment 1 M32, 8= Experiment 1 M17, 9= Positivkontrolle; .....	34
Abbildung 9: Molekularbiologischer (PCR) Nachweis von <i>P. gingivalis</i> bei Tieren aus den 3 Gruppen beim letzten Abstrich nach 41 Tagen. Bei 4 von 6 Tieren wurde auf diesem Bild ein positiver Nachweis erbracht. 1= negativ Kontrolle, 2= <i>P.g.</i> 53977, 3= <i>P.g.</i> 20709, 4= Maus62 (Tier aus der Kontrollgruppe), 5= M53, 6= M54, 7= M56, 8= M49, 9= positiv Kontrolle; 4* = eine Verunreinigung während des PCR-Verfahrens, diese Probe wurde nochmals nachgeprüft, wobei sie dann negativ ausfiel. (Daten nicht abgebildet).....	36
Abbildung 10: Der Antikörpertiter (Mittelwert und Standardabweichung) der infizierten Gruppe A.a. 1005 Futter ( $0,38 \pm 0,11$ ) zeigt eine tendenzielle d.h. nicht signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe ( $0,22 \pm 0,06$ ). ....	37
Abbildung 11: Antikörpertiter im <i>A. actinomycetemcomitans</i> Experiment 1 (Mittelwert und Standardabweichung). Die Futtergruppe ( $1,66 \pm 0,4$ ) hat einen eindeutig signifikant erhöhten Titer gegenüber der Kontrollgruppe ( $0,28 \pm 0,06$ ) sowie gegenüber der Gavage A.a. 1005 Gruppe ( $0,26 \pm 0,08$ ). Der Titer der A.a. 29523 Gruppe ( $0,94 \pm 0,31$ ) ist ebenfalls signifikant erhöht. ....	37
Abbildung 12: Darstellung des mittleren Knochenabbaus (Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{m}$ ) für alle Gruppen (G= Gavage, F= Futter, AA29523 wurde per Gavage inokuliert) und beide Infektionszeiträume im <i>A. actinomycetemcomitans</i> -	

Experiment 1. Es besteht zum Zeitpunkt 10 Wochen bei <i>A.a.</i> F 1005 ein signifikanter Unterschied des Knochenabbaus gegenüber der Kontrollgruppe. In den anderen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied im Knochenabbau zur Kontrollgruppe zu keinem der beiden Zeitpunkte (2 und 10 Wochen).....	39
Abbildung 13: Darstellung des mittleren Knochenabbaus (Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{m}$ ) für alle Gruppen des <i>P. gingivalis</i> -Experiments. Es konnte kein signifikant erhöhter Knochenabbau in den infizierten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. ....	40
Abbildung 14: In dem Bland-Altman-Diagramm wurden die Messungen von Untersucher 1 und 2 gegenüber gestellt, indem die Differenz der Messwerte der Untersuchern 1 und 2 gegen den Mittelwert aufgetragen wurde. Durchgezogene Linie = Mittelwert; Gestrichelte Linien = Mittelwert + bzw. - 1,96 Standardabweichung. Kreis = eine Messung, Kreis mit Strich = zwei Messungen, Kreis mit zwei Strichen = drei Messungen usw. (Sonnenblumen-Plot).....	66
Abbildung 15: In dem Bland-Altman-Diagramm wurden die Messungen von Untersucher 2 und 3 gegenüber gestellt, indem die Differenz der Messwerte der Untersuchern 1 und 2 gegen den Mittelwert aufgetragen wurde. Durchgezogene Linie = Mittelwert; Gestrichelte Linien = Mittelwert + bzw. - 1,96 Standardabweichung Kreis = eine Messung, Kreis mit Strich = zwei Messungen, Kreis mit zwei Strichen = drei Messungen usw. (Sonnenblumen-Plot).....	67
Abbildung 16: In dem Bland-Altman-Diagramm wurden die Messungen von Untersucher 1 und 3 gegenüber gestellt, indem die Differenz der Messwerte der Untersuchern 1 und 2 gegen den Mittelwert aufgetragen wurde. Durchgezogene Linie = Mittelwert; Gestrichelte Linien = Mittelwert + bzw. - 1,96 Standardabweichung. Kreis = eine Messung, Kreis mit Strich = zwei Messungen, Kreis mit zwei Strichen = drei Messungen usw. (Sonnenblumen-Plot).....	67

