

Nachweis von parodontopathogenen Bakterien mit Hilfe von Genchips

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Zahnmedizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Wiebke Schulthoff

aus

Hamm (Westfalen)

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr.rer.nat Georg Conrads

Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Dr.med.dent. Dr.h.c. Hubertus Spiekermann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. März 2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern
Helga und Klaus
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Intention der Arbeit	1
1.2	Parodontalerkrankungen	3
1.2.1	Definition.....	3
1.2.2	Klassifizierung.....	4
1.3	Bisherige Nachweisverfahren	11
1.3.1	Mikroskopische Verfahren	11
1.3.2	Kulturverfahren	12
1.3.3	Immunoassays.....	12
1.3.4	Enzymatische Methoden	13
1.3.5	Genetische Testmethoden.....	14
1.3.5.1	DNA-Sonden.....	14
1.3.5.2	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	14
1.4	Genchips	15
1.4.1	Definition.....	15
1.4.2	Chip-Herstellung	16
1.4.2.1	Fotolithographie und virtuelle Lochmasken.....	16
1.4.2.2	Inkjet-Printing.....	17
1.4.3	Bedeutung und Anwendungsbereiche	17
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Testprinzip	20
2.2	Das Probenkollektiv	21
2.3	Testablauf.....	22
2.3.1	Probeentnahme am Patienten	22
2.3.1.1	Material.....	22
2.3.1.2	Methode.....	23
2.3.2	Isolation der Nukleinsäure	24
2.3.2.1	Material.....	24
2.3.2.1.1	Puffer und Lösungen.....	24
2.3.2.1.2	Enzyme	24

2.3.2.1.3	Geräte	24
2.3.2.1.4	Zubehör	25
2.3.2.2	Methode	26
2.3.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
2.3.3.1	Material	27
2.3.3.1.1	Chemikalien	27
2.3.3.1.2	Geräte	28
2.3.3.1.3	Zubehör	28
2.3.3.2	Methode	29
2.3.4	Hybridisierung	30
2.3.4.1	Material	30
2.3.4.1.1	Puffer und Lösungen	30
2.3.4.1.2	Geräte	31
2.3.4.1.3	Zubehör	31
2.3.4.1.4	Aufbau des ParoCheck®-Chips	32
2.3.4.2	Methode	32
2.3.5	Auswertung	33
2.3.5.1	Material	33
2.3.5.1.1	Geräte und Software	33
2.3.5.2	Methode	34
2.3.5.2.1	Scannen des Chips	34
2.3.5.2.2	Analyse	35
2.3.5.2.3	Der ParoReport	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Ergebnisse der PCR	36
3.1.1	ParoChip1	36
3.1.2	ParoChip2	37
3.2	Ergebnisse der Hybridisierung	38
3.2.1	ParoChip1	39
3.2.2	ParoChip2	40
3.3	Ergebnisse der Bakterienanalyse	41
4	Diskussion	50
4.1	Eignung des ParoCheck®	51
4.1.1	Fehlerquellen	52
4.1.2	Gegenüberstellung der beiden Chips	54
4.1.3	Der ParoCheck®- Chip zur Routinediagnostik?	56

4.2	ParoCheck® im Vergleich mit anderen Verfahren	57
4.2.1	ParoCheck® vs. Kultur	58
4.2.2	ParoCheck® vs. enzymatische Methoden	59
4.2.3	ParoCheck® vs. Immoassays	60
4.2.4	ParoCheck® vs. DNA-Sonden	61
4.2.5	ParoCheck® vs. PCR	62
4.3	Fazit	62
5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	66
7	Danksagung	75
Anhang A	77
	Abkürzungsverzeichnis	77
Anhang B	79
	Abbildungen	79
Anhang C	87
	CD-ROM zur GenePix-Software, Bildauswertung	87
Lebenslauf	88

1 Einleitung

Die vorliegende Dissertation erörtert die Zuverlässigkeit des ParoCheck®-Genchips als Nachweisverfahren für parodontopathogene Keime. In der Einleitung wird zunächst die Intention dieser Arbeit, diese noch neue molekulargenetische Nachweismethode in der praktischen Anwendung zu testen, begründet sowie Parodontalerkrankungen definiert und deren Klassifizierung aufgeführt. Zudem werden bisherige Nachweisverfahren für bakterielle Erreger dargestellt und Bedeutung, Aufbau und Anwendung von Genchips im Allgemeinen sowie von ParoCheck®-Genchips im Speziellen erläutert.

1.1 Intention der Arbeit

Der Nachweis parodontopathogener Keime mit Hilfe von hochintegrierten Genchips soll als eine Routinemethode Verbreitung finden und etabliert werden. In der vorliegenden Dissertation wird deshalb das ParoCheck®-System mit bisherigen Analysemethoden verglichen und der aktuelle Entwicklungsstand aufgezeigt.

Folgende Punkte müssen dabei berücksichtigt und geklärt werden:

1. Die Zuverlässigkeit und Eignung des Genchips und der Auswertsysteme der Reihe ParoCheck® müssen untersucht werden
2. Mögliche Fehlerquellen während des Testverfahrens (bei der Isolation der DNA, während der PCR oder der Hybridisierung) sollen ausfindig gemacht werden, um sie in Zukunft möglichst ausschließen oder korrigierend einrechnen zu können

3. Die mitgelieferte Software des Genchips soll auf Verständlichkeit hin geprüft werden, um eine Interpretation der Ergebnisse zu optimieren.
4. Ein Vergleich zwischen den beiden ersten Versionen des ParoCheck®-Genchips unter Verwendung desselben Patientenmaterials soll Auskunft über den Grad der Weiterentwicklung des Verfahrens geben.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es letztendlich, Chancen und Risiken des ParoCheck®-Genchips herauszustellen und durch Hinweise an den Hersteller (Greiner bio-one GmbH, Lambda GmbH) zur Weiterentwicklung dieses interessanten und fortschrittlichen Diagnoseverfahrens beitragen zu können.

1.2 Parodontalerkrankungen

Die folgenden Fakten wurden im Wesentlichen dem Lehrbuch von Rateitschak et al.: „Farbatlanten der Zahnmedizin 1: Parodontologie 2004“ entnommen.

1.2.1 Definition

Als Parodontalerkrankungen werden lokale Entzündungen des Zahnhalteapparates (lat. Parodontium) bestehend aus Alveolarknochen, Gingiva, Desmodont und Zement zusammengefasst. Neben Zahnkaries gehören sie zu den am weitesten verbreiteten Krankheiten. Nach dem 40. Lebensjahr gehen in der Bundesrepublik mehr Zähne durch Parodontalerkrankungen als durch Zahnkaries verloren (Krekeler 2000).

Am häufigsten sind plaqueassoziierte, meist chronische Veränderungen der Gingiva und des Parodonts. Eine Gingivitis kann mehr oder weniger ausgeprägt sein und ist durch professionelle Reinigung der Zähne in der Regel reversibel. Die Entzündung beschränkt sich ausschließlich auf die Gingiva und geht im Gegensatz zur Parodontitis nicht mit einem Attachmentverlust einher. Die Parodontitis entwickelt sich aus der unbehandelten Gingivitis und ist nur sehr beschränkt reversibel.

Die Entstehung der Parodontalerkrankungen ist ein multifaktorielles Geschehen. So ist einerseits die Vermehrung pathogener Mikroorganismen, ihre toxische Potenz und ihre Fähigkeit, ins Gewebe einzudringen ein entscheidender Faktor genauso, wie die individuelle unterschiedliche Reaktion des Wirts auf den Infekt ein wichtiges Kriterium ist. Der Immunstatus wird wiederum von vielen Faktoren beeinflusst. So spielen die genetisch determinierte unspezifische und spezifische Immunabwehr sowie Allgemeinsyndrome und -krankheiten eine Rolle. Ebenso beeinflussen die Einstellung zum eigenen Körper, zur oralen Gesundheit im Besonderen, das soziale Umfeld, körperli-

ches und psychisches Wohlbefinden des Patienten und psychische Belastung und Stress den Immunstatus.

Eine Übersicht über die Ursachen von Parodontalerkrankungen lässt sich aus der Klassifizierung, die 1999 durch den *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* veröffentlicht wurde, ableiten.

1.2.2 Klassifizierung

1999er Nomenklatur des *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*:

I. Gingivopathien (G)

A. durch dentale Plaque induzierte G

- 1) *Ausschließlich Plaque assoziiert*
 - a ohne andere lokale Faktoren
 - b mit lokal verstärkenden Faktoren (s. VIII A)
- 2) *Systemisch verstärkt*
 - a durch endokrine Faktoren (hormonelle Einflüsse)
 1. Pubertät
 2. Menstruationszyklus
 3. Schwangerschaft
 - a) Gingivitis
 - b) Pyogenes Granulom
 4. Diabetes Mellitus
 - b durch hämatologische Erkrankungen
 1. Leukämie
 2. Andere

3) *Medikamentös verstärkt*

- a Gingivawucherungen (Hyperplasie)
- b Gingivitis
 - 1. verursacht durch orale Kontrazeptiva
 - 2. Andere

4) *aufgrund von Mangel- oder Fehlernährung*

- a Ascorbinsäuremangel
- b Andere

B. nicht durch dentale Plaque induzierte G

1) *Spezifische bakterielle Ursachen*

- a Neisseria gonorrhoea assoziiert
- b Treponema pallidum assoziiert
- c Streptokokken assoziiert
- d Andere

2) *Spezifische virale Ursachen*

- a Herpesviridae Infektionen
 - 1. primäre Herpes Simplex I Gingivostomatitis
 - 2. rezidivierender oraler Herpes
 - 3. Varizella Zoster Infektionen
- b Andere

3) *Spezifische Pilzinfektionen*

- a Candida-Spezies Infektionen
 - 1. Candidosis der Gingiva
- b lineares gingivales Erythem
- c Histoplasmose
- d Andere

4) *Gingivale Läsion genetischen Ursprungs*

- a vererbte gingivale Fibromatose

b Andere

5) *Gingivale Manifestation einer systemischen Erkrankung*

a Mukokutanen Ursprungs

1. Lichen planus
2. Pemphigoid
3. Pemphigus vulgaris
4. Erythema multiforme
5. Lupus erythematosus
6. medikamentös bedingt
7. Andere

b Allergische Reaktionen

1. Ursachen im restaurativen Material

- a) Quecksilber
- b) Nickel
- c) Acryl
- d) Andere

2. Andere

- a) Zahnpasta
- b) Mundspül- und Waschlösungen
- c) Additive von Kaugummi
- d) Nahrung und Nahrungsmittelzusätze

6) *Traumatische Läsionen*

- a Chemisch
- b Physikalisch
- c Thermisch

7) *Fremdkörper-Reaktionen*

8) *Nicht weiter spezifiziert (not otherwise specified = NOS)*

II. Chronische Parodontitis (CP)

A. lokalisiert (Befall von weniger als 30% aller Zahnseiten)

B. generalisiert (Befall von mehr als 30% aller Zahnseiten)

III. Aggressive Parodontitis (AP)

Die aggressive Parodontitis ist eine spezifische Krankheitsform mit klar erkennbaren klinischen Merkmalen und speziellen Befunden hinsichtlich der Wirt-Parasiten Interaktion. Diese beinhalten:

- Der Patient ist abgesehen von der Parodontitis klinisch gesund.
- Es liegt eine rasch fortschreitende Gewebedestruktion vor.
- Auffällige familiäre Häufung.

Oft, aber nicht immer, sind zu beobachten:

- Menge an bakteriellen Ablagerungen und Ausmaß der Gewebedestruktion korrelieren nicht miteinander
- Erhöhte Keimzahl von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und gewissen Populationen auch von *Porphyromonas gingivalis*
- Abnormale Phagozytenfunktion
- Hyperresponsiver Makrophagen-Phänotyp mit erhöhter Produktion von Prostaglandinen und Interleukin-1 β .
- Die Gewebedestruktion kann selbstlimitierend sein.

A. lokalisiert (Befall von weniger als 30% aller Zahnseiten)

- Beginn während der Pubertät
- Befall der ersten Molaren und zentralen Inzisivi
- Markante Serumantikörpertiter gegen nachgewiesene bakterielle Agenzien.

B. generalisiert (Befall von mehr als 30% aller Zahnseiten)

- Patienten sind meist jünger als 30
- Generalisierter Befall mit Attachmentverlust an mindestens drei Zähnen außer den ersten Molaren und zentralen Incisivi
- Schubhafter Verlauf
- Schwacher Serumantikörpertiter gegen nachgewiesene bakterielle Agenzien

IV. Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen (PS)**A. Bluterkrankungen**

- 1) *Erworbene Neutropenie*
- 2) *Leukämie*
- 3) *Histiocytose*
- 4) *Andere*

B. Genetische Dysfunktionen

- 1) *Hereditäre Neutropenie*
- 2) *Down-Syndrom*
- 3) *Leukozyten-Ädhäsions-Defizit Syndrom (LADS)*
- 4) *Papillon-Lefèvre Syndrom*
- 5) *Chediak-Higashi Syndrom*
- 6) *Histiocytose Syndrom*
- 7) *Glykogen Stoffwechselstörung*
- 8) *Infantile genetische Agranulozytose*
- 9) *Cohen Syndrom*
- 10) *Ehlers-Danlos Syndrom*
- 11) *Hypophosphatasie*

12) *Andere*

C. Nicht weiter spezifiziert (NOS)

V. Nekrotisierende Parodontale Erkrankungen

A. Nekrotisierende Ulzerative Gingivitis (NUG)

B. Nekrotisierende Ulzerative Parodontitis (NUP)

VI. Parodontaler Abszess

A. Gingivaler Abszess

B. Parodontaler Abszess

C. Perikoronaler Abszess

VII. Parodontitis assoziiert mit endodontalen Läsionen

A. Kombinierte parodontale-endodontale Läsionen

VIII. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände

A. Lokalisierte, zahnbezogenen Faktoren, die eine gingivale bzw. parodontale Erkrankung fördern

1) *Zahnanatomie*

2) *Zahnrestaurationen/ Zahnapparaturen*

3) *Wurzelfrakturen*

4) *Zervikale Wurzelresorptionen und Zementanomalien*

B. Mukogingivale Deformitäten in Zahnnähe

- 1) *Gingiva-Rezessionen*
 - a Fazial und oral
 - b approximal
- 2) *Störung der Gingiva-Keratinisierung*
- 3) *Reduzierte vestibuläre Tiefe der angewachsenen Schleimhaut*
- 4) *Lokalisation des Zungen- und Lippenbändchens*
- 5) *Gingivale Vergrößerungen*
 - a Pseudotaschen
 - b Unregelmäßiger Gingivalrandverlauf
 - c Gingivawucherungen (siehe I.A.3 und I.B.4)
- 6) *Farbveränderungen*

C. Mukogingivale Deformitäten an zahnlosen Alveolarkämmen

- 1) *Vertikaler und horizontaler Knochenabbau*
- 2) *Störung der Gingiva-Keratinisierung*
- 3) *Gingiva- bzw. Weichgewebewucherungen*
- 4) *Abnormale Lokalisation des Zungen- und/ oder Lippenbändchens*
- 5) *Reduzierte Tiefe des Vestibulums*
- 6) *Farbveränderungen*

D. Okklusales Trauma

- 1) *primär*
- 2) *sekundär*

1.3 Bisherige Nachweisverfahren

Mikrobiologische Nachweismethoden für parodontopathogene Keime sind vor allem bei aggressiven Parodontitiden und bei Patienten, bei denen eine schwere chronische Parodontitis mit einer systemischen Erkrankung (z.B. Diabetes, AIDS) vergesellschaftet ist, indiziert und hilfreich. So kann die mechanische Therapie durch eine antimikrobielle Chemotherapie ergänzt werden. Außerdem lassen sich so Therapieerfolge nachweisen.

Zum Nachweis wurden bisher mikroskopische Methoden, Bakterienkulturen, Immunfluoreszenz, enzymatische Methoden, DNA- oder RNA- Sonden sowie serologische Verfahren herangezogen.

1.3.1 Mikroskopische Verfahren

Mit der Dunkelfeld-/ Phasenkontrastmikroskopie ist eine Diagnose direkt am Behandlungsstuhl möglich. Es können allerdings nur Morphotypen, d.h. die Zellform eines Bakteriums und seine Beweglichkeit bestimmt werden. So lassen sich nur beschränkt Rückschlüsse auf die Pathogenität der Mikroflora ziehen. Anhand des Verhältnisses zwischen Kokken und beweglichen Stäbchen kann die Aktivitätsphase der Taschenflora beurteilt werden (Listgarten 1986). Eine spezifische Aussage über Anwesenheit pathogener Leitkeime in der Tasche kann anhand dieser Testmethode jedoch nicht gemacht werden.

1.3.2 Kulturverfahren

Bakteriologische Kulturverfahren gehören zu den ältesten „klassischen“ Diagnosemethoden (Slots, 1986). Die Keime müssen hierbei vital erhalten bleiben. Hieraus ergeben sich bereits die ersten Probleme. Bei Entnahme und Transport der Probe kommen die meist anaeroben parodontopathogenen Markerbakterien mit Sauerstoff in Kontakt. Das Redoxpotential der Probe steigt, so dass obligat anaerobe Bakterien teilweise absterben und so der kulturellen Anzucht entzogen sind. Die Anzucht ist außerdem recht zeit- und personalaufwendig, erfordert besondere mikrobiologische Kenntnisse sowie eine entsprechende Laborausstattung. Dies begründet auch den relativ hohen Preis dieser Untersuchungsmethode. Bakterienspezies wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Tannerella forsythensis* (T.f.), *Capnocytophaga* spp. (Cap. spp.), *Eikenella corrodens* (E.c.) sowie *Fusobacterium* spp. (F. spp.) lassen sich sowohl auf selektiven als auch auf nichtselektiven Nährböden gut nachweisen. Spirochäten sind bis jetzt jedoch auf festen Kulturböden kaum anzüchtbar.

Unverzichtbar ist die Möglichkeit der Herstellung eines AntibioGRAMMs. Es demonstriert gegen welche Antibiotika ein bestimmter Keim sensibel oder resistent ist.

1.3.3 Immunoassays

Bei immunologischen Testverfahren werden Bakterien aufgrund spezifischer antigener (Ag) Oberflächenmarker wie Pili und Fimbrien (meist Kohlenhydrate und Glykoproteine) identifiziert, indem sich spezifische monoklonale Antikörper (Ak) daran heften. Um die Ag-Ak-Bindung sichtbar zu machen, werden die Ak mit enzymartigen Farb- oder fluoreszierenden Stoffen, so genannten Reportermolekülen, versehen. Für den Test wird die Bakterienprobe auf einem Glasobjektträger fixiert. Die zugegebenen spezifischen Antikörper binden an die typenspezifischen Oberflächenantigene

der Bakterien. Tragen die zugegebenen Ak bereits ein fluoreszierendes Reportermolekül, handelt es sich um eine direkte Immunofluoreszenz. Bei der indirekten Immunofluoreszenz bindet in einem zweiten Schritt ein markierter Antikörper (z.B. goat anti mouse) an die bereits zugegebenen unmarkierten Antikörper. So lässt sich die Fluoreszenz im UV-Licht (Ag-Ak-Reaktion) verstärkt sichtbar machen. Die Ag-Ak-Reaktion kann unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden (Zambon 1986). Bei dieser Nachweismethode werden tote und lebende Bakterien erfasst, die sich mit neueren Techniken sogar unterscheiden lassen (Netuschil et al. 1996). Als Routine-methode hat dieser Test jedoch in der Parodontitiserreger-Diagnostik wenig Verbreitung gefunden.