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Besonderheiten, Resistenzen und Herkunft der verwendeten Bakterienstämme. ....	12
Tabelle 2: Durchschnittliche Infektionsdosis der zwei Experimente nach der Infektionsart Gavage und Futter. In den Futter- und Gavagegruppen wurde eine Durchschnittliche Infektionsdosis von $1 \times 10^8/100 \mu\text{l}$ erreicht. Bei A.a. 29523 wurde eine Infektionsdosis von $7,8 \times 10^7/100 \mu\text{l}$ erreicht. ....	19
Tabelle 3: Einteilung der Untersuchungsgruppen: Anzahl der Mäuse in den Gruppen, Zuordnung zur Inokulationsmethode und die Todeszeitpunkte der jeweiligen Gruppen. ....	20
Tabelle 4: Anzahl der Abstriche für die verschiedenen Experimente mit Zeitpunkt und Anzahl der Tiere von denen der Abstrich gewonnen wurde. ....	22
Tabelle 5: Standard-Reaktionsansatz der PCR .....	23
Tabelle 6: Beschreibung der bukkalen Messstrecken an den untersuchten Zähnen. ORP= Orientierungspunkt (Gelber Kreis mit Zahl), SZG= Schmelz-Zement-Grenze, AKR= Alveolarknochenrand .....	29
Tabelle 7: Beschreibung der palatinalen Messstrecken an den untersuchten Zähnen. ORP= Orientierungspunkt (Gelber Kreis mit Zahl), SZG= Schmelz-Zement-Grenze, AKR= Alveolarknochenrand .....	29
Tabelle 8: Kultureller Nachweis mit PCR-Bestätigung von <i>A. actinomycetemcomitans</i> in 2 % Agarosegelen nach Färbung mit Ethidiumbromid bei den Tieren aus den 5 Gruppen zu 4 Zeitpunkten. Kein Tier, welches bei Abstrich 1 (15 Tage) positiv war, wurde im Abstrich 2 (35 Tage) erneut positiv getestet. Die positiven Mäuse bei Abstrich 2 sind Mäuse, die im Abstrich 1 noch negativ waren. Nach 57 Tagen und nach 69 Tagen wurde in keinem der Abstriche <i>A. actinomycetemcomitans</i> nachgewiesen. ....	34
Tabelle 9: kultureller Nachweis mit PCR-Bestätigung von <i>P. gingivalis</i> in den 3 Gruppen zu 3 Zeitpunkten. 41 Tagen nach Infektion mit P.g. 53977 konnte bei zwei Tieren und bei Infektion mit P.g. 20709 bei einem Tier eine erfolgreiche Kolonisation gezeigt werden. In der Kontrollgruppe wurde kein <i>P. gingivalis</i> gefunden. ....	35
Tabelle 10: Bukkale und palatinale Messwerte eines Kiefers zu zwei verschiedenen Zeitpunkten von einem Untersucher vermessen (mit Mittelwerten und Standardabweichung).....	41
Tabelle 11: Vergleich der Distanz Schmelz-Zement-Grenze - Alveolarknochenrand (Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{m}$ ) nach 5 Wochen zwischen allen Gruppen des <i>A. actinomycetemcomitans</i> -Experiments an allen Messstrecken mittels univariater ANOVA .....	57
Tabelle 12: Vergleich der Distanz Schmelz-Zement-Grenze - Alveolarknochenrand (Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{m}$ ) nach 10 Wochen zwischen allen Gruppen <i>A. actinomycetemcomitans</i> -Experiments an allen Messstrecken mittels univariater ANOVA .....	58
Tabelle 13: Vergleich der Distanz Schmelz-Zement-Grenze - Alveolarknochenrand (Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{m}$ ) nach 6 Wochen zwischen allen Gruppen des <i>P. gingivalis</i> -Experiments an allen Messstrecken mittels univariater ANOVA. ....	59
Tabelle 14: Bei $p < 0.1$ für die univariate ANOVA wurden Post-hoc-tests mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. ns = nicht signifikant. Die Ergebnisse in der dritten Spalte müssen vernachlässigt werden, da in der <i>P.g.</i> 20709 Gruppe weniger Knochenabbau als in der Kontrollgruppe, die als Referenz diente, festzustellen war.....	59
Tabelle 15: Einzelne Daten der 20-maligen Vermessung des bukkalen Messpunktes 3 bei Maus 2 zur Bestimmung des eigenen Messfehlers. ....	60
Tabelle 16: Intra-Rater-Reabilität Was bedeutet die gelbe Hinterlegung? .....	61

Tabelle 17: Vergleich der einzelnen Messpunkte der Kiefer mit denselben auf den anderen Kiefern(Mittelwert und Standardabweichung) mit Hilfe des „Two-way mixed Anova Tests“. Es wurde eine gute Übereinstimmung gefunden.....	63
Tabelle 18: Vergleich von 3 Vermessern Intraclass Correlation Coefficients, Two-Way Mixed Effects Model (Consistency Definition).....	64
Tabelle 19: Übersicht der Messwerte für drei Untersucher die denselben Kiefer untersucht haben .....	64
Tabelle 20: ICC für die 3 Untersucher mit einer guten Übereinstimmung von 0,908. ....	65

## 9 Anhang

### 9.1 Anhang A

Tabellenvergleich der Messstrecken mittels univariater ANOVA 3.3.1

Tabelle 11: Vergleich der Distanz Schmelz-Zement-Grenze - Alveolarknochenrand (Mittelwert und Standardabweichung in  $\mu\text{m}$ ) nach 5 Wochen zwischen allen Gruppen des *A. actinomycetemcomitans*-Experiments an allen Messstrecken mittels univariater ANOVA

	Woche 5				
AV (Mittelwert $\pm$ SD)	Kontrollen	A.a. 1005 Gavage	A.a. 1005 Futter	A.a. 29523	P
<b>Bukkal</b>					
1	87,06 $\pm$ 8,2	78,43 $\pm$ 27,6	108,62 $\pm$ 28,7	86,25 $\pm$ 23,34	0,23
2	86,98 $\pm$ 18,9	107,72 $\pm$ 34	121,46 $\pm$ 21,3	92,07 $\pm$ 19,6	0,12
3	111,90 $\pm$ 7	114,14 $\pm$ 22,9	112,77 $\pm$ 15,7	110,34 $\pm$ 19,9	0,99
4	80,51 $\pm$ 29	71,43 $\pm$ 11	84,18 $\pm$ 19,7	84,96 $\pm$ 25,6	0,74
5	121,65 $\pm$ 12,5	137,88 $\pm$ 11,6	133,27 $\pm$ 21,5	138,17 $\pm$ 18	0,46
6	127,53 $\pm$ 9,6	144,49 $\pm$ 11	154,22 $\pm$ 25,1	151,03 $\pm$ 21,1	0,19
<b>Palatinal</b>					
1	48,46 $\pm$ 27,6	46,79 $\pm$ 26,53	64,65 $\pm$ 47,6	70,19 $\pm$ 33,4	0,66
2	80,67 $\pm$ 23,6	68,89 $\pm$ 22	79,07 $\pm$ 36,9	71,46 $\pm$ 24	0,89
3	145,08 $\pm$ 5,3	148,67 $\pm$ 33,8	152,28 $\pm$ 12,2	134,06 $\pm$ 19,4	0,48
4	149,9 $\pm$ 23,8	155,67 $\pm$ 19,7	165,01 $\pm$ 8,1	156,77 $\pm$ 14,4	0,55
5	168,5 $\pm$ 17,2	183,18 $\pm$ 38,2	190,52 $\pm$ 31,2	177,29 $\pm$ 28,8	0,72
6	453,24 $\pm$ 72,5	429,67 $\pm$ 62,3	453,55 $\pm$ 70,6	422,99 $\pm$ 46,3	0,79

Tabelle 12: Vergleich der Distanz Schmelz-Zement-Grenze - Alveolarknochenrand (Mittelwert und Standardabweichung in  $\mu\text{m}$ ) nach 10 Wochen zwischen allen Gruppen A. *actinomycetemcomitans*-Experiments an allen Messstrecken mittels univariater ANOVA