1.3.4 Enzymatische Methoden

Bei dem so genannten BANA-Test wird die entnommene Probe auf ein trypsinähnliches Enzym hin untersucht, wie *T.f.*, *T.d.* und *P.g.* es in ihrem Stoffwechsel bilden. BANA steht für *N- α -Benzoyl-DL-Arginin-2-Naphtylamid*. Es ist ein synthetisches Substrat und wird durch eine bakterielle Peptidase hydrolysiert. Eines seiner Spaltprodukte (β -Naphtylamid) kann in einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden und so zum Keimnachweis dienen (Loesche 1986). Leider werden enzymnegative parodontopathogene Keime wie *A.a.* mit diesem Test nicht erfasst. Ein weiterer Nachteil ist, dass einige weniger pathogene Keime (z.B. *Capnocytophaga* spp.) ebenfalls ein positives Ergebnis herbeiführen können.

1.3.5 Genetische Testmethoden

1.3.5.1 DNA-Sonden

Bei den Gensondentests werden meist radioaktiv markierte Oligonukleotidsequenzen (DNA-Sonden mit 24-30 Basenpaaren) eingesetzt, die an komplementäre bakterielle DNA- bzw. RNA-Sequenzen hybridisieren. Dafür werden die Bakterien der Probe aufgelöst, die DNA- bzw. RNA-Doppelstränge separiert, denaturiert und auf einer Membran fixiert. Da in jedem Bakterium nur ein DNA-Satz vorhanden ist muss für eine DNA/DNA-Hybridisierung eine PCR vorgeschaltet werden, mit deren Hilfe die Template-DNA-Sequenz *in vitro* vermehrt wird. Für eine RNA/DNA-Hybridisierung ist das nicht erforderlich (rRNA-Templatemoleküle 1000-10000fach in den Ribosomen der bakteriellen Zelle vorhanden). Für den Test sind auch keine lebenden Bakterien notwendig, was die Anforderungen an den Transport ins Labor einfacher gestaltet. In den bisher bekannten genetischen Verfahren wurden jedoch nur maximal elf Spezies berücksichtigt bzw. gleichzeitig detektiert.

1.3.5.2 Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Bei der PCR wird eine artspezifische Gensequenz eines Bakteriums mit Hilfe von zwei Primern und einer enzymatisch katalysierten Polymerisierung (Enzym: hitzebeständige Taq-Polymerase) *in vitro* amplifiziert und anschließend sichtbar gemacht. Bei dem charakteristischen Genbereich kann es sich z.B. um die Signatursequenz der 16 rDNA handeln (Slots et al. 1995, Ashimoto et al. 1996) oder aber um spezielle Matrizen wie das Leukotoxin-Gen von *A.a.* oder das Kollagenasegen von *P.g.*. Die PCR ist jedoch so sensitiv (< 100 Zellen), dass selbst kleinste Mengen, die klinisch wenig Relevanz haben, noch detektiert werden. Mit modernen real-time PCRs und Endpoint PCRs können auch quantitative Ergebnisse erzielt werden (Lyon et al.

2000, Shelbourne et al. 2000, Morillo et al. 2003, Rudney et al. 2003, Kuboniwa et al. 2004, Nonnemacher et al. 2004). Die Verfahren sind jedoch noch in der Entwicklung. Speziell sind noch die Probleme der Multiplex-Varianten und einer preisgünstigen (ökonomischen) Durchführung zu lösen.

1.4 Genchips

Die folgenden Fakten sind im Wesentlichen dem Artikel von Diethard Baron „Genomics und Proteomics mit Genchips und Protein-Arrays“ von <http://www.pharmazeutische-zeitung.de> entnommen.

1.4.1 Definition

Genchips, auch DNA-(Micro)Arrays genannt, sind miniaturisierte Träger von DNA-Molekülen bekannter Sequenz, die in einem definierten Raster (Array) immobilisiert oder synthetisiert sind. Die gebundenen DNA-Moleküle werden mit komplementären markierten (meist fluoreszierenden) Nukleinsäuren hybridisiert. Man unterscheidet „Photolithographische-Chips“, bei denen schrittweise Nukleotide auf der Chipoberfläche (on chip) synthetisiert werden, von „DNA-Chips“, bei denen ein fertiges Stück Nukleinsäure auf der Chipoberfläche angeheftet wird. Die gekoppelten bzw. on chip synthetisierten Oligonukleotide haben eine Länge von 10 bis 70 Basen, während cDNA und Genfragmente, die auch auf dem DNA-Chip angeheftet werden, eine Länge von 100 Basen und mehr besitzen. Zur Realisierung des Chip-Prinzips mussten Biologen, Biotechnologie-Ingenieure, Chemiker, Computerwissenschaftler, Mediziner und Physiker Hand in Hand arbeiten. Nur so konnte ein Zusammenspiel der verschiedenen Fachdisziplinen und Methoden wie DNA-Synthese, Oligonukleotid-Synthese, Neuentwicklung und Synthese von Fluoreszenzfarbstoffen, Markierung mit

Fluoreszenzfarbstoffen, Oligonukleotid-Immobilisierung, Festphasentechnik, Lasertechnologie für Detektionssysteme, Chip und Wafer-Herstellung, Geräteentwicklung, Datenanalyse mit geeigneter Software inklusive der Entwicklung geeigneter bildgebender Algorithmen realisiert werden.

1.4.2 Chip-Herstellung

1.4.2.1 Fotolithographie und virtuelle Lochmasken

1990 gründete Affymetrix die erste Genchip-Firma in den USA. Zur Herstellung des Chips setzten sie 1991 erstmals erfolgreich die Fotolithographie ein, die auf einer Licht vermittelten, kombinatorischen Festphasenchemie beruht. Dabei wird die Oberfläche des Chips mit einem lichtempfindlichen Material beschichtet. Dieses wird durch Bestrahlung stellenweise aktiviert, so dass Nukleotide an den belichteten Stellen kovalent binden können. Damit dies an definierten Positionen geschieht, wird eine Lochmaske über den Chip gelegt. Werden nun zum Beispiel Adenin-Nukleotide zugegeben, binden sie chemisch an den durch Belichtung aktivierten Positionen. Auch die Adenin-Nukleotide sind chemisch voraktiviert. Nach Abdeckung des Chips durch eine zweite Lochmaske werden chemisch voraktivierte Cytosin-Nukleotide zugegeben. Diese binden sowohl an die fotochemisch aktivierten Positionen auf dem Chip als auch an die (frei gehaltenen) aktivierten Adenin-Nukleotide, so dass nun Mono- und Dinukleotide vorliegen. Im nächsten Schritt wird wieder eine andere Lochmaske verwendet, und es werden aktivierte Guanin-Nukleotide zugegeben, was zu definierten Mono-, Di- und Trinukleotiden mit bekannter Sequenz führt. Das Maskierungsverfahren kann bis zu 20 Mal wiederholt werden. Die zugehörige bildgebende Software kann jeder Position ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz zuordnen. Eine Weiterentwicklung der Fotolithographie ist eine als „Virtuelle Lochmaske“ bezeichnete DLP-Technik (**D**igital **L**ight **P**rocessing). Dabei aktivieren kleine einzeln

steuerbare Mikrospiegel die Chipoberfläche an beliebigen Positionen punktgenau und fotochemisch durch gezielte Lichtstrahlen.

1.4.2.2 Inkjet-Printing

Bei der Methode des Inkjet-Printings werden DNA-haltige Mikrotröpfchen (von 1000 Picoliter bis maximal drei Mikroliter) mit Hilfe des piezoelektrischen Effekts auf eine Oberfläche gespottet entsprechend dem Prinzip eines Tintenstrahldruckers. Als fester Träger findet meist ein aktivierter, aber sonst klassischer mikroskopischer Objektträger Verwendung. Auf diese Weise können bis zu 15.000 Miniaturspots mit einem Durchmesser von je weniger als 100 µm aufgetragen werden.

Eine Optimierung stellt die Capillary Tube Technologie dar, bei der die DNA-Proben über Kapillarkräfte eingesaugt werden, sowie das Titanium Pin Prinzip, bei dem die DNA-Lösung auf einer konkaven Pin-Oberfläche an einem Titanstift festgehalten und zum gewünschten Ziel auf dem Objektträger transferiert wird.

1.4.3 Bedeutung und Anwendungsbereiche

Genchips sind aus der heutigen DNA-Analyse nicht mehr wegzudenken. Sie gehören nicht nur in der Gerichtsmedizin bei der Identifizierung von Spurenfunden zum Standard, sondern auch in der Nahrungsmittelindustrie bei der Feststellung von Produktanteilen aus gentechnischen veränderten Organismen (GVO) und in der Umweltanalyse beim Nachweis von Mikroorganismen. Ebenso werden sie in der klinischen Diagnostik bei der Identifikation von Erregern, in der Evolutionsbiologie bei der Feststellung von Verwandtschaften und in der Archäologie bei der Zuordnung von fossilen Funden regelmäßig eingesetzt. Vor allem in der Pharmakokinetik spielt die DNA-Technologie eine herausragende Rolle. So beschreiben zahlreiche Wissenschaftler

wie z.B. Ross et al. 2005, Vizirianakis 2004, Yan et al. 2005, Jain 2005 und Lindpaintner 2004 wie mit Hilfe von DNA-Microarrays die Wirksamkeit von Medikamenten enorm gesteigert werden kann und Nebenwirkungen minimiert, sowie Resistenzen erkannt und direkt berücksichtigt werden können. So werden vor allem Therapien bei Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen effizient individualisiert und somit verbessert.

Es ist also beispielsweise möglich, Mutationsanalysen des Brustkrebsgens durchzuführen, so dass individuelle Risiken zeitnah abgeschätzt werden können. Weiterhin sind schnelle Genotypisierungen von Mykobakterien zuverlässig möglich sowie der Nachweis eventueller Resistenzen gegen Standard-Antibiotika, z.B. gegenüber Rifampicin.

Außerdem lassen sich Resistenzen von HI-Viren gegen Medikamente schnell und effizient aufspüren noch bevor sich der Gesundheitszustand des Patienten verschlechtert, was einen vorzeitigeren Medikamentenwechsel als bei der bisherigen Symptomdiagnostik ermöglicht.

In Tabelle 1 sind wesentliche Anwendungsmöglichkeiten von DNA-Chips in Therapie, Diagnostik, Pharmazie, Produktion, Ernährung und Ökologie zusammengefasst.

Anwendungsbereich	Zielsetzung
Medikamentenentwicklung	gezieltes und schnelles Medikamentendesign
Pharmakologie Pharmakokinetik	Molekulares Verstehen von Medikamentenwirkung und Nebenwirkung
Qualitätskontrolle	Reinheitsnachweis von synthetischen Oligonukleotiden und Genen
In-Prozess-Kontrolle	Genetische Veränderungen bei normalen und rekombinanten Zellen während der Fermentation
Diagnostik	Identifizierung von Erregern Bestimmung von Medikamentenresistenz

Krebsforschung	Identifizierung von Krankheitsgenen Bestimmung des individuellen Krebsrisikos
Mikrobiologie	Identifizierung und Klassifizierung von Mikroorganismen
Nahrungsmittelsektor	Identifizierung von gentechnisch veränderten Nahrungsmitteln
Pflanzenzüchtung	Molekulare Marker für Pflanzenkreuzung
Ökologische Studien	Mikrobielle Kontamination von Grundwasser oder Böden
Differenzielle Genexpression	Verstehen von Zellspezialisierung und Zellentartung

Tabelle 1: aktuelle Anwendungsmöglichkeiten von DNA-Chips

Auch bei der SNP-Analyse („single nucleotide polymorphism“= Variation einer Base) ist der Genchip unverzichtbar. Das menschliche Genom besteht insgesamt aus etwa 3,4 Milliarden Basenpaaren, bei denen durchschnittlich alle 500 bis 1000 Basenpaare ein SNP vorkommt. Es ergeben sich also drei bis sechs Millionen SNPs. Diese SNPs sind personenspezifisch. Sie sind sowohl für die Diagnostik als auch für die Therapie interessant, da sie Krankheitsneigung und Medikamentenwirkung steuern. Etwa zehn Prozent aller menschlichen Erkrankungen beruhen auf SNPs.

Die kleine Auswahl der Beispiele und das oben angedeutete Anwendungsspektrum der DNA-Analyse mittels Genchip zeugen von der Wichtigkeit der Methode für die Laborarbeit vieler Fachgebiete. Die zeitnahe und ressourcenschonende Auswertung haben sich in den letzten Jahren bewährt und bedeuten große Vorteile gegenüber bisherigen Techniken.

Dauerhaftes Ziel ist es, die bestehende Methode immer weiter zu optimieren und neue Technologien zu etablieren, um den ständig steigenden Ansprüchen der Praxis gerecht zu werden. Denn auch an dieses Analyseverfahren werden die Anforderungen gestellt, möglichst schnell, billig, empfindlich, zuverlässig und reproduzierbar zu sein.

2 Material und Methoden

2.1 Testprinzip

ParoCheck® ist der erste DNA- Chip zum semi-quantitativen Nachweis Parodontitis assoziierter Keime. Mit dem ParoCheck® Kit 20 lassen sich folgende Parodontalpathogene nachweisen: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Actinomyces odontolyticus* (A.o.), *Tannerella forsythensis* (T.f.), *Campylobacter concisus* (C.c.), *Campylobacter gracilis* (C.g.), *Campylobacter rectus* (C.r.), *Capnocytophaga gingivalis* (Cap.g.), *Eikenella corrodens* (E.c.), *Eubacterium nodatum* (E.n.), *Fusobacterium nucleatum* (F.n.), *Peptostreptococcus micros* (P.m.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Prevotella nigrescens* (P.n.), *Streptococcus constellatus* (S.c.), *Streptococcus gordonii* (S.g.), *Streptococcus mitis* (S.m.), *Treponema denticola* (T.d.), und schließlich *Veillonella parvula* (V.p.).

Nach Extraktion der bakteriellen DNA wurde ein ca. 300 Nukleotid langes DNA Fragment des 16S rRNA Gens aller vorhandener Bakterien der Probe in Gegenwart eines hochkonservierten Primerpaares mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die doppelsträngigen PCR-Amplifikate wurden denaturiert und führten zu einzelsträngigen DNA-Fragmenten, die mit Cy5 Fluorophor Molekülen markiert wurden.

Die markierten Sonden hybridisierten an komplementäre Sequenzen, die auf dem Chip verankert waren. Der Nachweis der Parodontalpathogene erfolgte auf zwei verschiedenen Chips: Auf dem ersten, älteren Format (zum Zwecke der Übersicht im Folgenden als ParoChip1 bezeichnet) in Form von Tripletbestimmungen, d.h.: für jedes Bakterium lagen jeweils drei Messpunkte vor; auf dem zweiten, jüngeren Format (als ParoChip2 bezeichnet) lagen für jedes Bakterium bereits fünf Messpunkte

vor. Falschgebundene bzw. überschüssige Sonden wurden in den folgenden Waschschrritten weggespült.

Die gebundenen und markierten Sonden wurden abschließend durch die Anregung mit monochromatischem Licht detektiert. Die Software-gesteuerte Auswertung der gebundenen Sonden erfolgte mit Hilfe des Paroreports.

2.2 Das Probenkollektiv

Für die hier vorliegende Dissertationsarbeit wurden zehn Proben von zehn verschiedenen Patienten genommen. Es handelte sich um fünf Männer und fünf Frauen im Alter von 38 bis 65 Jahren. Alle Patienten litten unter einer chronischen, generalisier-ten Parodontitis. Darunter waren schwere akute Parodontitiden mit einem Attach-mentverlust von bis zu 15 mm, aber auch leichte Fälle mit Taschentiefen von nur vier bis fünf Millimetern als Kontrast. Unter den Patienten befanden sich vier Raucher und fünf Patienten mit medikamentös eingestellter Hypertonie. Jeder Untersuchung wur-de eine ausführliche Anamnese und Befunderhebung sowie ein Parodontalstatus zugrunde gelegt. Ein Anamnese- und Befundbogen sowie ein exemplarischer Paro-dontalstatus sind angefügt.

Die Patientendaten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

1	weiblich	65	7 mm	nein	medikamentös eingestellte Hypertonie
2	weiblich	51	15 mm	nein	medikamentös eingestellte Hypertonie
3	weiblich	52	12 mm	nein	medikamentös eingestellte Hypertonie

4	männlich	52	7 mm	nein	-----
5	weiblich	53	9 mm	nein	-----
6	weiblich	50	6 mm	10/ Tag	-----
7	männlich	42	6 mm	20/ Tag	medikamentös eingestellte Hypertonie
8	männlich	38	4 mm	10/ Tag	-----
9	männlich	59	6 mm	nein	medikamentös eingestellte Hypertonie
10	männlich	51	7 mm	Pfeife	-----

Tabelle 2: Patientendaten

2.3 Testablauf

2.3.1 Probeentnahme am Patienten

2.3.1.1 Material

Alfred Becht GmbH, Offenburg, Germany,
Sterile Papierspitzen ISO 45

Sarstedt, Nürnberg, Germany
Mikro-Röhren, 1,5 ml, Verschluss farblos

RTF (reduced transport fluid) mit 25% Glukose

Zusammensetzung nach Syed S.A, Applied Microbiology 24:638 (1972)

1. Mineralsalz- Stammlösung Nr.1

75,0 ml

0,6 % Di- Kaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 (Merck 5100)	
2. Mineralsalz- Stammlösung Nr.2	75,0 ml
1,2 % Kochsalz NaCl (Merck 1.06400)	
1,2 % Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$ (Merck 2111)	
0,6 % Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (Merck 4872)	
0,25 % Magnesiumsulfat $MgSO_4$ (Merck 5886)	
3. 0,1 M EDTA (Roth 8043)	10,0 ml
4. 8 % Natriumcarbonat Na_2CO_3 (Merck 6392)	5,0 ml
5. 1 % Dithiothreitol (Sigma D- 0632) Frisch angesetzt	20,0 ml
6. 0,1 % Resazurin (Serva 34226) optional	1,0 ml
7. Glukose (Merck 8342)	250,0 g
8. Aqua dest	ad 1000,0 ml

2.3.1.2 Methode

Nach ausführlicher Befunderhebung und Erstellen eines Parodontalstatus` wurden die Zähne supragingival gereinigt. Pro Patient wurden zwei Proben aus den tiefsten Taschen mit Blutungstendenz entnommen. Dazu wurden pro Tasche 5 sterile Papierspitzen mit Hilfe einer sterilen Pinzette für ca. 15 Sekunden in den Fundus der Tasche gehalten. Die fünf Papierspitzen einer Probeentnahmestelle wurden zusammen in einem Probengefäß transportiert und aufbewahrt. Das Probengefäß enthielt 150 µl RTF mit 25% Glukose. Es wurde auf eine unverwechselbare Kennzeichnung der Probengefäße geachtet. Vor Weiterverarbeitung der Proben konnten diese entweder für vier Tage bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden oder für eine längerfristige Lagerung eingefroren werden.