	<b>Woche 10</b>				
<b>AV (mean<math>\pm</math>SD)</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>A.a. 1005 Gagave</b>	<b>A.a. 1005 Futter</b>	<b>A.a. 29523</b>	<b>P</b>
<b>Bukkal</b>					
<b>1</b>	134,5 $\pm$ 42	135,45 $\pm$ 17,5	134,73 $\pm$ 27,	114,39 $\pm$ 30,9	0,66
<b>2</b>	114,86 $\pm$ 32,8	115,54 $\pm$ 11,3	141,93 $\pm$ 19,2	125,6 $\pm$ 28,7	0,30
<b>3</b>	121,82 $\pm$ 20,2	131,26 $\pm$ 13,9	143,45 $\pm$ 22,6	136,92 $\pm$ 28,8	0,43
<b>4</b>	74,61 $\pm$ 18,7	93,54 $\pm$ 23,4	94,43 $\pm$ 8,8	83,87 $\pm$ 17,7	0,26
<b>5</b>	150,22 $\pm$ 30,5	154,76 $\pm$ 16,2	175,4 $\pm$ 22,7	155,55 $\pm$ 29,7	0,43
<b>6</b>	154,91 $\pm$ 33,88	167,13 $\pm$ 26,3	171,73 $\pm$ 20,1	172,10 $\pm$ 19,	0,66
<b>Palatinal</b>					
<b>1</b>	72,52 $\pm$ 24,5	82,09 $\pm$ 19,1	91,42 $\pm$ 21,7	66,15 $\pm$ 28, 5	0,37
<b>2</b>	91,85 $\pm$ 36,8	99,99 $\pm$ 15, 6	130,01 $\pm$ 40,6	86,07 $\pm$ 28,5	0,17
<b>3</b>	143,52 $\pm$ 26,7	175,32 $\pm$ 12,4	160,78 $\pm$ 25,8	156,63 $\pm$ 24,1	0,2
<b>4</b>	157,35 $\pm$ 25,4	180,6 $\pm$ 18,8	178,83 $\pm$ 16,3	155,85 $\pm$ 11,4	0,09
<b>5</b>	195,39 $\pm$ 20,5	192,91 $\pm$ 14,6	206,96 $\pm$ 19,9	188,76 $\pm$ 17,8	0,47
<b>6</b>	440,4 $\pm$ 56,4	463,34 $\pm$ 32,7	456,28 $\pm$ 65,4	452,83 $\pm$ 62,8	0,92

Tabellen zu *P. gingivalis* 3.3.2

Tabelle 13: Vergleich der Distanz Schmelz-Zement-Grenze - Alveolarknochenrand (Mittelwert und Standardabweichung in  $\mu\text{m}$ ) nach 6 Wochen zwischen allen Gruppen des *P. gingivalis*-Experiments an allen Messstrecken mittels univariater ANOVA.

<b>P.g. 6 Wochen</b>				
<b>Anova</b>				
<b>AV (mean<math>\pm</math>SD)</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>P.g. 53977</b>	<b>P.g. 20709</b>	<b>P</b>
<b>Bukkal</b>				
<b>1</b>	88,36 $\pm$ 33,9	90,75 $\pm$ 27,9	59,60 $\pm$ 13,3	0,17
<b>2</b>	107,11 $\pm$ 47,4	96,93 $\pm$ 21,2	88,48 $\pm$ 25,1	0,68
<b>3</b>	108,84 $\pm$ 14,8	127,10 $\pm$ 18,4	105,84 $\pm$ 16,9	0,13
<b>4</b>	70,73 $\pm$ 13,5	77,14 $\pm$ 13,8	55,73 $\pm$ 22,6	0,16
<b>5</b>	129,63 $\pm$ 26,4	134,93 $\pm$ 17,4	121,35 $\pm$ 20,6	0,63
<b>6</b>	138,99 $\pm$ 10,7	160,60 $\pm$ 68,5	131,42 $\pm$ 9,7	0,49
<b>Palatinal</b>				
<b>1</b>	45,70 $\pm$ 24,8	58,59 $\pm$ 29,8	17,40 $\pm$ 21,1	0,06
<b>2</b>	86,42 $\pm$ 20,6	85,05 $\pm$ 19,2	55,42 $\pm$ 25,9	0,07
<b>3</b>	138,78 $\pm$ 20,4	146,60 $\pm$ 22,6	115,78 $\pm$ 10,4	0,05
<b>4</b>	142,66 $\pm$ 24,1	158,09 $\pm$ 17,6	122,09 $\pm$ 11,3	0,03
<b>5</b>	190,05 $\pm$ 30,9	207,47 $\pm$ 36,2	156,76 $\pm$ 25,5	0,06
<b>6</b>	396,98 $\pm$ 47,6	438,49 $\pm$ 76,8	400,46 $\pm$ 76,8	0,51

Tabelle 14: Bei  $p < 0.1$  für die univariate ANOVA wurden Post-hoc-tests mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. ns = nicht signifikant. Die Ergebnisse in der dritten Spalte müssen vernachlässigt werden, da in der *P.g.* 20709 Gruppe weniger Knochenabbau als in der Kontrollgruppe, die als Referenz diente, festzustellen war.

<b>P.g. 6 Wochen</b>			
<b>Post-hoc tests (Bonferroni)</b>			
<b>AV (mean<math>\pm</math>SD)</b>	<b>PG_53977 vs. Kontrollen</b>	<b>PG_20709 vs. Kontrollen</b>	<b>PG_53977 vs. PG_20709</b>
<b>Bukkal</b>			
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	-	-	-
<b>3</b>	-	-	-
<b>4</b>	-	-	-
<b>5</b>	-	-	-
<b>6</b>	-	-	-
<b>Palatinal</b>			
<b>1</b>	ns	ns	0,07
<b>2</b>	ns	ns	ns
<b>3</b>	ns	ns	0,07
<b>4</b>	ns	ns	0,03
<b>5</b>	ns	ns	0,07
<b>6</b>	-	-	-

Tabellen zu Bestimmung des eigenen Messfehlers 3.3.3.1



Tabelle 15: Einzelne Daten der 20-maligen Vermessung des bukkalen Messpunktes 3 bei Maus 2 zur Bestimmung des eigenen Messfehlers.

Messung	Strecke in $\mu\text{m}$
1	153,5
2	152
3	151,3
4	153,5
5	153
6	153,5
7	151,2
8	153,5
9	156
10	150
11	155
12	153,5
13	156,4
14	151,3
15	153,5
16	151,2
17	153,5
18	150,1
19	155,8
20	153,5
<b>Maximum</b>	156,4
<b>Minimum</b>	150
<b>Mittelwert</b>	153,1
<b>Standardabweichung</b>	1,86
<b>Varianz</b>	3,45

Messung zur Bestimmung der Intra-Rater-Reliabilität (3.3.3.1)

Tabelle 16: Intra-Rater-Reabilität

Maus	Messpunkt	Messung 1	Messung 2	Mittelwert	SD
Maus 2 buk	1	89,9	97,1	93,5	5,07
	2	95,9	101,6	98,8	3,99
	3	103,8	103,9	103,8	0,02
	4	110,7	119,6	115,2	6,33
	5	111,3	103,9	107,6	5,28
	6	130,8	136,7	133,7	4,15
Maus 2 pal	1	76,5	81,3	78,9	3,42
	2	79,7	90,3	85	7,50
	3	142,2	149	145,6	4,79
	4	137,7	128,7	133,2	6,38
	5	166,3	159,9	163,1	4,55
	6	380,5	352,2	366,4	20,02
Maus 14 buk	1	99,4	97,1	98,3	1,61
	2	94,8	101,6	98,2	4,77
	3	97,1	97,1	97,1	0,00
	4	90,3	97,1	93,7	4,77
	5	119,1	110,5	114,8	6,08
	6	131,6	131,6	131,6	0,00
Maus 14 pal	1	13,5	15,8	14,7	1,60
	2	47,4	51,9	49,7	3,19
	3	137,7	133,2	135,5	3,21
	4	151,3	144,5	147,9	4,80
	5	147,8	144,2	146	2,51
	6	345,1	365,9	355,5	14,66
Maus 19 buk	1	96,4	99,4	97,9	2,12
	2	93,2	97,1	95,2	2,71
	3	117,4	110,6	114	4,79
	4	88	72,3	80,2	11,15
	5	119,2	125,4	122,3	4,36
	6	148,7	147,2	147,9	1,07
Maus 19 pal	1	54,3	49,7	52	3,26
	2	63,2	63,2	63,2	0,00
	3	130,9	126,4	128,7	3,21
	4	151,3	151,2	151,3	0,01
	5	206	195,6	200,8	7,33
	6	415,1	413,4	414,3	1,19
Maus 24 buk	1	131	128,7	129,9	1,64

	2	92,7	86,8	89,7	4,16
	3	126,4	128,7	127,5	1,60
	4	74,5	74,5	74,5	0,00
	5	98,6	100,7	99,6	1,50
	6	138,3	129,6	133,9	6,18
Maus 24 pal	1	27,1	29,4	28,2	1,60
	2	47,5	45,2	46,3	1,60
	3	135,4	133,2	134,3	1,60
	4	169,3	167	168,2	1,61
	5	225,3	211,1	218,2	10,04
	6	443,6	454,3	448,9	7,61
Maus 35 buk	1	149,1	151,3	150,2	1,56
	2	153,5	149	151,3	3,18
	3	160,3	155	157,6	3,73
	4	94,8	92,6	93,7	1,60
	5	173	165,6	169,3	5,23
	6	147,9	143,6	145,8	3,00
Maus 35 pal	1	76,8	65,5	71,1	8,00
	2	83,5	80	81,8	2,51
	3	160,3	156,5	158,4	2,70
	4	155,8	149	152,4	4,79
	5	205,8	199,2	202,5	4,71
	6	432,6	430,1	431,4	1,76
Maus 42 buk	1	135,8	133,2	134,5	1,83
	2	136,5	130,9	133,7	3,96
	3	146,7	142,2	144,5	3,19
	4	94,8	97,1	95,9	1,60
	5	110,2	111,2	110,7	0,65
	6	156,6	156,6	156,6	0,00
Maus 42 pal	1	61	58,7	59,8	1,57
	2	74,5	74,5	74,5	0,00
	3	126,4	130,9	128,7	3,19
	4	130,9	128,7	129,8	1,60
	5	168,2	171,9	170,1	2,61
	6	495,1	496,8	496	1,22