2.3.2 Isolation der Nukleinsäure

2.3.2.1 Material

2.3.2.1.1 Puffer und Lösungen

Aqua bidest / DEPC

Diethylpyrocarbonat (DEPC) wird zu 0,07% bidestilliertem Wasser zugesetzt

Qiagen, Hilden, Germany

ATL- Puffer, AL- Puffer, AW1- Puffer, AW2- Puffer

Im QIAamp DNA Mini Kit (250) enthalten

Ethanol 100% ig

2.3.2.1.2 Enzyme

Qiagen, Hilden, Germany:

Proteinkinase K

Im QIAamp DNA Mini Kit (250) enthalten

2.3.2.1.3 Geräte

IKA®, Staufen, Germany

Minishaker MS1

Eppendorf, Hamburg, Germany

Centrifuge 5804

GFL

Wasserbad

Pharmacia Biotech, Cambridge, England

Photometer, RNA/ DNA- Calculator, Gene Quant II

2.3.2.1.4 Zubehör

Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, USA

Glasperlen, 2 mm Ø

Sarstedt, Nürnberg, Germany

1,5 ml Micro Tubes,

sterilisierbar, thermisch hoch belastbar

Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, USA

0,65 ml Microcentrifuge tubes

sterilisierbar, thermische Belastung: -180°C bis 121°C

Qiagen GmbH, Hilden, Germany

Spin Columns mit 2 ml-Röhrchen

Eppendorf; Hamburg, Germany

Kolbenhubpipette Research, 20-500 µl

Gilson, Inc., Middleton, USA

Kolbenhubpipette Pipetman® P, 20-500 µl

Kabe Labortechnik GmbH, Nürnberg- Elsenroth, Germany

Pipettenspitzen blau

Max. Füllvolumen: 1000 µl

Sarstedt, Nürnberg, Germany

Pipettenspitzen gelb

Max. Füllvolumen: 200 µl

2.3.2.2 Methode

Für die DNA-Sondenhybridisierung wird die rRNA-Geninformation der Bakterien benötigt. Auf die Isolierung dieser DNA in Reinform wurde verzichtet und die gesamte bakterielle Nukleinsäure (DNA und RNA) isoliert. Bei der spezifischen Hybridisierung störten die Begleitnukleinsäuren nicht und wurden in darauf folgenden Waschschritten weggespült. Die Isolierung geschah wie folgt mit Hilfe des Qiasm Mini Kit 250 von Qiagen.

Die eingefrorenen Patientenproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Den Papierspitzen in dem RTF-Fluid wurden je 100 µl Aqua bidest und ca. 5–6 Glaskugeln zugegeben und auf dem Minishaker MS1 kräftig geschüttelt. In 0,65 ml Reagiergefäße wurden mit Hilfe einer spitzen Pinzette kleine Löcher an der Unterseite gestochen. Die Papierspitzen des Probengefäßes wurden in die gelochten Reagiergefäße gegeben. Reagiergefäß und Probengefäß wurden zusammengesetzt und bei 8000 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Das Reagiergefäß mit den Papierspitzen wurde verworfen und der Überstand vom Sediment samt Glaskugeln abgegossen. Das Sediment wurde mit 200 µl Bidest + DEPC resuspendiert, kräftig geschüttelt und bei 8000 U/min für 5 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dem Sediment 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinkinase K zugegeben. Die Suspension wur-

de gemischt und 30 min im 56 °C Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer wurde die Suspension geschüttelt und bei 70 °C für 10 min im Wasserbad inkubiert. Danach wurden 200 µl 100% iges Ethanol zugegeben und die geschüttelte Suspension in eine Spin Column, fixiert in einem 2 ml- Röhrchen, pipettiert. Das Ganze wurde 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert und danach die Spin Column auf ein neues 2 ml- Röhrchen gestellt. Der Suspension wurden 500 µl AW1-Puffer zugegeben. Es wurde geschüttelt und bei 8000 U/min für 1 min zentrifugiert. Die Spin Column wurde erneut auf ein neues 2 ml-Röhrchen gestellt. Nach Zugabe von 500 µl AW2-Puffer, Schütteln und 3 min bei 13000 U/min Zentrifugieren wurde die Spin Column auf ein 1,5 ml Reagiergefäß gesetzt und die Säulen-gebundene Nukleinsäure in 100 µl 70°C vorgewärmten Aqua bidest + DEPC langsam gelöst. Die Säule wurde dazu 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Die sich in der Säule noch befindliche Restnukleinsäure wurde noch einmal wie gerade beschrieben in vorgewärmtem Aqua bidest aufgenommen, inkubiert und zentrifugiert.

Die Konzentrationen der beiden entstandenen Lösungen (Nukleinsäure in 100 µl Aqua bidest) derselben Ausgangsprobe wurden nun durch eine photometrische Messung einer 1:19 Verdünnung bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Die DNA-Konzentration sollte zwischen 5 µg/ ml und 30 µg/ ml liegen.

2.3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.3.3.1 Material

2.3.3.1.1 Chemikalien

Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, Germany

MasterMix, enthält Cy5- Fluoreszenz markierte spezifische Primer und Kontroll- Primer; Kontroll-DNA; Puffer und Nukleotide

Im ParoCheck®- Kit 20 enthalten

Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Germany

Taq DNA- Polymerase, aus *Thermus aquaticus* BM, rekombinant (*E. coli*)

2.3.3.1.2 Geräte

Biometra, Göttingen, Germany

Uno Thermoblock mit beheizbarem Deckel

10/ 03 geprüft nach BGV A2

Erlab group, Köln, Germany

Biocap^{RNA/DNA} PCR-Werkbank

2.3.3.1.3 Zubehör

Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, USA

0,65 ml Microcentrifuge tubes

sterilisierbar, thermische Belastung: -180°C bis 121°C

Eppendorf; Hamburg, Germany

Kolbenhubpipette Research, 0,5-20 µl

MSD Sharp & Dohme GmbH, München, Germany

Pipettenspitzen kristall

Max. Füllvolumen: 10 µl

Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Germany

SelfSeal-Tips® Premium

Sterile Filtertips mit "sealing filter"

Max. Füllvolumen: 10 µl

2.3.3.2 Methode

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde das für jedes Bakterium spezifische 16S rRNA Gen, bzw. ein 300 bp Fragment davon, amplifiziert. Die Verwendung eines Fluoreszenz (Cy5) markierten Reversed-Primers ermöglichte die spätere Detektion der gebundenen DNA.

Die PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Bestandteile wurden nach Tabelle 3 gemischt.

	1 PCR Reaktion
Bakterielle DNA	2 µl
PCR Master Mix	17,5 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 3: Bestandteile der PCR

Der Master Mix und die Taq- Polymerase wurden an der Biocap Werkbank zur Vermeidung jeglicher Kontamination in 0,65 ml Reagiergefäße pipettiert. Anschließend wurde die bakterielle DNA dazu pipettiert und das Reagiergefäß in den Uno Thermoblock gestellt. Hier fand die Amplifikation der DNA unter den in Tabelle 4 angegebenen Bedingungen statt.

Zeiten	Temp. °C	Zyklusanzahl
1 min	94	1
20 sec	95	
20 sec	60	45
30 sec	72	
1 min	72	1
Hold	22	

Tabelle 4: Bedingungen der Amplifikation

Nach erfolgter PCR konnten die Amplifikate für einige Tage bei 4°C im Dunkeln gelagert oder eingefroren werden.

2.3.4 Hybridisierung

2.3.4.1 Material

2.3.4.1.1 Puffer und Lösungen

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany

Hybridisierungspuffer, enthält Blocking-Reagenzien, Cy3 markierte Sonden für Spot- und Hybridisierungskontrolle

Im ParoCheck® Kit 20 enthalten

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany

Waschpuffer A (Konzentrat), Waschpuffer B (Konzentrat)

Im ParoCheck® Kit 20 enthalten

Aqua bidest, 2 x destilliertes Wasser

2.3.4.1.2 Geräte

Biometra, Göttingen, Germany

CompactLine OV 4 Hybridisierungssofen

Nach BGV A2 nächste Überprüfung 10/ 04

2.3.4.1.3 Zubehör

Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, Germany

ParoChip1: Glasobjektträger 25 mm x 76 mm mit insgesamt 86 DNA-Messpunkten auf einer Fläche von ca. 24 mm²,

ParoChip2: Plexiglasobjektträger 25 mm x 76 mm mit zwölf 6x6 großen Vertiefungen, die auf 8 mm² jeweils 120 DNA-Messpunkte enthalten

Im ParoCheck® Kit 20 enthalten

Filterpapier

VWR, Darmstadt, Germany

Deckgläser, 25 mm x 25 mm

Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Germany

Messzylinder 100 : 1 ml

Schott-Duran, Mainz, Germany

Becherglas 100 ml

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany

50 ml-Röhrchen mit Schraubverschluss

2.3.4.1.4 Aufbau des ParoCheck®-Chips

Der ParoChip1 (Erstversion des ParoCheck-Chips) ist ein Glasobjektträger und nur für eine einzelne Patientenprobe geeignet. Er umfasst auf einer Fläche von 24 mm² 86 Messpunkte, die einen Durchmesser von ca. 200 µm und einen Abstand zueinander von ca. 300 µm haben. Für jedes Bakterium liegen drei Messpunkte vor. Im Gegensatz dazu ist der ParoChip2 (aktuelle 2006-Version) ein Plexiglasobjektträger und für 12 Patientenproben geeignet. In 6x6mm großen Vertiefungen liegen auf 8 mm² bereits 120 Messpunkte, die einen Durchmesser von 150 µm und einen Abstand von 275 µm haben. Für jedes Bakterium liegen fünf Messpunkte vor. Für beide Chips wurden Fluorophor markierte Primer für die PCR (Cy5 markiert) und Fluorophor markierte Sonden für interne Kontrollsysteme (Cy3 markiert) verwendet, von denen es jeweils drei gibt: 1.) interne Orientierungskontrolle; 2.) interne PCR-Kontrolle; 3.) interne Hybridisierungskontrolle.

2.3.4.2 Methode

Bei der spezifischen Hybridisierung binden die markierten PCR-Amplifikate an komplementäre Sequenzen (als Fänger- oder Catchersonden bezeichnet), die auf den Chips verankert sind.

Zunächst mussten die Waschpuffer vorbereitet werden. Dazu wurden für den ParoChip1 81 ml Aqua bidest mit 8 ml Waschpufferlösung A und mit 1 ml Waschpufferlösung B gemischt. Die Mischung wurde zu je 30 ml auf drei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Für den ParoChip2 wurden 120 ml Aqua bidest mit 12 ml Waschpufferlösung A und 1,5 ml Waschpufferlösung B gemischt und gleichmäßig auf drei Reaktionsgefäße aufgeteilt. So ergaben sich für jeden Chip Waschpuffer I, II und III.

Für die Hybridisierung wurden beide Chips für mindestens 5 min in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre inkubiert. Währenddessen wurde das PCR-Produkt

für 3 min bei 96°C im Biometra Uno Thermoblock denaturiert. Bei dem ParoChip1 wurden 15 µl des PCR-Ansatzes auf die Oberfläche des Chips transferiert und mit einem Deckglas überlagert. Bei ParoChip2 wurden jeweils 25 µl in die kleinen quadratischen Vertiefungen gegeben. Der Einschluss von Luftblasen war unbedingt zu vermeiden. Jeder Chip wurde für 10 min bei 60 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Bei ParoChip1 wurde danach das Deckglas entfernt und der Chip rasch in den Waschpuffer I überführt. Der Chip durfte nicht austrocknen. Er wurde für 10 sec in 30 ml vorgewärmten Waschpuffer I bei 60 °C gewaschen, anschließend weitere 10 sec in Waschpuffer II bei 60 °C und schließlich für 10 sec in Waschpuffer III bei Raumtemperatur. Abschließend wurden jegliche Flüssigkeiten an der Chipoberfläche mittels Luftspray entfernt. ParoChip2 wurde aus dem Hybridisierungssofen direkt in den ersten Waschpuffer überführt und ca. 10 sec bei 60°C gewaschen, anschließend wiederum bei 60 °C für 20 sec in Waschpuffer II und schließlich für 10 sec bei Raumtemperatur in Waschpuffer III. Auch dieser Chip wurde anschließend mittels Luftspray völlig getrocknet.

Die Chips konnten jetzt direkt vom GenePix Scanner 4100A eingelesen werden oder bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert werden.

2.3.5 Auswertung

2.3.5.1 Material

2.3.5.1.1 Geräte und Software

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany

ParoReport Software

Axon Instruments, Union City, CA, USA

GenePix Software

GenePix Scanner 4100A

2.3.5.2 Methode

2.3.5.2.1 Scannen des Chips

Die Auswertung des ParoCheck®-Chips erfolgte mit Hilfe des GenePix Scanners 4100A (Axon Instruments) und der dazugehörigen Software (GenePix, 4.x). Zunächst wurde der Chip bei den Wellenlängen $\lambda = 532 \text{ nm}$ (grün) und $\lambda = 635 \text{ nm}$ (rot) gescannt. Es entstand für den ParoChip1 ein Bild wie in Abbildung 1 dargestellt und für den ParoChip2 ein Bild wie in Abbildung 2 dargestellt.

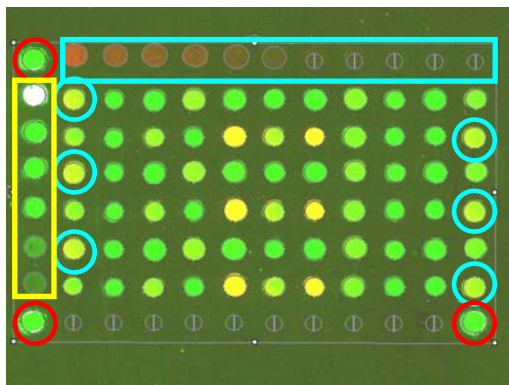


Abbildung 1: ParoChip1 (ältere Version)



Abbildung 2: ParoChip2 (aktuelle Version)

Beide Chips verfügen über drei interne Kontrollsysteme:

- 1.) eine Orientierungskontrolle (rot markiert)
- 2.) eine Hybridisierungskontrolle (gelb markiert)
- 3.) eine PCR-Kontrolle (türkis markiert)

Der gesamten Auswertung lag eine Bildanalyse zugrunde, bei der Pixelintensitäten gemessen wurden. Über die Bilder wurde ein Gitter (Maske, Grit) gelegt und angepasst, das jeden Punkt eindeutig identifizierte. Anhand dieses Gitters konnte der

jeweilige Chip nun analysiert werden und ein entsprechender ParoReport ausgedruckt werden

2.3.5.2.2 Analyse

Die GenePix Software analysierte die eingescannten Bilder auf Tastendruck. Den Ergebnissen lag eine typische Statistik einer Bildanalyse zugrunde. **Zur genauen Erklärung der Parameter der Analyse ist dieser Arbeit eine CD beigelegt.**

2.3.5.2.3 Der ParoReport

Für jeden Chip wurde ein ParoReport ausgedruckt, auf dem alle wichtigen Daten zusammengefasst sind. Das umfasste erstens die technischen Daten: Die eindeutige Identifizierung der Probe, der benutzte Scanner, Datum und Uhrzeit des Scannvorgangs, die Wellenlängen, bei denen gescannt wurde, die Spannung des Photomultipliers, die Stärke des Lasers, die Stärke des Scanners, die verwendete Software, die Temperatur, die benötigte Zeit des Lasers und falls vorhanden ein Barcode. Zweitens wurden qualitative Aussagen über die Kontrollsysteme in Form des mittleren SNR (Signal-To-Noise-Ratio) Wertes gemacht. Bei dem ParoReport von Chip1 waren auch die Orientierungskontrollen erwähnt sowie für jede Wellenlänge ein Bild enthalten. Drittens wurden die Ergebnisse der Bakterien aufgeführt. In dem ParoReport von Chip1 waren diese nur in Form einer positiv/negativ Aussage enthalten. In dem ParoReport von Chip2 wurde zusätzlich ein mittlerer SNR Wert für jedes positive Bakterium angeführt. Dabei wurden nur SNR Werte, die größer als 12 waren als positiv bewertet und in die Berechnung des mittleren SNR Wertes einbezogen. Ein Beispiel der ParoReports für jeden Chip ist im Anhang zu finden.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der in Kapitel 2 beschriebenen Versuche dargestellt.

3.1 Ergebnisse der PCR

Anhand der internen PCR-Kontrolle der Chips konnte die PCR für jeden Chip beurteilt werden. Eine Cy5 markierte Sonde hybridisierte an die dafür vorgesehenen Messpunkte.

3.1.1 ParoChip1

Der ParoChip1 verfügte über sechs Messpunkte (sog. Positivkontrollen) mit gleich bleibender DNA-Konzentration, die eine allgemeine Kontrolle der PCR gewährleistete. Zusätzlich ermöglichte eine Verdünnungsreihe, bestehend aus 11 Messpunkten, eine Qualitätsabschätzung der PCR. Die immobilisierte Catcher-Sonden-DNA (ein E.coli-16S rDNA gerichtetes Oligonukleotid) wurde dafür vom Hersteller vor Immobilisierung von Messpunkt zu Messpunkt um den Faktor zwei verdünnt. Das heißt: Es begann mit der reinen Sonden-DNA ohne Verdünnung ($2^0=1$ =unverdünnt) und endete nach zehn Verdünnungsschritten ($2^{10}=1024=1:1024$). Mit den Parodontitisleitkeimen wird über den PCR-Premix auch immer eine interne E.coli-DNA mitamplifiziert. Bei allen zehn Proben waren fünf bis sieben Verdünnungsstufen positiv, d.h. der SNR Wert war hier noch größer als zwei. Die E.coli gerichtete PCR (und damit jegliche 16S rDNA gerichtete PCR) war also in allen Fällen prinzipiell erfolgreich. Die Ergebnisse der Verdünnungsreihen sind in Abbildung 3 aufgezeigt. Die höchste Ver-

dünnung, die als positiv gewertet wurde, lag bei $2^7 = 128$, also bei siebenfacher Verdünnung.

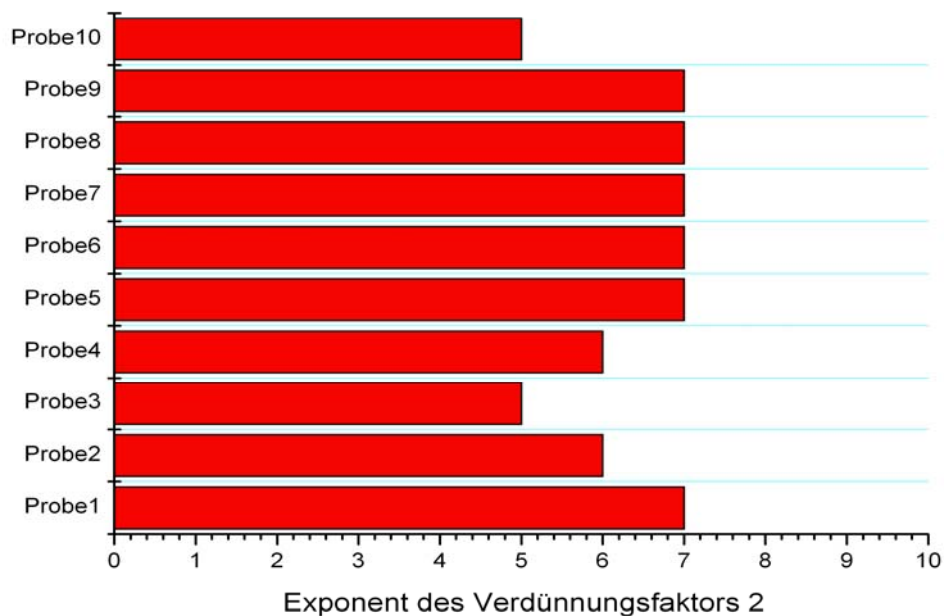


Abbildung 3: Ergebnisse PCR, ParoChip1

Probe 1, sowie Proben 5-9 zeigten bis zur siebten Verdünnungsstufe ein positives Ergebnis, Probe 2 und Probe 4 bis zur sechsten und Probe 3 und Probe 10 bis zur fünften Verdünnungsstufe.

3.1.2 ParoChip2

Der ParoChip2 verfügt über fünf DNA Messpunkte zur Kontrolle der PCR. Auf eine Verdünnungsreihe wurde hier verzichtet. In dem dazugehörigen ParoReport wurde jedoch ein mittlerer SNR-Wert für die Messpunkte angegeben, so dass durch Beurteilung der Signalstärke eine Qualitätsabschätzung möglich war. Der Grenzwert für die Positiv-Kontrollen lag bei $\text{SNR-635} > 12$. Mit einer Ausnahme (Probe 3, sie wies

null von fünf Positivkontrollen auf) lagen bei alle Proben jeweils die fünf Messpunkte der PCR-Kontrollen oberhalb dieses Grenzwertes. Die SNR-Werte sind in Abbildung 4 zusammengefasst.

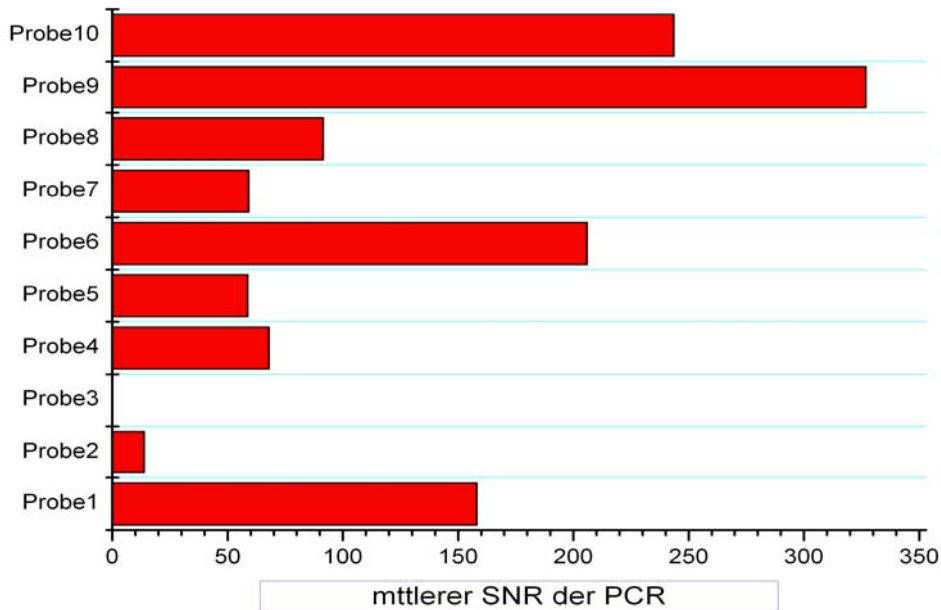


Abbildung 4: Ergebnisse PCR, ParoChip2

Die SNR-Werte lagen zwischen 13,8 und 326,9. Es lag ein durchschnittlicher SNR-Wert von 136,2 für die PCR-Kontrolle vor.

3.2 Ergebnisse der Hybridisierung

Anhand der internen Hybridisierungs-Kontrolle der Chips konnte die Hybridisierung für jeden Chip beurteilt werden. Sie bestand aus zwei Kontrollsystemen:

1. Printkontrolle
2. Hybridisierungskontrolle.

Eine im Mastermix enthaltene Cy3 markierte (wiederum E.coli-gerichtete) Sonde hybridisierte mit jedem (!!!!) Messpunkt auf dem Chip, da in jedem Punkt eine korrespondierende Catchersonde zu einem geringen Anteil neben den spezifischen Sonden und in genau gleicher Qualität parallel immobilisiert ist. Das ermöglichte eine Beurteilung der Homogenität der auf dem Chip verankerten Sonden, indem diese bei $\lambda = 532$ nm sichtbar gemacht wurden. Gleichzeitig hybridisierte diese Sonde an eine komplementäre DNA-Probe. Die Signalstärke der Messpunkte erlaubte eine Qualitätsabschätzung.

3.2.1 ParoChip1

Zur Kontrolle und Qualitätsabschätzung der Hybridisierung wurde eine der Cy3 markierten Hybridisierungskontrollen entsprechend komplementäre Catchersonde in sechs verschiedenen Verdünnungen aufgetragen. Wie bei der PCR-Kontrolle war der Verdünnungsfaktor zwei. Es wurde mit der unverdünnten Catcher-DNA begonnen ($2^0=1$ =unverdünnt) und mit fünffacher Verdünnung geendet ($2^5=32$ =Verdünnung 1:32). Die Probe wurde bei einem SNR Wert größer als zwei positiv gewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

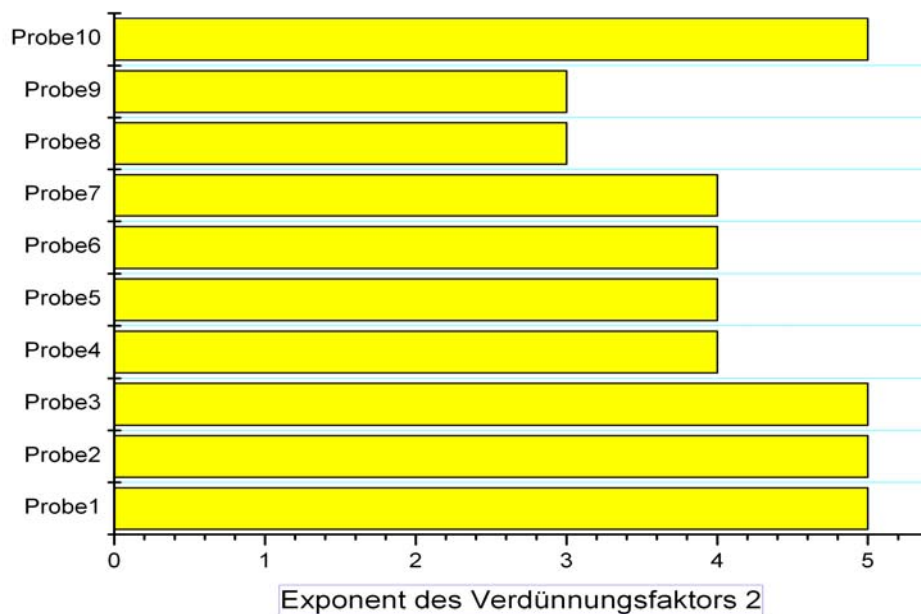


Abbildung 5: Ergebnisse der Hybridisierung, ParoChip1

Probe 1-3 und Probe 10 zeigten bis zur fünften Verdünnungsstufe (1:32) ein positives Ergebnis, Probe 4-7 bis zur vierten Verdünnungsstufe und Probe 8 und Probe 9 bis zur dritten Verdünnungsstufe ein eindeutiges Signal.

3.2.2 ParoChip2

Der ParoChip2 weist fünf Messpunkte zur Kontrolle und Qualitätsabschätzung der Hybridisierung auf. Auch hier wurde auf eine Verdünnungsreihe verzichtet und stattdessen auf dem zugehörigen ParoReport ein mittlerer SNR Wert angegeben. Der Grenzwert lag hier bei $\text{SNR-532} > 25$. Bei allen zehn Proben waren fünf von fünf Messpunkte nach diesem Wert positiv. Die SNR-Werte sind in Abbildung 6 zusammengefasst.

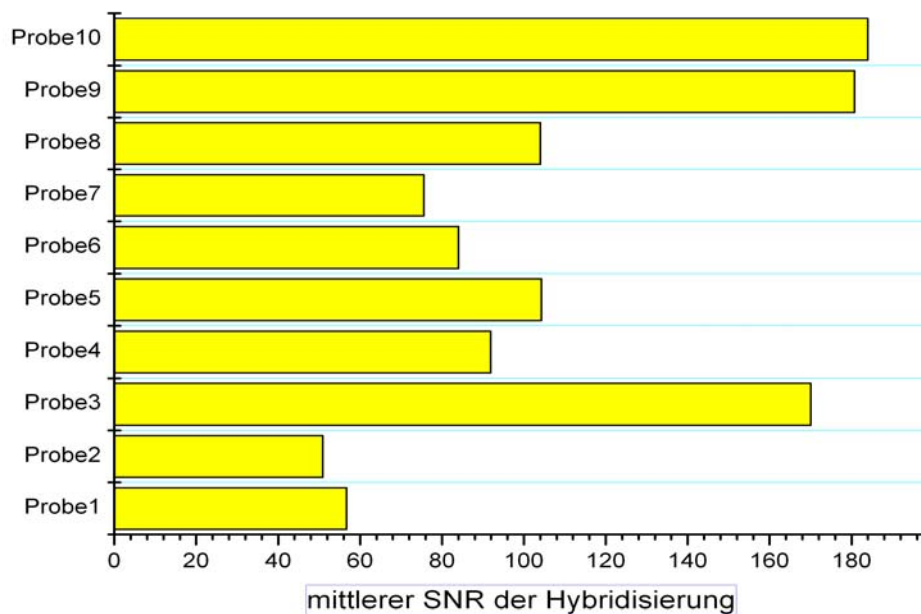


Abbildung 6: Ergebnisse der Hybridisierung, ParoChip2

Die SNR-Werte lagen zwischen 50,9 und 184. Es ergab sich ein durchschnittlicher SNR-Wert von 110,21 für die Hybridisierungs-Kontrolle.

3.3 Ergebnisse der Bakterienanalyse

Die Ergebnisse der Bakterien jeder Probe konnten im ParoReport unmittelbar abgelesen werden. In dem ParoReport von Chip1 geschah dies in Form einer positiv/negativ Aussage, in dem von Chip2 war zusätzlich bei den positiv gewerteten Bakterien ein mittlerer SNR Wert angegeben. Der Grenzwert wurde für $SNR > 12$ festgelegt.

Die Ergebnisse der in den Proben vorhandenen Bakterien sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