Tabelle zu Two-way-mixed Anova Test (3.3.3.1)

Tabelle 17: Vergleich der einzelnen Messpunkte der Kiefer mit denselben auf den anderen Kiefern(Mittelwert und Standardabweichung) mit Hilfe des „Two-way mixed Anova Tests“. Es wurde eine gute Übereinstimmung gefunden.

Seite	Messung	Zeitpunkt	N	Mittelwert	SD
<b>1 bukkal</b>	1	1	6	116,92	24,68
		2	6	117,78	23,12
	2	1	6	111,12	26,83
		2	6	111,16	23,66
	3	1	6	125,28	24,51
		2	6	122,90	22,88
	4	1	6	92,19	11,75
		2	6	92,18	17,38
	5	1	6	121,92	26,16
		2	6	119,54	24,13
	6	1	6	142,31	10,37
		2	6	140,87	10,24
<b>2 lingual</b>	1	1	6	51,52	26,06
		2	6	50,05	24,05
	2	1	6	65,97	15,90
		2	6	67,52	17,23
	3	1	6	138,83	11,83
		2	6	138,19	11,76
	4	1	6	149,37	13,58
		2	6	144,85	14,65
	5	1	6	186,57	30
		2	6	180,37	25,80
	6	1	6	418,67	52,02
		2	6	418,79	54,30

Tabelle zu Reproduzierbarkeitsmessung durch 3 Untersucher 3.3.3.2

Tabelle 18: Vergleich von 3 Vermessern Intraclass Correlation Coefficients, Two-Way Mixed Effects Model (Consistency Definition)

Messpunkt	ICC 95% Confidence Interval					
		Messwert	Untere Grenze	Obere Grenze	F-Wert	Sig.
1	Einzelner Rater	0,7622	0,5847	0,8835	10,6167	0,0000
	<b>Durchschnitt der Raters*</b>	<b>0,9058</b>	0,8085	0,9579	10,6167	0,0000
2	Einzelner Rater	0,6730	0,4574	0,8338	7,1730	0,0000
	<b>Durchschnitt der Raters*</b>	<b>0,8606</b>	0,7166	0,9377	7,1730	0,0000
3	Einzelner Rater	0,6717	0,4557	0,8331	7,1388	0,0000
	<b>Durchschnitt der Raters*</b>	<b>0,8599</b>	0,7153	0,9374	7,1388	0,0000
4	Einzelner Rater	0,7342	0,5433	0,8683	9,2885	0,0000
	<b>Durchschnitt der Raters*</b>	<b>0,8923</b>	0,7812	0,9519	9,2885	0,0000
5	Einzelner Rater	0,7014	0,4965	0,8500	8,0455	0,0000
	<b>Durchschnitt der Raters*</b>	<b>0,8757</b>	0,7474	0,9444	8,0455	0,0000
6	Einzelner Rater	0,8245	0,6817	0,9161	15,0905	0,0000
	<b>Durchschnitt der Raters*</b>	<b>0,9337</b>	0,8653	0,9704	15,0905	0,0000

Freiheitsgrade für die F-Tests sind 21 und 42. Test Wert = 0.  
 \* fehlende People\*Rater Interaktion wird angenommen.  
 Reliabilitäts Koeffizient  
 Fallzahl = 22,0 Stückzahl = 3 A = ,8599 - ,9337

Tabelle 19: Übersicht der Messwerte für drei Untersucher die denselben Kiefer untersucht haben

SEITE	MESSUNG		N	Mittelwert	SD
1 bukkal	1	Untersucher 1	8	154,03	24,83
		Untersucher 2	8	129,25	17,91
		Untersucher 3	8	149,43	16,49
	2	Untersucher 1	8	120,40	38,29
		Untersucher 2	8	129,47	26,55
		Untersucher 3	8	108,38	33,75
	3	Untersucher 1	8	125,65	34,40
		Untersucher 2	8	123,02	25,02
		Untersucher 3	8	133,48	15,40
	4	Untersucher 1	8	105,38	26,14
		Untersucher 2	8	85,48	16,47
		Untersucher 3	8	92,32	8,73