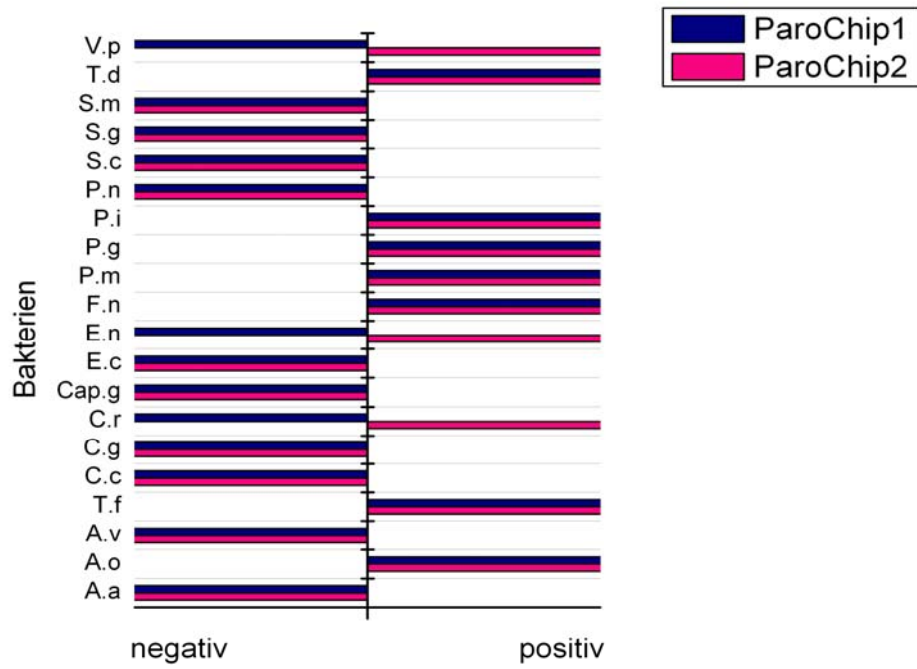


Abbildung 7: Bakterienergebnisse Probe1

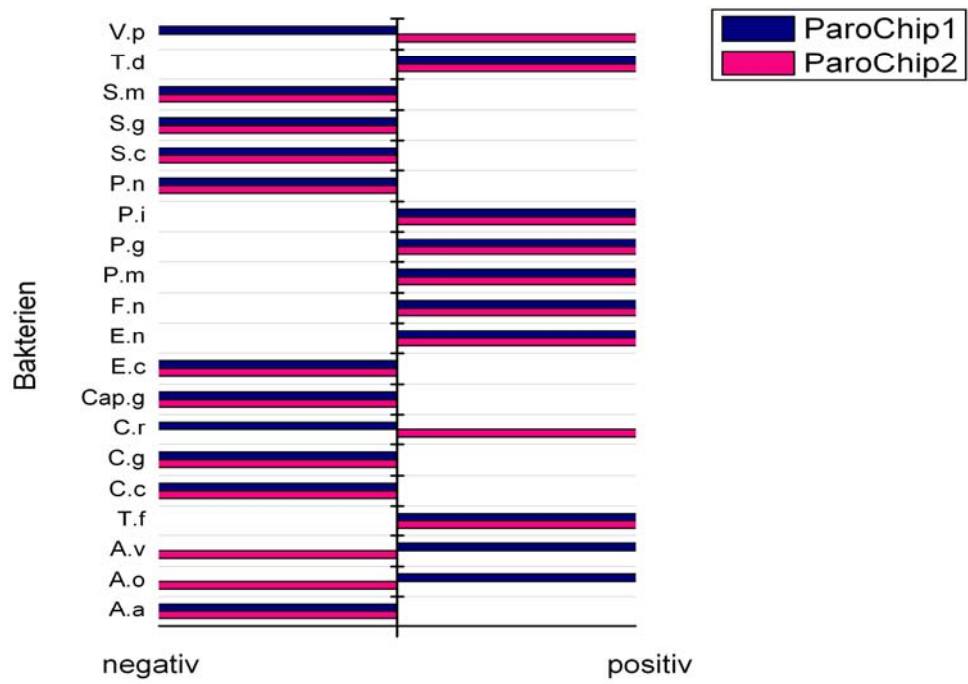


Abbildung 8: Bakterienergebnisse Probe2

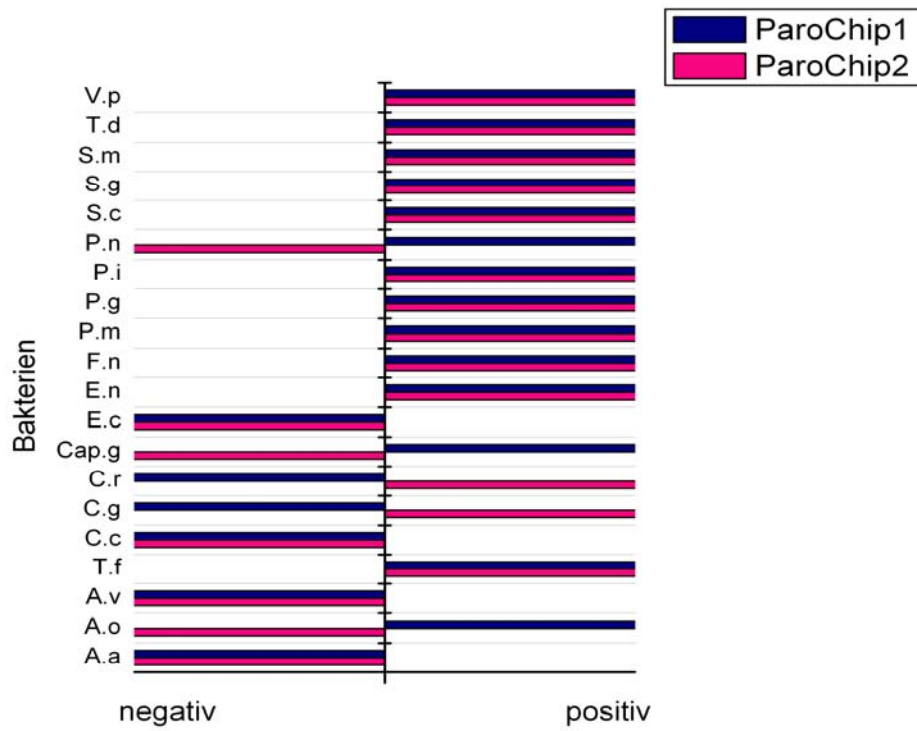


Abbildung 9: Bakterienergebnisse Probe3

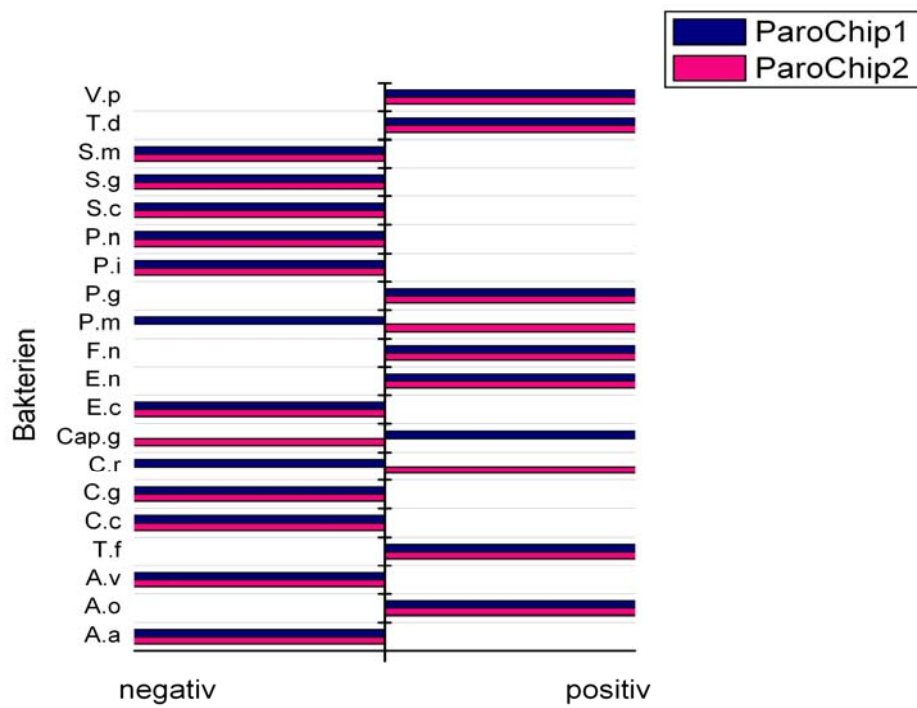


Abbildung 10: Bakterienergebnisse Probe4

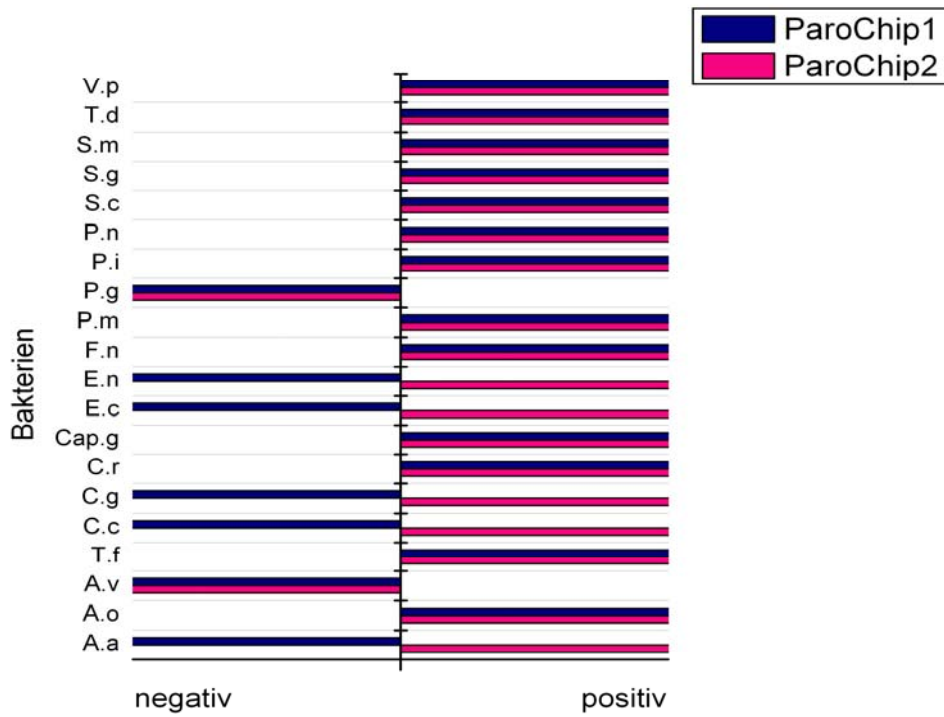


Abbildung 11: Bakterienergebnisse Probe5

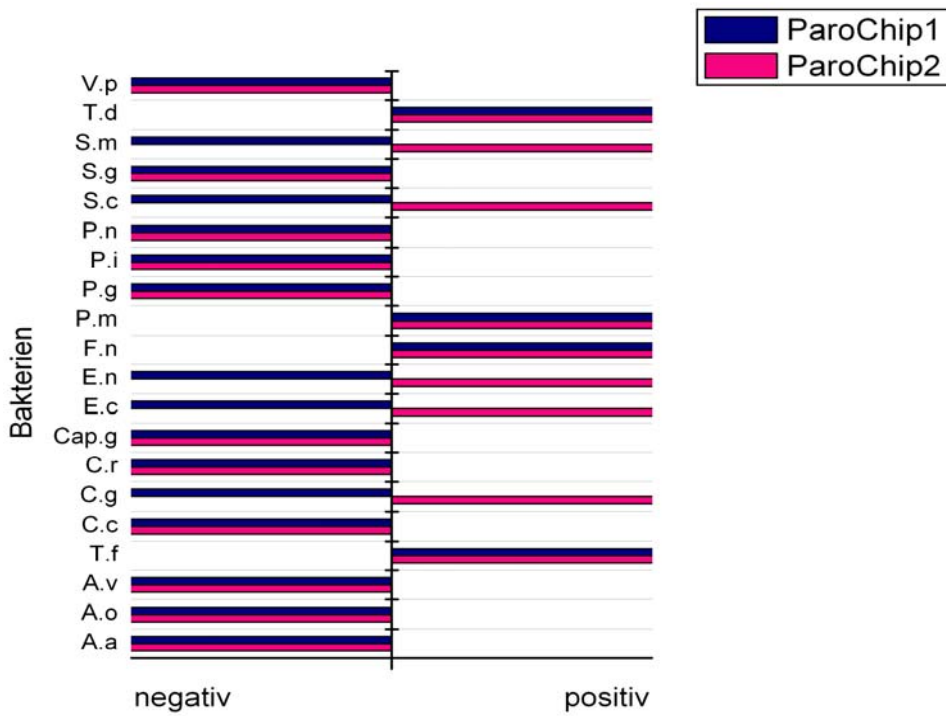


Abbildung 12: Bakterienergebnisse Probe6

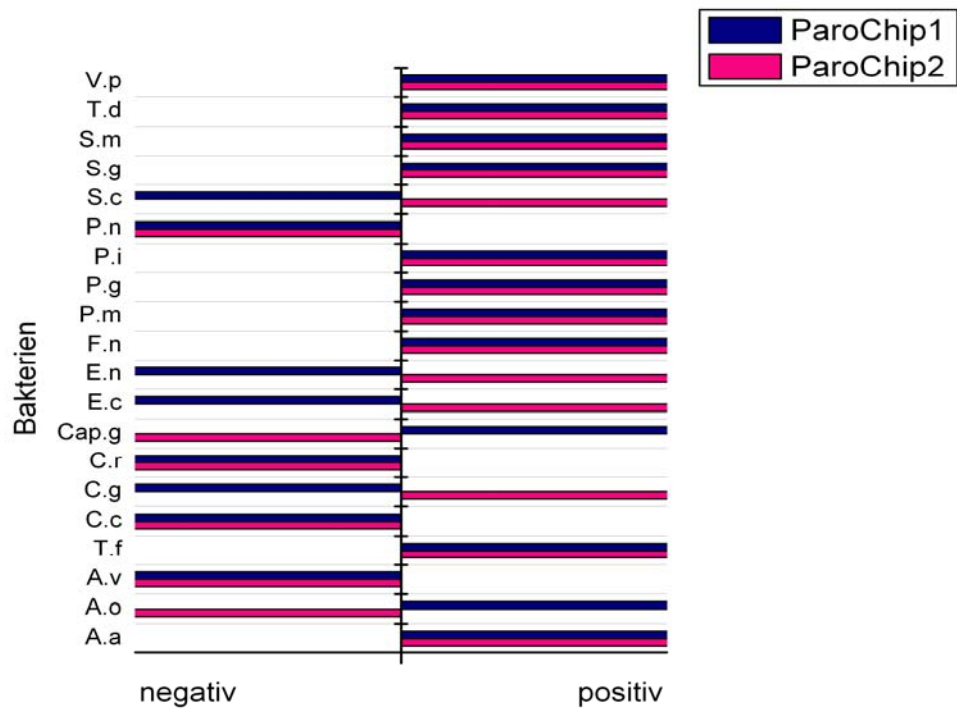


Abbildung 13: Bakterienergebnisse Probe7

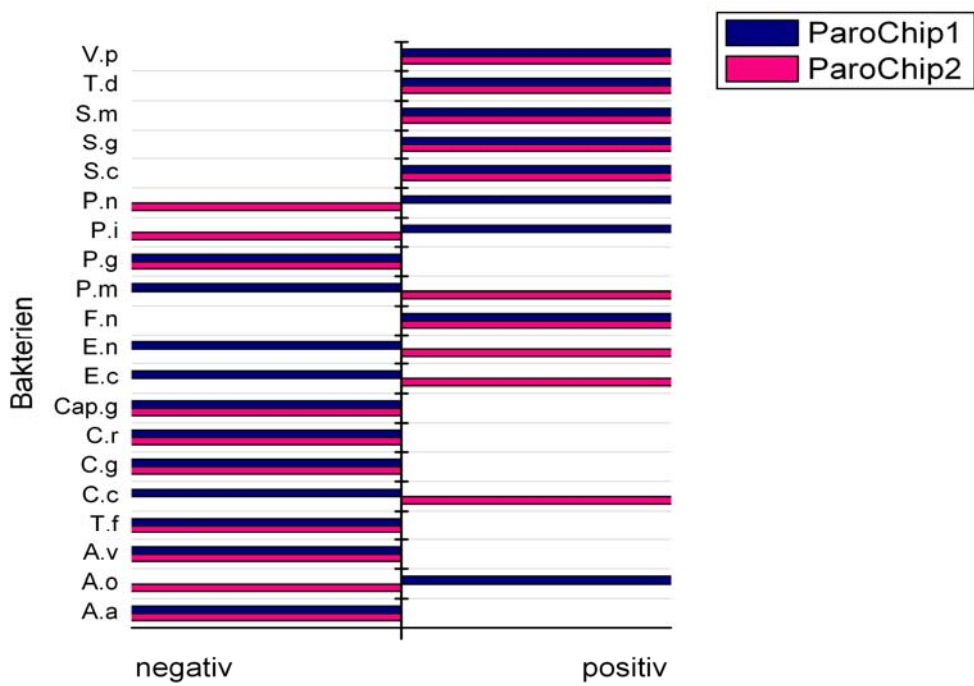


Abbildung 14: Bakterienergebnisse Probe8

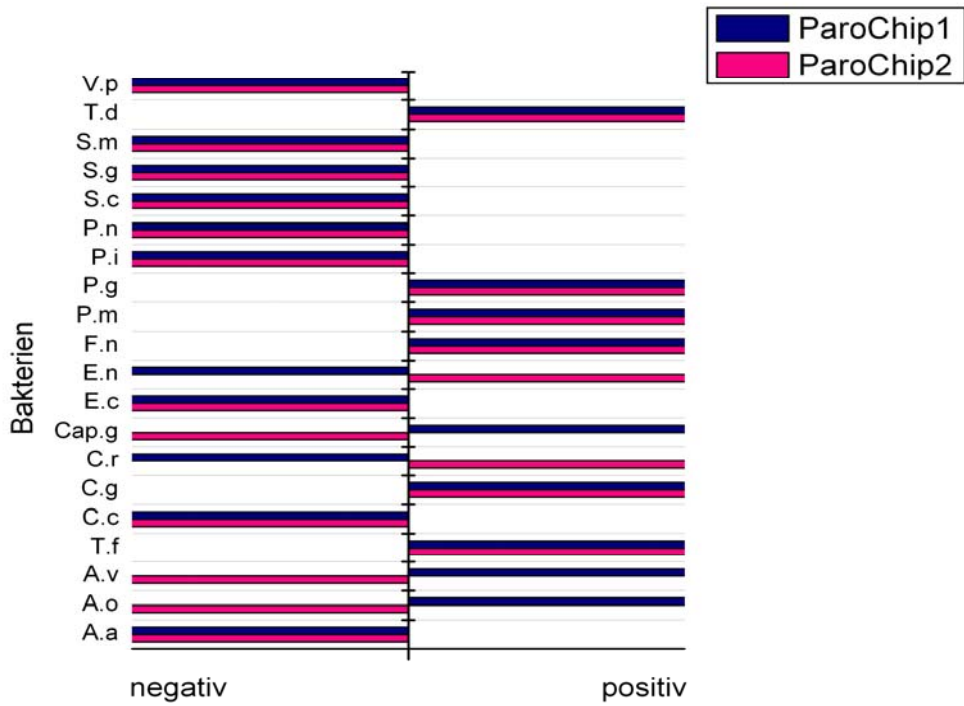


Abbildung 15: Bakterienergebnisse Probe9

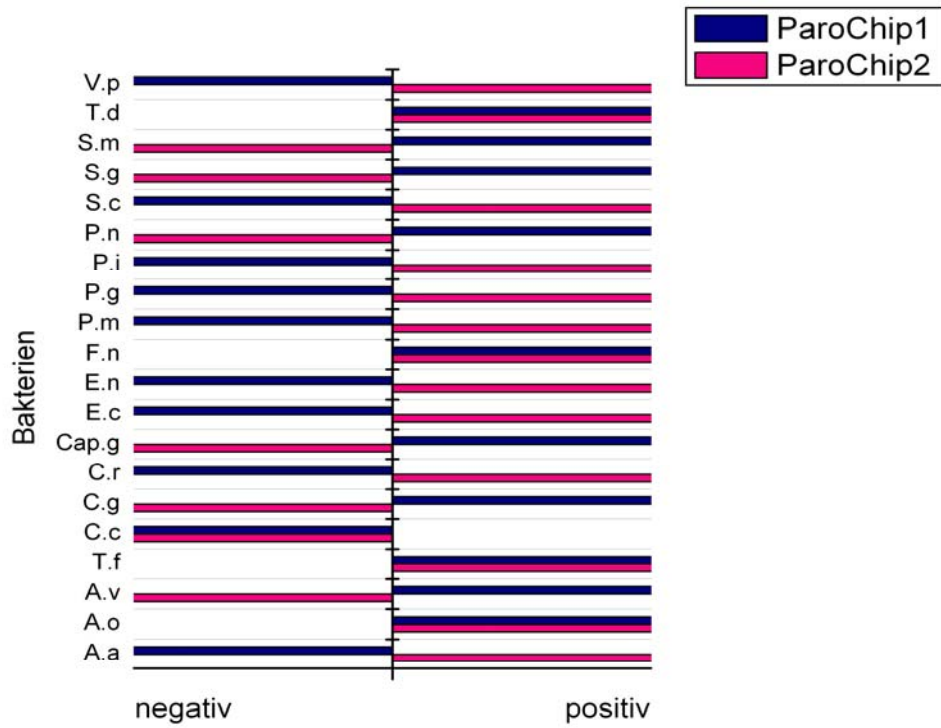


Abbildung 16: Bakterienergebnisse Probe10

Wie viele Übereinstimmungen es zwischen den Chips pro Probe gab, ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

<i>Übereinstimmungen zwischen den Chips</i>	
Probe 1	85%
Probe 2	80%
Probe 3	75%
Probe 4	85%
Probe 5	75%
Probe 6	75%
Probe 7	70%
Probe 8	65%
Probe 9	75%
Probe 10	25%

Tabelle 6: Übereinstimmungen zwischen den Chips in %

Das beste (85%) und das schlechteste (25%) Ergebnis außen vor gelassen, ergab sich eine durchschnittliche Übereinstimmung zwischen den Chips von 75 %.

In Abbildung 17 ist dargestellt wie häufig die Bakterien insgesamt in den 10 Proben von den beiden Chips detektiert wurden.

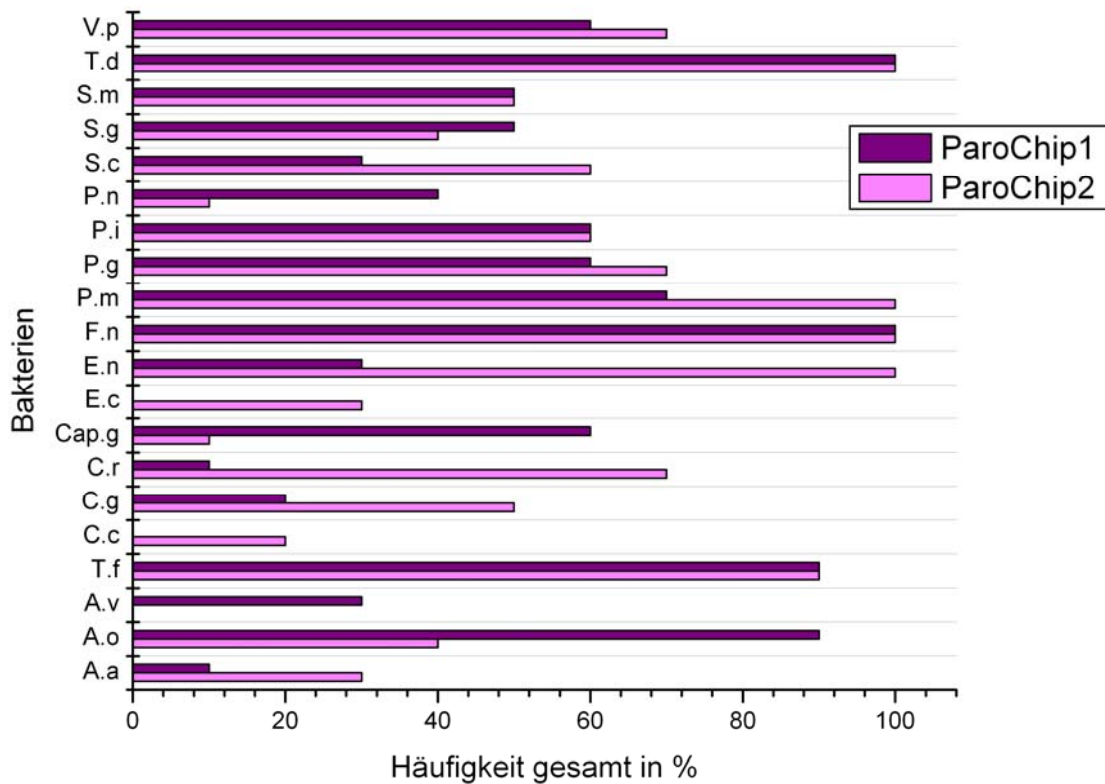


Abbildung 17: Detektierte Häufigkeit der Bakterien insgesamt

Nur fünf Keime wurden von beiden Chips gleich häufig detektiert: *T.d.*, *S.m.*, *P.i.*, *F.n.* und *T.f.*. *V.P.*, *S.c.*, *P.g.*, *P.m.*, *E.n.*, *E.c.*, *C.r.*, *C.g.*, *C.c.* und *A.a.* wurden von der weiterentwickelten Fassung, dem ParoChip2 häufiger detektiert als von ParoChip1. Wohingegen *S.g.*, *P.n.*, *Cap.g.*, *A.v.* und *A.o.* sogar seltener von ParoChip2 als positiv gewertet wurde als von ParoChip1.

4 Diskussion

Zu Beginn dieser Diskussion sollen die wesentlichen Ergebnisse noch einmal in Kurzform aufgeführt werden.