	5	Untersucher 1	8	178,04	39,22
		Untersucher 2	8	168,62	34,66
		Untersucher 3	8	173,90	35,35
	6	Untersucher 1	8	190,09	30,92
		Untersucher 2	8	158,30	30,96
		Untersucher 3	8	215,86	35,76
2 lingual	1	Untersucher 1	14	98,43	50,28
		Untersucher 2	14	80,54	52,98
		Untersucher 3	14	84,16	33,49
	2	Untersucher 1	14	95,46	37,33
		Untersucher 2	14	107,78	40,94
		Untersucher 3	14	89,05	38,56
	3	Untersucher 1	14	145,79	21,51
		Untersucher 2	14	152,10	25,56
		Untersucher 3	14	156,63	29,08
	4	Untersucher 1	14	136,81	25,42
		Untersucher 2	14	158,63	31,83
		Untersucher 3	14	155,25	28,47
	5	Untersucher 1	14	180,22	44,71
		Untersucher 2	14	190,43	25,86
		Untersucher 3	14	195,67	42,48
	6	Untersucher 1	14	373,74	89,81
		Untersucher 2	14	431,77	95,99
		Untersucher 3	14	365,31	55,61

Tabelle ICC für Interratervergleich 3.3.3.2

Tabelle 20: ICC für die 3 Untersucher mit einer guten Übereinstimmung von 0,908.

Untersucher	ICC (95%-KI)
1 vs. 2	0,921 (0,890-0,943)
1 vs. 3	0,905 (0,869-0,932)
2 vs. 3	0,898 (0,859-0,926)
Gesamt (1-2-3)	0,908 (0,880-0,931)

### Bland-Altman-Diagramme 3.3.3.2

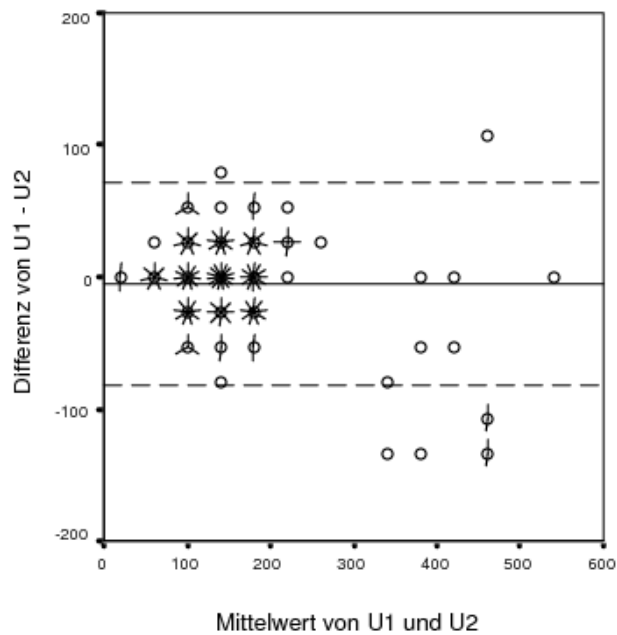


Abbildung 14: In dem Bland-Altman-Diagramm wurden die Messungen von Untersucher 1 und 2 gegenüber gestellt, indem die Differenz der Messwerte der Untersuchern 1 und 2 gegen den Mittelwert aufgetragen wurde. Durchgezogene Linie = Mittelwert; Gestrichelte Linien = Mittelwert + bzw. - 1,96 Standardabweichung. Kreis = eine Messung, Kreis mit Strich = zwei Messungen, Kreis mit zwei Strichen = drei Messungen usw. (Sonnenblumen-Plot)

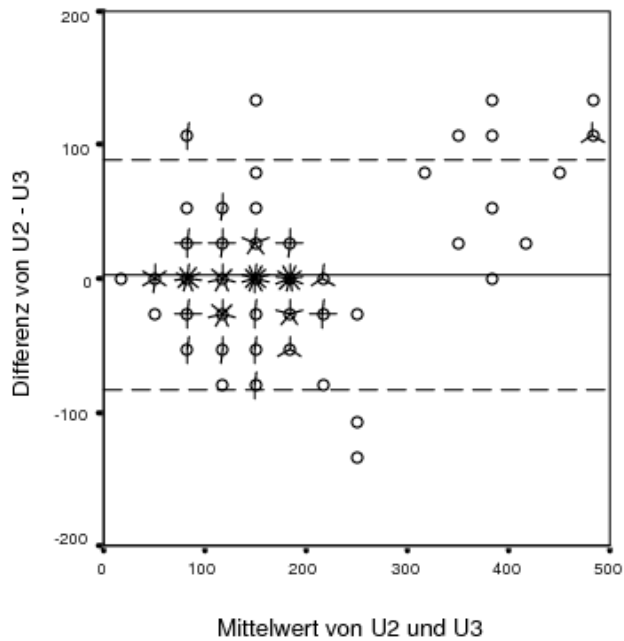


Abbildung 15: In dem Bland-Altman-Diagramm wurden die Messungen von Untersucher 2 und 3 gegenüber gestellt, indem die Differenz der Messwerte der Untersuchern 1 und 2 gegen den Mittelwert aufgetragen wurde. Durchgezogene Linie = Mittelwert; Gestrichelte Linien = Mittelwert + bzw. - 1,96 Standardabweichung Kreis = eine Messung, Kreis mit Strich = zwei Messungen, Kreis mit zwei Strichen = drei Messungen usw. (Sonnenblumen-Plot)

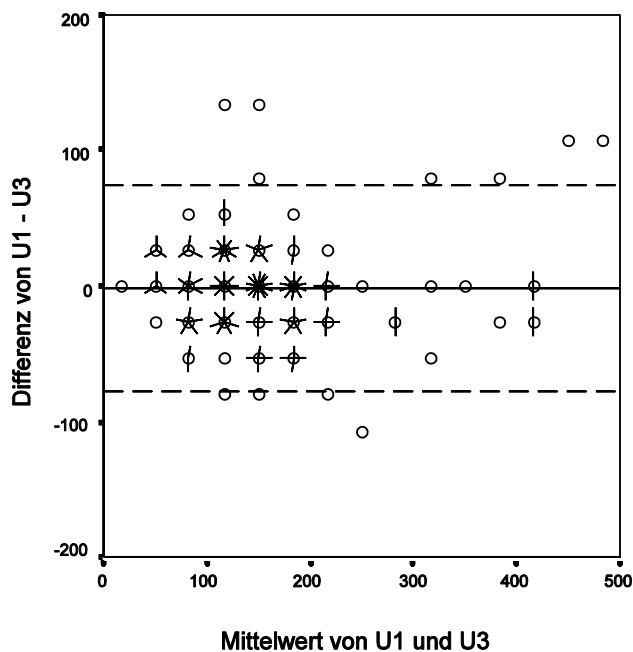


Abbildung 16: In dem Bland-Altman-Diagramm wurden die Messungen von Untersucher 1 und 3 gegenüber gestellt, indem die Differenz der Messwerte der Untersuchern 1 und 2 gegen den Mittelwert aufgetragen wurde. Durchgezogene Linie = Mittelwert; Gestrichelte Linien =



Mittelwert + bzw. - 1,96 Standardabweichung. Kreis = eine Messung, Kreis mit Strich = zwei Messungen, Kreis mit zwei Strichen = drei Messungen usw. (Sonnenblumen-Plot)

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Lübeck, den 12.03.2013

Malte Jan Dominik

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Universitätsprofessor Dr. med. dent. Thomas Kocher, Leiter des Fachbereichs Parodontologie in der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie des Zentrums für Zahn-, Mund und Kieferheilkunde der Ernst-Moritz-Arndt-Universität für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit. Mein Dank gilt in gleicher Weise Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Ivo Steinmetz, Direktor des Friedrich-Löffler-Institutes für medizinische Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität, in dessen Laboren die hauptsächliche Arbeit geleistet wurde und durch dessen intensive Betreuung dieses Projekt vorangetrieben wurde.

Ich möchte mich insbesondere für die fortwährende Unterstützung und exzellente Betreuung bei Frau Dr. med. Kathrin Breitbach bedanken. Durch ihre Unterstützung, Anregungen und wertvolle Kritik ist diese Arbeit erst ermöglicht worden.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Birte Holtfreter für die statistischen Auswertungen der gesammelten Daten und die Erstellung von Graphiken aus den Daten bedanken, ohne die ich die erzielten Ergebnisse nicht hätte interpretieren können.

Last but not least möchte ich mich recht herzlich bei Frau MTA Kerstin Scholz für die unermüdliche und immer freundliche Hilfestellung rund um die Verarbeitung der Mäuse und die Hilfe bei der Auswertung der Kiefer, sowie bei Frau MTA Helga Schalimow für die Hilfsbereitschaft und guten Tipps sowie Handreichungen im Labor bedanken.