- Die PCR-Kontrollen waren bei beiden Chip-Formaten (dem älteren ParoChip1 und dem neueren ParoChip2) bis auf Probe 3 im ParoChip2 stets positiv. Qualitativ zeigte sie beim ParoChip1 von der fünften (2^5) bis zur siebten (2^7) Verdünnungsstufe (bei einem Maximum von $1:2^{10}=1:1024$) ein positives Ergebnis. Beim ParoChip2 lag der SNR (Signal-To-Noise)-Wert zwischen 13,8 und 326,9 (bei einem Grenzwert von 12), durchschnittlich lag er bei einem SNR von 136,2.
- Die Hybridisierungs-Kontrollen und Printkontrollen waren bei allen zehn Proben für beide Chips positiv. Beim ParoChip1 lagen positive Ergebnisse von der dritten bis zur fünften Verdünnungsstufe (bei einem Maximum von $1:2^5$) vor. Die SNR-Werte beim ParoChip2 lagen zwischen 50,9 und 184 (Grenzwert 25), der Durchschnittswert lag bei einem SNR von 110,2.
- Die Ergebnisse der Bakterienanalyse stimmten beim Vergleich der Chips für keine Probe zu 100% überein. Es ergab sich vielmehr eine durchschnittliche Übereinstimmung von 75%. Lediglich drei Keime (*F.n.*, *Tf.*, *T.d.*) wurden auf beiden Chips für alle Proben identisch detektiert.
- Insgesamt wurden fünf Keime auf beiden Chips gleich oft detektiert: *T.d.*, *S.m.*, *P.i.*, *F.n.*, 10 Keime wurden von ParoChip2 häufiger erkannt: *V.P.*, *S.c.*, *P.g.*, *P.m.*, *E.n.*, *E.c.*, *C.r.*, *C.g.*, *C.c.* und *A.a.*, und fünf Keime wurden von ParoChip1 öfter detektiert: *S.g.*, *P.n.*, *Cap.g.*, *A.v.* und *A.o.*

Die folgende Diskussion ist aufgrund einiger Fakten sicherlich erschwert:

1. Es gibt bis jetzt nur eine unabhängige und international veröffentlichte Studie über den ParoCheck®-Chip (Vianna et al. 2005). Weitere unabhängige Erfahrungen sind bis dato nicht dokumentiert
2. Es liegen weiterhin keine experimentell ermittelten und veröffentlichten Daten über Sensitivität und Spezifität des Verfahrens vor.
3. Es liegt kein direkter Vergleich der Ergebnisse dieser Versuchsreihe mit einem anderen Nachweisverfahren vor

4.1 Eignung des ParoCheck®

ParoCheck® ist der erste kommerziell erhältliche Genchip zur Diagnose von Parodontitiden. Der ParoChip2 stellt gegenüber dem ParoChip1 eine Weiterentwicklung und Verbesserung dar. In der Diskussion über die Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Chips müssen einige Faktoren geklärt werden:

- Wo liegen mögliche Fehlerquellen in der Methodik und wie können diese vermieden bzw. minimiert werden?
- Warum stimmen die Ergebnisse der Bakterien beider Chips für identische Proben nur in durchschnittlich 75% überein?
- Welcher der beiden Chips ist für die Analyse geeigneter?
- Ist die Methode als Standardmethode zur Diagnose von Parodontitiden bzw. zumindest zum qualitativen/ quantitativen Nachweis der assoziierten Keime geeignet?

4.1.1 Fehlerquellen

Bei der Arbeit in einem mikrobiologischen Labor ist immer absolute Präzision und Umsicht mit dem Umgang der Materialien erforderlich. Dafür sind das notwendige Verständnis und ein Basiswissen in der Mikrobiologie Voraussetzung. Fehler können zu jedem Zeitpunkt der Versuchsreihe durch Unachtsamkeiten entstehen. Deshalb ist Konzentration stets gefordert. Das beginnt bei der Probeentnahme am Patienten. So konnte in dem hier rekrutierten Patientenpotential eine Blutung bei der supragingivalen Reinigung zwar vermieden werden, bei Entnahme der Probe mittels Papierspitze kam es jedoch in einigen Fällen zum BOP („bleeding on probing“). Es konnte trotzdem offensichtlich in allen Fällen genügend Nukleinsäure für die Analyse aus den Papierspitzen isoliert werden. Es wurden Papierspitzen ISO 45 benutzt, die statistisch eine optimale Effektivität bei der Probeentnahme gewährleisten (Hartroth et al. 1999). Signifikante Fehlerquellen können hier also ausgeschlossen werden, ebenso wie bei dem Probentransport. Nach eindeutiger Kennzeichnung der Probengefäße wurden diese direkt ins Labor gebracht, bei -4C° über Nacht gelagert und am nächsten Tag bearbeitet. Auch das Qiagen QIAamp DNA Mini Kit ist ein hoch sensitives und vielfach bewährtes System zur DNA-Isolierung (Coyne et al. 2004, Knepp et al. 2003, Aldous et al. 2005), das beste Voraussetzungen für nachfolgende PCR und Hybridisierung schafft.

Die PCR ist ein sehr sensibles Verfahren, deren Qualität durch Faktoren wie die relative Konzentration der Primer, die Konzentration des PCR Puffers, das Verhältnis zwischen Magnesiumchlorid und der Deoxynukleotid-Konzentration, die Temperatur während der Amplifizierung sowie durch die Menge von der Taq Polymerase entscheidend beeinflusst wird (Markoulatos et al. 2002, Henegariu et al. 1997, Harris & Jones 1997). Es ist davon auszugehen, dass all diese Faktoren von der Greiner bio-one GmbH und der Lambda GmbH ausgiebig recherchiert wurden und eine Optimierung dieser im PCR-Mastermix sowie in der Anleitung zum Gebrauch des Chips umgesetzt worden ist. Ein weiteres Problem stellt die Kontamination der Taq Polymerase mit fremder, speziell auch bakterieller, DNA dar (Böttger 1990, Rand & Houck

1990, Schmidt et al. 1991). Es kann so zu falsch positiven Aussagen kommen (Rys & Persing 1993). Zur Vermeidung einer Kontamination der Taq-Polymerase ist eine absolute Sorgfalt und Umsicht im Umgang mit dieser notwendig sowie relativ steriles Arbeiten unerlässlich (Kwok & Higuchi 1989). Zur Elimination der fremden DNA kann die Taq-Polymerase vor Verwendung mit 8-Methoxypsoralen in Kombination mit langwelligen UV-Strahlen behandelt werden. Um sie dabei nicht in Ihrer Funktion einzuschränken, wird eine 8-Methoxypsoralen-Konzentration von 25-50 µg/ml und eine UV-Bestrahlung von drei bis vier Minuten empfohlen (Meier et al. 1992, Hughes et al. 1994). Dies ist in unserer Versuchsreihe nicht geschehen, was zu einer kritischen Betrachtung der Ergebnisse der Bakterienanalyse führt.

Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass bei der PCR mit Universalprimern häufig bestimmte Bakterienarten bevorzugt und andere diskriminiert werden, so dass ursprüngliche Prozentzahlen nach Amplifikation nicht mehr gegeben sind (Nadkarni et al. 2002, Suzuki et al. 1996, Conrads 2003).

Die Positiv-Kontrollen der PCR fielen in unseren Versuchen bis auf eine Ausnahme positiv aus. Die qualitative Aussage über die PCR, die bei dem ParoChip1 an einer Verdünnungsreihe abgelesen werden konnte, ist im Prinzip irrelevant und dient nur dem Troubleshooting. Deshalb wird im ParoChip2 darauf verzichtet und nur ein mittlerer SNR-Wert für die Positiv-Kontrollen angegeben. Wichtig ist, dass die PCR überhaupt stattgefunden hat, so dass bakterielle DNA detektiert und als positiv gewertet werden kann. Ist nur ein schwaches PCR-Signal zu beobachten (früher Abbruch in der Verdünnungsreihe bzw. schwacher SNR-Wert) oder ist die Positiv-Kontrolle der PCR sogar negativ (ParoChip2, Probe drei), liegt das an PCR-Inhibitoren (z.B. Komplexbildner für Mg, Ionen, Albumin) oder aber, wie in den mit Abstand allermeisten Fällen, an sehr viel „echter“ Template-DNA aus der Probe, so dass die Kontroll (E.coli)-DNA stark ausverdünnt wurde. Ist sehr viel an Bakterienmaterial in einer Probe enthalten, kommt es in der PCR-Reaktion damit zu Konkurrenz zwischen den Bakterien und der Positiv-Kontrolle, da sie mit den gleichen Primern arbeiten. Es genügt also, wenn entweder die Positiv-Kontrolle oder das höchste (Parodontitis-) Bakterien-signal über dem Schwellenwert liegen. Wenn also Bakterien positiv sind, ist

es nahe liegend, dass die PCR funktioniert hat, selbst wenn die verdünnten Positiv-Kontrollen negativ sind.

Auch bei der Hybridisierung muss auf einige Dinge geachtet werden:

- Bei der Denaturierung müssen Temperatur (95°C) und Zeit (3 min) genau beachtet werden,
- die richtige Mischung der Waschpuffer ist essentiell,
- beim Aufbringen der Hybridisierungslösung sollten Luftblasen unbedingt vermieden werden
- es ist auf eine konstante Temperatur in der Hybridisierungskammer zu achten,
- ein Austrocknen des Chips ist unbedingt zu vermeiden
- die Temperatur der Waschpuffer sollte genau beachtet werden.

Durch sorgfältige Berücksichtigung dieser Punkte werden beste Voraussetzungen für die Hybridisierung geschaffen.

In unserer Versuchsreihe waren alle Hybridisierungs-Kontrollen positiv. Die Ursachen für schwächere Signale sind hier in der Missachtung der oben aufgeführten Punkte zu suchen. Auch die zu häufige Nutzung der Waschpuffer könnte ein Grund sein. Außerdem kann es bei der Hybridisierung theoretisch zu Kreuzreaktivitäten einiger Sonden mit Spezies, die in enger Verwandtschaft zum Zielorganismus stehen, kommen. Mit ca. einem Prozent ist diese Reaktion im Allgemeinen jedoch von geringer klinischer Relevanz.

Unsere Ergebnisse der PCR und der Hybridisierung waren zufrieden stellend, während die Ergebnisse der Bakteriendetektion kritisch hinterfragt werden müssen.

4.1.2 Gegenüberstellung der beiden Chips

Es bleibt die Frage zu klären, warum die Ergebnisse für die Parodontitis-Leitkeime bei den Chips für identische Proben nur in durchschnittlich 75% der Fälle übereinstimmen. Nur fünf Keime wurden von beiden Chips gleich häufig detektiert: *Treponema*

denticola., *Streptococcus mitis*, *Prevotella intermedia.*, *Fusobacterium nucleatum* und *Tannerella forsythensis*. *Veillonella parvula*, *Streptococcus constellatus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium nudatum*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter concisus* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* wurden von ParoChip2 häufiger detektiert als von ParoChip1. Wohingegen *Streptococcus gordonii*, *Prevotella nigrescens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Actinomyces viscosus* und *Actinomyces odontolyticus* seltener von ParoChip2 als positiv gewertet wurden als von ParoChip1.

Die beiden Chips sind nicht ohne weiteres zu vergleichen. So ist zu berücksichtigen, dass der ParoChip1 ein Glasobjektträger ist, während der ParoChip2 aus Kunststoff besteht. Die Oberflächenchemie ist eine völlig andere. Infolge dessen wurden für den ParoChip2 teilweise u.U. andere Oligonukleotidsequenzen und mit Bestimmtheit in anderen Mengen verwendet. Außerdem wurden die Schwellenwerte des SNR eines positiv gewerteten Bakteriums beider Chips seitens des Herstellers (Greiner-bio-one GmbH, Lambda GmbH) ungefähr aneinander angepasst, um einen späteren Vergleich zu ermöglichen. Kleine Differenzen sind jedoch nicht auszuschließen, so dass es bei Bakteriensignalen im Schwellenwert-Bereich durchaus zu qualitativ sehr unterschiedlichen Ergebnissen (mal +, mal -) trotz quantitativ ähnlicher Photonenzahlen kommen konnte.

Grundsätzlich stellt der ParoChip2 gegenüber dem ParoChip1 eine deutliche Verbesserung und Weiterentwicklung dar. Diese sollen an folgenden Vorteilen des ParoChip2 verdeutlicht werden:

- Allein aufgrund des Materials weist der Chip eine viel höhere Robustheit und Haltbarkeit auf.
- Der Chip kann zwölf Patientenproben aufnehmen, was sowohl eine Arbeitserleichterung darstellt, als auch die Kosten senkt.
- Durch die integrierten Vertiefungen, in denen die Sonden fixiert sind, fällt das mühselige Platzieren der Deckgläschen auf die aufgebrauchte Hybridisierungs-

lösung weg. So werden Luftblasen besser vermieden und ein Austrocknen ist praktisch unmöglich. Einige Fehlerquellen wurden damit effizient eliminiert.

- Die SNR-Grenzwerte für PCR- und Hybridisierungs-Kontrollen sind höher. Dies bedeutet eine allgemeine Qualitätssteigerung.
- Pro Bakterium sind fünf, statt drei Messpunkte vorhanden. Auch das stellt eine Qualitätssteigerung dar.
- Der ParoReport2 ist für den behandelnden Zahnarzt einfacher zu interpretieren. Anstatt unwichtiger Verdünnungsreihen ist ein semiquantitativer Nachweis der Bakterien anschaulich integriert.

Neben den Vorteilen des ParoChips2 gegenüber dem ParoChip1 ist als Nachteil die erschwerte Interpretation der Bildanalyse zu nennen. Es besteht außerdem die Gefahr, die Proben auf dem Chip bei der Auswertung zu verwechseln.

Unter Berücksichtigung all dieser Fakten ist eine Übereinstimmung von durchschnittlich 75% kein schlechtes Ergebnis. Aufgrund der genannten Vorteile des ParoChips2 ist diesem jedoch mehr Glaubwürdigkeit zu schenken.

4.1.3 Der ParoCheck®- Chip zur Routinediagnostik?

Der ParoChip2 stellt durchaus eine Methode dar, die zukünftig in der Routinediagnostik genutzt werden kann. Zur Optimierung der Ergebnisse sollte allerdings überlegt werden, ob für die vorgeschaltete PCR besser eine vorbehandelte Taq-Polymerase verwendet wird. Natürlich müssen hier Kosten und Nutzen abgewogen werden. Zur Etablierung der Methode sind weitere Versuche und unmittelbare Vergleiche mit anderen Nachweismethoden jedoch unerlässlich. Nur so können Sensitivität und Spezifität der Methode ermittelt werden.

Eine Spezifitäts Prüfung wurde seitens der Firma Lambda GmbH zur Evaluierung der Spezifität des ParoCheck® Kit 20 durchgeführt. Dafür wurde jedes der 20 Bakterien in einer komplexen Mischung, in der üblicherweise auch andere Bakterien enthalten

waren, nachgewiesen, ohne dass eines der Bakterien ein falsches Signal für eines der anderen Bakterien hervorrief. Die Spezifität betrug 100%.

Ein entscheidender Vorteil der Methode ist der Zeitfaktor. Die Ergebnisse liegen bereits nach zwei Tagen vor. Außerdem ist erstmals die Detektion von 20 verschiedenen Bakterien gleichzeitig möglich.

Der aktuelle Entwicklungsstand der ParoCheck®-Methode scheint vielversprechend und lässt eine Etablierung des Analyseverfahrens in der Routinediagnostik sinnvoll erscheinen.

4.2 ParoCheck® im Vergleich mit anderen Verfahren

Da nur ein einziger unmittelbarer Vergleich der Ergebnisse des ParoCheck®-Chips mit ein oder mehreren Alternativmethoden vorliegt (Vianna et al. 2005), wird die folgende Diskussion auf weitgehend vergleichbare Studien eingehen.

In zahlreichen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass die Hauptursache für chronische und aggressive Parodontitiden in der subgingivalen Mikroflora liegt, wobei das größte Pathogenitätspotential gram-negative Anaerobier besitzen (Dzink et al 1985, Slots 1986, Newman 1990, Lovegrove 2004). Parodontale Zahnfleischtaschen sind durch eine enorme Vielfalt von Bakterien gekennzeichnet. Über 300 Spezies konnten bereits von verschiedenen Mikrobiologen isoliert werden (Sanz et al. 2004). Es werden jedoch nur ein paar wenige Spezies mit parodontalen Erkrankungen assoziiert und als parodontale Pathogene identifiziert (Genco 1996). Schon 1970 beschrieb Socransky den Zusammenhang von Bakterien und der Ätiologie der Parodontitis. Dabei sollten vor allem fünf Pathogene genannt werden: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Treponema denticola* (Moore & Moore 1994, Griffen et al. 1998, Slots & Ting 1999, Socransky et al. 1999, Holt et al. 1999, Tran et al. 2001, Socransky et

al. 2002, Buchmann et al. 2004). In ca. 95% der Fälle ist einer dieser Leitkeime an einer Parodontitis beteiligt (Conrads 2003).

Mikrobielle Diagnoseverfahren werden eingesetzt, wenn klinische Befunde (PA-Status, BOP, Röntgen) nicht mehr ausreichen. Diese beschreiben den Ist-Zustand, während eine bakterielle Untersuchung eine Aktivitäts- und Risikoabschätzung des Attachmentverlustes zulässt (Prognose). Im Folgenden sollen Vor- und Nachteile der ParoCheck® Methode gegenüber bisherigen Nachweismethoden erörtert werden.

4.2.1 ParoCheck® vs. Kultur

Das Anzüchten von Bakterien ist in der mikrobiellen Diagnostik von Parodontalerkrankungen weit verbreitet und gilt nach wie vor als Referenz (Goldstandard) für neue Methoden, die sich etablieren wollen. Ihr Hauptvorteil ist, dass dies die einzige Methode ist, anhand derer neue Spezies charakterisiert werden können ebenso wie die Möglichkeit, antibiotische Empfindlichkeiten für gewachsene Bakterien abschätzen zu können (Socransky et al. 1987, Greenstein 1988, Lamster et al. 1993). Die Methode hat jedoch ihre Grenzen. Es können nur vitale, vermehrungsfähige Bakterien angezüchtet werden. Deshalb sind strengste Probenentnahme- und Transportbedingungen unerlässlich. Hierbei sterben oft obligat anaerobe Bakterien bei Erhöhung des Redoxpotentials ab, so dass sie der kulturellen Anzucht entzogen sind. Einige der Pathogene, wie *Treponema* spp. und *T. forsythensis* sind sehr anspruchsvoll und lassen sich nur sehr schwer bis gar nicht anzüchten (Sakamoto et al. 2002). Außerdem ist das Verfahren sehr zeitaufwendig. Ein Ergebnis, einschließlich der biochemischen Differenzierung und Resistenzbestimmung liegt meistens erst nach 14 Tagen vor. Eine spezielle Laborausrüstung sowie geschultes Personal sind notwendig und rechtfertigen den recht hohen Preis der Methode. In diesem Punkt stellt der ParoCheck® keinen Vorteil dar. Die Laborausrüstung (einschließlich eines ca. 40.000 €-teuren Genescanners) und Fachpersonal sind auch hier notwendig. Ein Ergebnis liegt jedoch schon nach ein bis zwei Tagen vor. Die Bakterien müssen nicht

vital sein und auch schwer bzw. nicht anzüchtbare Spezies wie *Treponema* spp und *T. forsythensis* lassen sich mit dieser Methode hervorragend nachweisen. Vianna et al. hat den ParoCheck® mit einer Kultur direkt verglichen und ist zu dem Ergebnis gekommen, dass anaerobe und anspruchsvolle Keime von dem Chip zuverlässiger detektiert wurden als von der Kultur. Außerdem war die Nachweisgrenze der Kultur im Vergleich zum DNA-Chip ziemlich hoch. Sie lag bei der Kultur bei 10^3 - 10^4 Zellen (Sanz et al. 2004), während die Nachweisgrenze einer PCR basierten Chip-Technologie bei 100-500 Zellen liegt (Vianna et al. 2005). Trotzdem ist der Chip nicht in der Lage ein Antibiogramm herzustellen, um zu testen, gegen welche Antibiotika bestimmte Keime sensibel oder, was immer mehr an Bedeutung gewinnt, resistent sind. Die Kultur kann den ParoCheck® hervorragend ergänzen und zur Etablierung der Methode beitragen. Generell sind für beide Verfahren jedoch unterschiedliche Indikationen gegeben.

4.2.2 ParoCheck® vs. enzymatische Methoden

Mit dem sog. BANA-Verfahren können ausschließlich Parodontopathogene nachgewiesen werden, die trypsinähnliche Proteasen besitzen, also *T.d.*, *P.g.*, *T.f.* sowie *Cap. spp.* In vergleichenden Tests mit Kultur, Immunoassays und DNA-Sonden konnten gleichwertige Ergebnisse bezüglich Sensitivität und Exaktheit beobachtet werden (Loesche et al. 1992). Eindeutiger Vorteil der Methode ist, dass im Gegensatz zu allen anderen Verfahren ein Ergebnis direkt in derselben Sitzung vorliegt („chairside-diagnostic“). Ein essentieller Nachteil ist die Limitation der nachzuweisenden Pathogene auf BANA-positive Arten, was z.B. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ausschließt. Das ParoCheck®-System bietet im Vergleich noch einige andere Vorteile:

- Es wird ein Spektrum von 20 parodontopathogenen Bakterien untersucht,
- Es hat eine niedrigere Nachweisgrenze, ist also sensitiver.

- Es ist von einer höheren Spezifität auszugehen, da auch einige Spezies, die nur marginal an der parodontalen Destruktion beteiligt sind, BANA positiv sind wie z.B. *Capnocytophaga* spp.
- Das Verfahren ist semiquantitativ und lässt anhand des SNR-Wertes eine Vermutung über die Anzahl der Pathogene in der Probe zu.

4.2.3 ParoCheck® vs. Immoassays

Immunologische Verfahren können verwendet werden, wenn es um die Diagnostik von Leitkeimen in der Parodontitis geht (Zambon et al. 1985, 1986). Bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern hat das Verfahren zwar eine höhere Sensitivität und Spezifität als eine Kultur, die Nachweisgrenze liegt jedoch auch hier ziemlich hoch (10^3 - 10^4). Genau wie der ParoCheck®-Chip hat das Verfahren den Vorteil, dass die Bakterien nicht vital erhalten bleiben müssen. Es kann aber auch bei diesem Verfahren kein Antibiogramm erstellt werden. Außerdem ist die Anzahl der Antikörper begrenzt, so dass nur die wichtigsten Leitkeime detektiert werden können. Wird kein FACS (Fluorescence activated cell sorter) verwendet, ist die Auszählung der fluoreszierenden Keime zudem subjektiv. Bei der Entscheidung für einen diagnostischen Antikörper kann dieser möglicherweise nur bestimmte Serotypen einer Art erfassen oder aber über die Speziesgrenze hinausgreifen. Antikörper bzw. die korrespondierenden Antigene sind biologisch nicht an Artgrenzen gebunden, wohingegen Genabschnitte sehr artspezifisch sein können. Die Routinenutzung dieses Verfahrens hat daher bislang auch wenig Verbreitung gefunden, wobei die Entwicklung eines Akbasierenden chairside-Tests (Dentognostics GmbH, Jena, Markteinführung 2006/2007) zu einer Renaissance der Immunoassays beitragen könnte.

Da der ParoCheck®-Chip 20 parodontopathogene Keime gleichzeitig erfassen kann, genbasiert ist, zudem eine deutlich niedrigere Nachweisgrenze hat und die Auswertung mittels Scanner und zugehöriger Software geschieht, scheint dieses Verfahren den Immunoassays überlegen zu sein.

4.2.4 ParoCheck® vs. DNA-Sonden

Es konnte bereits in zahlreichen Studien demonstriert werden, dass DNA-Sonden anderen Nachweisverfahren wie Kultur, Immunoassays und enzymatischen Methoden bezüglich Sensitivität und Spezifität überlegen sind (Conrads & Brauner 1993, Dix et al. 1990, Moncla et al. 1990, Savitt et al. 1988, Chuba et al. 1988). Ein Vergleich mit dem ParoCheck® ist schwierig. Sensitivität und Spezifität werden ähnlich sein. Zeitaufwand und Kosten bewegen sich ebenfalls im ähnlichen Rahmen. Ein Vorteil des ParoCheck-Ansatzes ist jedoch die Möglichkeit, ein parodontopathogenes Spektrum von 20 (nach oben offen, ggf. sogar 100-300) Bakterienarten parallel untersuchen zu können, sowie der semiquantitative Charakter.

Abet und auch Socransky et al (1994) entwickelten bereits eine Technik („Checkerboard DNA-DNA hybridisation“), mit der sie eine große Anzahl von Plaqueproben fixiert auf einer Membran auf 40 verschiedene Bakterienarten in einem einzigen Test untersuchen konnten. Dieses Verfahren erfordert jedoch eine sehr anspruchsvolle und hochwertige Laborausstattung sowie sehr gute fachliche Kompetenz. Es ist deshalb für routinediagnostische Zwecke (außerhalb des Forsyth Dental Institutes, Boston, USA) nie genutzt worden und kann deshalb mit dem ParoCheck® nicht verglichen werden. Da in einem einzigen Test eine große Anzahl von Proben auf 40 verschiedene Bakterien untersucht werden kann und zudem keine vitalen Bakterien notwendig sind, kommt dieser Test jedoch bei ökologischen Studien sowie bei epidemiologischen Untersuchungen der Forsyth-Arbeitsgruppe zum Einsatz (Haffajee et al. 1997, 2001, Papanou et al. 1997, Levy et al. 1999, Ximenez-Fyvie et al. 2000, Feres et al. 2001).

4.2.5 ParoCheck® vs. PCR

Die Standard PCR ist aufgrund ihrer sehr hohen Sensitivität (< 100 Zellen) zur Routinediagnostik zum Nachweis von parodontopathogenen Keimen nicht geeignet. Sie weist zumindest theoretisch Keime in noch so geringer Anzahl nach (3-10 Zellen), dass diese noch keine pathogene Wirkung haben müssen. Bei dem micro-IDent Verfahren (Hain Lifescience, Neheren) wird das PCR Produkt reverse gegen 5 bis 11 immobilisierte Gensonden (entspricht auch 5-11 Bakterienspezies) auf einem Papierstreifen hybridisiert. Eine halbwegs exakte Quantifizierung ist damit jedoch nahezu unmöglich, allenfalls eine Semiquantifizierung. Im Gegensatz dazu sollen „real-time“ PCR und „endpoint“ PCR quantitative Ergebnisse liefern (Lyon et al. 2000, Shelbourne et al. 2000, Morillo et al. 2003, Rudney et al. 2003, Kuboniwa et al. 2004, Nonnemacher et al. 2004). In der meridol-Paro-Diagnostik ist dieser Ansatz ebenfalls kommerziell umgesetzt. Für eine gerechte Quantifizierung auf PCR- oder Genchip-Basis ist aber gleichermaßen zu fordern, dass alle Bakterienarten (z.B. Gram-positiv, Gram-negativ, Haufen-, Ketten- und Aggregatbildner) gleich gut mechanisch und/oder enzymatisch aufgeschlossen werden und es zudem zu keinen Wechselwirkungen zwischen den Templates kommt. D.h., dass jeder Primer mit jedem Template gleich stabil und gleich schnell reagieren müsste. Das ist jedoch theoretisch nicht möglich und deshalb praktisch nicht umsetzbar. Damit ist eine PCR basierte Multiplexdiagnostik bislang -und evtl. sogar prinzipiell- unmöglich.

4.3 Fazit

ParoCheck® ist ein Verfahren, das zur Routinediagnostik zum Nachweis von parodontopathogenen Keimen geeignet ist. Der Chip scheint anderen Verfahren wie Immunoblotassays und enzymatischen Methoden überlegen zu sein. Bei der Detektion von Bakterien bietet er auch der Kultur gegenüber Vorteile. Zur Erstellung von

Antibiogrammen und dem Auffinden neuer Spezies sowie der Charakterisierung dieser ist das Anzüchten von Keimen auf Kulturmedien jedoch nach wie vor das einzige Mittel der Wahl, der Goldstandard. Da mit dem ParoCheck®-Chip (10-) 20 parodontopathogene Keime nachgewiesen werden können, ist er diesbezüglich auch den DNA-Sonden überlegen. Es bleibt jedoch zu evaluieren, was sich im klinischen Versuch für Sensitivität und Spezifität und letztendlich Praktikabilität ergibt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Chip Eigenschaften besitzt, die gegenüber den anderen Verfahren einen Vorteil darstellen:

1. Ein Spektrum von 20 nachzuweisenden Bakterien gibt einen vollständigen Überblick über die pathogene Mikroflora in der parodontalen Tasche. Bei zukünftigem Bedarf lässt sich das Format auch leicht auf 50-300 Keime bei nicht erheblich höheren Kosten ausweiten.
2. Die Ergebnisse können theoretisch bereits am gleichen Tag der Einsendung vorliegen.
3. Aufgrund des semiquantitativen Charakters des Chips, ist eine bedingte Risikoinschätzung des weiteren Krankheitsverlaufs möglich.

Es soll an dieser Stelle noch darauf hingewiesen werden, dass bei allen Tests das Kosten/Nutzen Verhältnis sorgfältig abgewogen werden muss. Bei der Wahl eines Verfahrens sollten stets die klinischen Befunde berücksichtigt werden, um eine angemessene Indikation stellen zu können.

Generell ist die Indikation für mikrobielle Tests zur weiterführenden Diagnostik im klinischen Alltag eingeschränkt. Sie ist vor allem bei aggressiven oder refraktären, sowie bei mittelschweren Parodontitiden in Assoziation mit systemischen Erkrankungen gegeben, außerdem bei stark fortgeschrittenen chronischen Parodontitiden und in der Implantologie. In diesen „schwierigen“ Fällen sind sie notwendiger Bestandteil der Diagnose und insbesondere der Therapiewahl geworden. Ansonsten ist, wie gesagt, das Kosten/Nutzen Verhältnis im Sinne des Patienten abzuwägen.

5 Zusammenfassung

Kern dieser Arbeit ist der Nachweis parodontopathogener Keime mit Hilfe von Genchips. Der Versuchsreihe lag das ParoCheck® Kit 20 zugrunde. ParoCheck® ist der erste kommerzielle DNA-Chip zum semiquantitativen Nachweis von Parodontitis assoziierten Keimen. Mit dem Kit 20 lassen sich folgende Keime nachweisen: *Actinobacillus actinomycetem comitans* A.a., *Actinomyces odontolyticus* A.o., *Bacteroides forsythus* B.f. (synonym: *Tannerella forsythen-sis*, T.f.), *Campylobacter concisus* C.c., *Campylobacter gracilis* C.g., *Campylobacter rectus* C.r., *Capnocytophaga gingivalis* Cap.g., *Eikenella corrodens* E.c., *Eubacterium nodatum* E.n., *Fusobacterium nucleatum* F.n., *Peptostreptococcus micros* P.m., *Porphyromonas gingi-valis* P.g., *Prevotella intermedia* P.i., *Prevotella nigrescens* P.n., *Streptococcus constellatus* S.c., *Streptococcus gordonii* S.g., *Streptococcus mitis* S.m., *Treponema denticola* T.d., *Veil-lonella parvula* V.p..

Es wurden 10 Proben von verschiedenen Patienten mit chronischer Parodontitis entnommen. Der Untersuchung wurde eine ausführliche Anamnese und Befunderhebung sowie ein Parodontalstatus zugrunde gelegt.

Nach Probeentnahme wurde im Labor die DNA extrahiert, mittels PCR amplifiziert und schließlich auf dem Chip hybridisiert. Jede Probe wurde sowohl mit der Hilfe des vom Entwicklungsstandard her älteren ParoCheck® Chips (ParoChip1) analysiert, als auch mit der des neuen, moderneren Chips (ParoChip2).

Die beiden Chips unterscheiden sich im Aufbau: Der ParoChip1 ist ein Glasobjektträger, der nur eine einzige Patientenprobe aufnehmen kann und für jedes Bakterium drei Messpunkte aufweist. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem ParoChip2 um einen Plexiglasobjektträger, der 12 Patientenproben aufnehmen kann und für jedes Bakterium fünf Messpunkte vorsieht. Für beide Chips wurden Fluorophor markierte Primer für die PCR (Cy5 markiert) und Fluorophor markierte Sonden für interne Kontrollsysteme (Cy3 markiert) verwendet. Sie wurden mit dem Axon Scanner 4100A bei den Wellenlängen 532nm (Cy3 markiert) und 635nm (Cy5 markiert) gescannt und anhand der zugehörigen Software (GenePix4.x) analysiert. Die Ergebnisse der beiden Chips stimmten in 75% der Fälle überein. Die Diskrepanzen sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Oberflächenchemie der Chips und die daraus resultierenden verschiedenen Signal-to-Noise-Ratio (SNR)-Schwellenwerte zurückzuführen.

Im Einzelfall liegt aber auch eine veränderte (spezifitätsverbesserte) Sondensquenz den Diskrepanzen zugrunde.

Im Vergleich mit bisherigen Nachweisverfahren konnten klare Vorteile wie die Detektion von bis zu 20 Bakterienarten in einem einzigen Hybridisierungsverfahren, die schnelle Vorlage der Ergebnisse und der robuste wie semiquantitative Charakter des Testverfahrens herausgestellt werden. Sensitivität, Spezifität und Praktikabilität des Testverfahrens müssen noch in weiteren mikrobiologischen wie klinischen Studien ermittelt werden, damit ParoCheck® Genchips etabliert werden und einen festen Platz in der Routinediagnostik einnehmen können.

6 Literaturverzeichnis

Aldous, W. K., J. I. Pounder, et al. (2005). "Comparison of six methods of extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR." J Clin Microbiol 43(5): 2471-3.

Ashimoto, A., C. Chen, et al. (1996). "Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions." Oral Microbiol Immunol 11(4): 266-73.

Baron, D. (2001), Im Zeitalter der "Omics": Genomics und Proteomics mit Gen-Chips und Protein-Arrays, <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/pza/2001-31/titel.htm>

Bottger, E. C. (1990). "Frequent contamination of Taq polymerase with DNA." Clin Chem 36(6): 1258-9.

Brauner A., Conrads G., Lampert F. (1996), "Erste Erfahrungen mit einem kommerziellen molekular-biologischen Testverfahren", ZWR, 105/9, 448-454

Buchmann, R., R. F. Muller, et al. (2000). "Actinobacillus actinomycetemcomitans in destructive periodontal disease. Three-year follow-up results." J Periodontol 71(3): 444-53.

Chuba, P. J., K. Pelz, et al. (1988). "Synthetic oligodeoxynucleotide probes for the rapid detection of bacteria associated with human periodontitis." J Gen Microbiol 134(7): 1931-8.

Conrads, G. (2003), „Infektiologische Aspekte für Zahnärzte und Zahnmedizinstudenten“, Version 1.0 (03/ 2003)

Coyne, S. R., P. D. Craw, et al. (2004). "Comparative analysis of the Schleicher and Schuell IsoCode Stix DNA isolation device and the Qiagen QIAamp DNA Mini Kit." *J Clin Microbiol* 42(10): 4859-62.

Dix, R. D., L. Resnick, et al. (1989). "Intraocular HIV-1-specific IgG synthesis in a patient with CMV retinitis." *Reg Immunol* 2(1): 1-6.

Dzink, J. L., A. C. Tanner, et al. (1985). "Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions." *J Clin Periodontol* 12(8): 648-59.

Feres, M., A. D. Haffajee, et al. (2001). "Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole." *J Clin Periodontol* 28(7): 597-609.

Genco, R. J. (1996). "Current view of risk factors for periodontal diseases." *J Periodontol* 67(10 Suppl): 1041-9.

Greenstein, G. (1988). "Microbiologic assessments to enhance periodontal diagnosis." *J Periodontol* 59(8): 508-15.

Griffen, A. L., M. R. Becker, et al. (1998). "Prevalence of Porphyromonas gingivalis and periodontal health status." *J Clin Microbiol* 36(11): 3239-42.

Haffajee, A. D., M. A. Cugini, et al. (1997). "The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases." *J Clin Periodontol* 24(5): 324-34.

Haffajee, A. D. and S. S. Socransky (2001). "Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota." *J Clin Periodontol* 28(5): 377-88.

Harris, S. and D. B. Jones (1997). "Optimisation of the polymerase chain reaction." *Br J Biomed Sci* 54(3): 166-73.

Hartroth, B., I. Seyfahrt, et al. (1999). "Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters." *Oral Microbiol Immunol* 14(5): 326-30.

Henegariu, O., N. A. Heerema, et al. (1997). "Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol." *Biotechniques* 23(3): 504-11.

Holt, S. C., L. Kesavalu, et al. (1999). "Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*." *Periodontol* 2000 20: 168-238.

Hughes, M. S., L. A. Beck, et al. (1994). "Identification and elimination of DNA sequences in Taq DNA polymerase." *J Clin Microbiol* 32(8): 2007-8.

Jain, K. K. (2005). "Personalised medicine for cancer: from drug development into clinical practice." *Expert Opin Pharmacother* 6(9): 1463-76.

Knepp, J. H., M. A. Geahr, et al. (2003). "Comparison of automated and manual nucleic acid extraction methods for detection of enterovirus RNA." *J Clin Microbiol* 41(8): 3532-6.

.

Krekeler, G. (2000), Kapitel 8: "Parodontologie", aus: Zahnärztliche Chirurgie, Band 3, Herausgeber: Schwenzer, N., Ehrenfeld, M., 3. aktualisierte und erweiterte Auflage, 2000 Georg Thieme Verlag

Kuboniwa, M., A. Amano, et al. (2004). "Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes." *Oral Microbiol Immunol* 19(3): 168-76.

Kwok, S. and R. Higuchi (1989). "Avoiding false positives with PCR." *Nature* 339(6221): 237-8.

Lamster, I. B., R. S. Celenti, et al. (1993). "Current status of tests for periodontal disease." *Adv Dent Res* 7(2): 182-90.

Levy, R. M., W. V. Giannobile, et al. (1999). "The short-term effect of apically repositioned flap surgery on the composition of the subgingival microbiota." *Int J Periodontics Restorative Dent* 19(6): 555-67.

Lindpaintner, K. (2004). "Pharmacogenetics and pharmacogenomics." *Methods Mol Med* 108: 235-60.

Listgarten, M. A. (1986). "Pathogenesis of periodontitis." *J Clin Periodontol* 13(5): 418-30.

Listgarten, M. A. (1986). "Direct microscopy of periodontal pathogens." *Oral Microbiol Immunol* 1(1): 31-8.

Loesche, W. J. (1986). "The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods." *Oral Microbiol Immunol* 1(1): 65-72.

Loesche, W. J., D. E. Lopatin, et al. (1992). "Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to

detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*." *J Clin Microbiol* 30(2): 427-33.

Loesche, W. J., D. E. Lopatin, et al. (1992). "Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard?" *J Clin Microbiol* 30(2): 418-26.

Lovegrove, J. M. (2004). "Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease." *J N Z Soc Periodontol*(87): 7-21.

Lyons, S. R., A. L. Griffen, et al. (2000). "Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria." *J Clin Microbiol* 38(6): 2362-5.

Markoulatos, P., N. Siafakas, et al. (2002). "Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach." *J Clin Lab Anal* 16(1): 47-51.

Meier, A., D. H. Persing, et al. (1993). "Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens." *J Clin Microbiol* 31(3): 646-52.

Moncla, B. J., P. Braham, et al. (1990). "Use of synthetic oligonucleotide DNA probes for the identification of *Bacteroides gingivalis*." *J Clin Microbiol* 28(2): 324-7.

Moore, W. E. and L. V. Moore (1994). "The bacteria of periodontal diseases." *Periodontol* 2000 5: 66-77.

Morillo, J. M., L. Lau, et al. (2003). "Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*." *J Periodontal Res* 38(5): 518-24.

Nadkarni, M. A., F. E. Martin, et al. (2002). "Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set." *Microbiology* 148(Pt 1): 257-66..

Netuschil, L., M. Brex, et al. (1996). "Vital fluorescence to assess in vitro and in vivo the antibacterial effects of amalgams." *Acta Stomatol Belg* 93(3): 129-34.

Newman, H. N. (1990). "Plaque and chronic inflammatory periodontal disease. A question of ecology." *J Clin Periodontol* 17(8): 533-41.

Nonnenmacher, C., A. Dalpke, et al. (2004). "Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR." *J Microbiol Methods* 59(1): 117-25.

Papapanou, P. N., P. N. Madianos, et al. (1997). "'Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota." *Eur J Oral Sci* 105(5 Pt 1): 389-96.

Rand, K. H. and H. Houck (1990). "Taq polymerase contains bacterial DNA of unknown origin." *Mol Cell Probes* 4(6): 445-50.

Rateitschak, K. H. & E. M., Wolf, H. F., *Farbatlant* der Zahnmedizin 1, Parodontologie, 3. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, 2004 Georg Thieme Verlag

Ross, J. S., W. F. Symmans, et al. (2005). "Pharmacogenomics and clinical biomarkers in drug discovery and development." *Am J Clin Pathol* 124 Suppl: S29-41.

Rudney, J. D., R. Chen, et al. (2003). "Endpoint quantitative PCR assays for *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." *J Periodontal Res* 38(5): 465-70.

Rys, P. N. and D. H. Persing (1993). "Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products." *J Clin Microbiol* 31(9): 2356-60.

Sakamoto, M., M. Suzuki, et al. (2002). "Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov." *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 3): 841-9.

Sanz, M., L. Lau, et al. (2004). "Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review." *J Clin Periodontol* 31(12): 1034-47.

Savitt, E. D., M. N. Strzempko, et al. (1988). "Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples." *J Periodontol* 59(7): 431-8.

Schmidt, T. M., B. Pace, et al. (1991). "Detection of DNA contamination in Taq polymerase." *Biotechniques* 11(2): 176-7.

Shelbourne, C.E., Prabhu, A., Gleason, R.M., Mullally, B.H. & Coulter, W.A. (2000) Quantitation of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque. Comparison of immunoassays and quantitative polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology* 39, 97-107

Slots, J. (1986). "Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation." *Oral Microbiol Immunol* 1(1): 48-57.

Slots, J. (1986). "Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work." *J Clin Periodontol* 13(10): 912-7.

Slots, J., A. Ashimoto, et al. (1995). "Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction." *Clin Infect Dis* 20 Suppl 2: S304-7.

Socransky, S. S. (1970). "Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease." *J Dent Res* 49(2): 203-22.

Socransky, S. S., A. D. Haffajee, et al. (1987). "Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases." *J Clin Periodontol* 14(10): 588-93.

Socransky, S. S., C. Smith, et al. (1994). "'Checkerboard' DNA-DNA hybridization." *Biotechniques* 17(4): 788-92.

Socransky, S. S., A. D. Haffajee, et al. (1999). "Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections." *Periodontol* 2000 20: 341-62.

Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2002). "Dental biofilms: difficult therapeutic targets." *Periodontol* 2000 28: 12-55.

Suzuki, M. T. and S. J. Giovannoni (1996). "Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR." *Appl Environ Microbiol* 62(2): 625-30.

Vianna, M. E., H. P. Horz, et al. (2005). "Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections." *Oral Microbiol Immunol* 20(4): 253-8.

Vizirianakis, I. S. (2004). "Challenges in current drug delivery from the potential application of pharmacogenomics and personalized medicine in clinical practice." *Curr Drug Deliv* 1(1): 73-80.

Ximenez-Fyvie, L. A., A. D. Haffajee, et al. (2000). "Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis." *J Clin Periodontol* 27(10): 722-32.

Yan, L. and R. A. Beckman (2005). "Pharmacogenetics and pharmacogenomics in oncology therapeutic antibody development." *Biotechniques* 39(4): 565-8.

Zambon, J. J., V. Bochacki, et al. (1986). "Immunological assays for putative periodontal pathogens." *Oral Microbiol Immunol* 1(1): 39-47.

Zambon, J. J., H. S. Reynolds, et al. (1985). "Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque. Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Bacteroides gingivalis*." *J Periodontol* 56(11 Suppl): 32-40.

7 Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Georg Conrads, Leiter des Lehr- und Forschungsgebietes Orale Mikrobiologie und Immunologie der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der RWTH Aachen, danke ich für die Themenstellung und die intensive Betreuung der Arbeit.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Hubertus Spiekermann, Direktor der Klinik für Zahnärztliche Prothetik der RWTH Aachen, danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. dent. Friedrich Lampert, Prodekan der Medizinischen Fakultät und Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der RWTH Aachen, danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik promovieren zu dürfen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rudolf Lütticken, Dekan der medizinischen Fakultät und Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der RWTH Aachen, danke ich für die Bereitstellung wichtiger Materialien und Unterlagen.

Der Firma Greiner Bio-One International AG , sowie der Firma Lambda Gmbh danke ich für die Bereitstellung von Materialien sowie die Unterstützung bei technischen Fragen, bei denen mir besonders Herr Florian Winner der Firma Lambda GmbH behilflich war.

Besonderer Dank gilt der Medizinisch-Technischen Assistentin Frau Ilse Seyfarth für die tatkräftige und stets freundliche Unterstützung der Laborarbeiten und die Bereitstellung persönlicher Aufzeichnungen, sowie Herrn Dr. rer. nat. Hans-Peter Horz und

den restlichen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der RWTH Aachen für jegliche Hilfe.

Ferner danke ich allen Freunden und Bekannten sowie meiner Familie für die stetige Unterstützung, besonders meiner Schwester Birte Schulthoff und Ihrem Mann Jörg Asshoff, die diese Arbeit Korrektur gelesen haben und mir wertvolle Tipps gegeben haben.

Anhang A

Abkürzungsverzeichnis

A.a.	Actinobacillus actinomycetemcomitans
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
A.o.	Actinomyces odontolyticus
BANA	N- α -Benzoyl-DL-Arginin-2-Naphtylamid
BOP	Bleeding on probing
Cap.g.	Capnocytophaga gingivalis
C.c.	Campylobacter concisus
C.g.	Campylobacter gracilis
C.r.	Campylobacter rectus
Decp	Diethylpyrocarbonat
DLP	Digital Light Processing
DNA	Desoxyribonucleinacid
E.c.	Eikenella corrodens
E.coli.	Escherichia coli
E.n.	Eubacterium nodatum
FACS	Fluorescence activated cell sorter
F.n.	Fusobacterium nucleatum
GVO	gentechnisch veränderte Organismen
HIV	Human immunodeficiency virus
LADS	Leukozyten-Adhäsions-Defizit Syndrom

PCR	Polymerase chain reaction
P.g.	Porphyromonas gingivalis
P.i.	Prevotella intermedia
P.m.	Peptostreptococcus micros
P.n.	Prevotella nigrescens
RNA	Ribonucleinacid
RTF	reduced transport fluid
S.c.	Streptococcus constellatus
S.g.	Streptococcus gordonii
S.m.	Streptococcus mitis
SNP	single nucleotide polymorphysm
SNR	Signal to noise ratio
Taq	Thermus aquaticus
T.d.	Treponema denticola
T.f.	Tanerella forsythensis
V.p.	Veillonella parvula

Anhang B

Abbildungen

Orale Mikrobiologie - Doktorarbeit

PA-Diagnostikbogen

Datum: 07.08.03

Patientenname:

Allgemeine Anamnese:

Hohes Blutdruck	
Niedriger Blutdruck	-
Erkrankungen des Herzes	-
Herzklappenersatz	-
Endokarditis	-
Herzoperationen	-
Herzschrittmacher	-
Zuckerkrankheit	-
Erkrankungen des Blutes	-
Blutgerinnungsstörung	-
Allergien	-
Schleimkrankenkrankungen	-
Asthma/ Lungenerkrankungen	-
Nervenkrankungen	-
Lebererkrankungen/Gelbsucht	-
Nierenkrankungen	-
Arthralgien	-
Magen-Darm-Erkrankungen	-
Immunschwäche	-
Rauchen	-
Stress	-
Medikamente	
Nichtverträglichkeit von Medikamenten	-
Vorangegangene PA-Behandlung	
Vorangegangene Antibiotikatherapie	-
Besondere Schwangerschaft	-
Sonstiges	

Familienanamnese:

PA-Erkrankungen in der Familie	
--------------------------------	--

Spezifische Anamnese:

Orale Mikrobiologie - Doktorarbeit

Zahnfleischbluten	
Akute Entzündung	-
Zahnwandränge	-
Zahnverlustrück-Lockering	-
Parodontologische Behandlung	-
Mundhygiene	-
- Frequenz	
- Technik	
- Zahnbürste	
- Hilfsmittel	
- Sonstiges	-
Ernährung	-
- regelmäßig	
- Karbonat	
- Tee	
- Süßigkeiten	
- Früchte/Säfte	-
- Vegetarier	-

Befund:

Extraoral

Lymphknoten	-
Kiefergelenk	-
Sonstiges	-

Intraoral



18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38



Marginales Parodont	
Entzündung (lok., ge.)	
Tasche/Kreftion	-
Gingivawucherung	-
Zahnstein	
Porkreme/te	
Mundschleimhaut	-
Speichelsekretion, -konsistenz	

Orale Mikrobiologie - Dokloratell

Funktionelle Störungen

Kariesrisiko, (Zunige u-) Presse u	
Abrasion/Schlammfäule u	-
Parodontit/Karminskulatur	-
Mundtrockenheit	

Röntgen:

Zahn (Art der Aufnahme/ Befund)	
Apikale Prozesse	-
Erweiterter PA-Spalt	-
Sonstiges	

3

Abbildung 18: PA-Diagnostikbogen zur Anamneseerhebung der Patientenfälle



Abbildung 19: Das ParoCheck® 20 Kit mit Waschpuffern A und B



Abbildung 20: Der ältere Chip (oben) zur Aufnahme einer Probe und der neuere Chip (unten) mit zwölf Spots zur Aufnahme einer Patientenprobe



Abbildung 21: Der GenePix-Scanner der Firma Axon

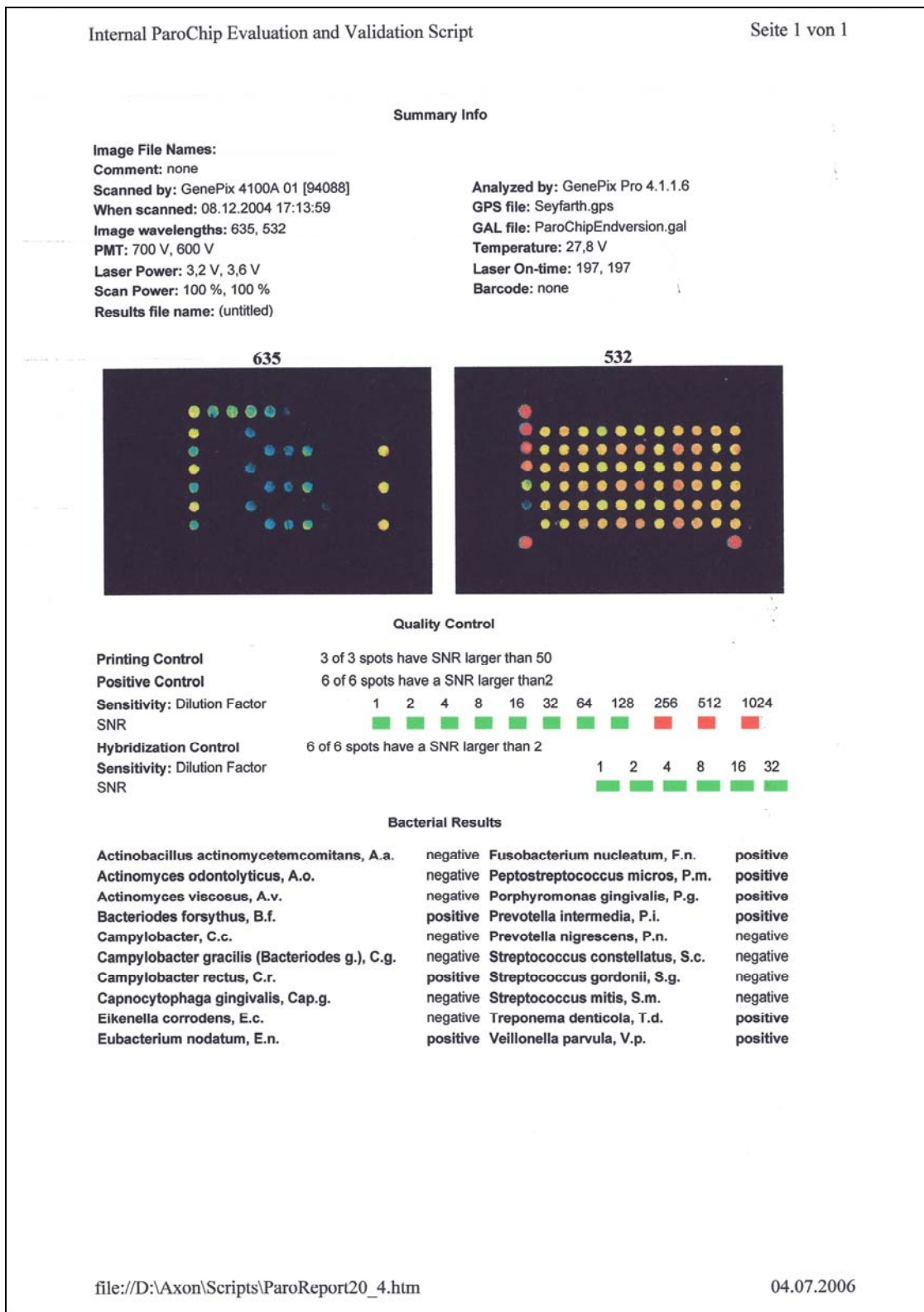


Abbildung 22: Der ParoReport des älteren ParoChips1

Resultat der ParoCheck Analyse

Bakterienname	vorhanden	Bewertung	skaliertes SNR
Actinobacillus actinomycetemcomitans, A.a.	negativ	-	
Actinomyces viscosus, A.v.	negativ	-	
Tannerella forsythia #, T.f.	positiv	+++	
Campylobacter rectus, showae, C.r.	negativ	-	
Treponema denticola, T.d.	positiv	+++	
Eikenella corrodens, E.c.	negativ	-	
Prevotella intermedia, P.i.	positiv	++	
Peptostreptococcus micros, P.m.	positiv	++	
Porphyromonas gingivalis, P.g.	positiv	++	
Fusobacterium nucleatum, F.n.	positiv	++	
Actinomyces odontolyticus, A.o.	positiv	+	
Capnocytophaga sp. (gingivalis, sputigena, ochracea)	positiv	+	
Campylobacter concisus, C.c.	negativ	-	
Eubacterium nodatum, E.n.	positiv	+	
Streptococcus concisus group, S.c.	positiv	(+)	
Campylobacter gracilis, C.g.	negativ	-	
Streptococcus mitis group, S.m.	positiv	(+)	
Prevotella nigrescens, P.n.	positiv	++	
Streptococcus gordonii group, S.g.	positiv	++	
Veillonella parvum, V.p.	positiv	++	
*** SNR-Wert wurde abgeschnitten bei 300			# früher Bacteriodes forsythus

Chip Nummer:	Well	Proben Nummer	Feld 1	Feld2
3253	B2	Habermann		
Feld3	Feld4	Feld5	Feld6	Feld7
D:/Axon/Data//3253/3253_B2.htm				

ParoCheck Auswertung		Seite 2 von 2		
Resultat der ParoCheck Analyse				
Zusammenfassung				
Bild Dateiname: All1Chip3253.tif		analysiert am: 04.01.2005 11:08:47		
Kommentar nicht vorhanden				
gemessen von GenePix 4100A 01 [94088]		analysiert von GenePix Pro 4.1.1.40		
Wellenlängen 635, 532		ParoReport Version GP41_PA20_X12_V1.0.1		
PMT: 700 V, 600 V		Temperatur: 22,9 V		
Laser Leistung 2,6 V, 3,6 V		PMT Spannung 100 %, 100 %		
Kontrollen	Wellenlängen	mittlerer SNR	positiv	
Hybridisierungskontrolle	532nm	91,7	5 / 5	
PCR-Kontrolle	635nm	66,3	5 / 5	
Analysen Bericht				
Bakterienname	vorhanden	Mittlerer SNR *	Bewertung	Spotanzahl mit SNR grösser als 12
Actinobacillus actinomycetemcomitans, A.a.	negativ	0	-	0 / 5
Actinomyces viscosus, A.v.	negativ	0	-	0 / 5
Tannerella forsythia #, T.f.	positiv	216,2	+++	5 / 5
Campylobacter rectus, showae, C.r.	negativ	0	-	0 / 5
Treponema denticola, T.d.	positiv	329,2	+++	5 / 5
Eikenella corrodens, E.c.	negativ	0	-	0 / 5
Prevotella intermedia, P.i.	positiv	87,1	++	5 / 5
Peptostreptococcus micros, P.m.	positiv	43,3	++	5 / 5
Porphyromonas gingivalis, P.g.	positiv	133,1	++	5 / 5
Fusobacterium nucleatum, F.n.	positiv	154,7	++	5 / 5
Actinomyces odontolyticus, A.o.	positiv	22,2	+	5 / 5
Capnocytophaga sp. (gingivalis, sputigena, ochracea)	positiv	35,5	+	5 / 5
Campylobacter concisus, C.c.	negativ	0	-	0 / 5
Eubacterium nodatum, E.n.	positiv	22,8	+	5 / 5
Streptococcus concisus group, S.c.	positiv	18,6	(+)	5 / 5
Campylobacter gracilis, C.g.	negativ	0	-	0 / 5
Streptococcus mitis group, S.m.	positiv	17,6	(+)	5 / 5
Prevotella nigrescens, P.n.	positiv	48,2	++	5 / 5
Streptococcus gordonii group, S.g.	positiv	61,8	++	5 / 5
Veillonella parvum, V.p.	positiv	45,5	++	5 / 5
* Der Mittlere SNR wird nur von den Werten berechnet die größer sind als 12		# früherer Bacteriodes forsythus		
Chip Nummer:	Well	Proben Nummer	Feld 1	Feld2
3253	B2	Habermann		
Feld3	Feld4	Feld5	Feld6	Feld7
D:/Axon/Data//3253/3253 B2.htm				
file://D:\Schulthoff\3253\3253_B2.htm			04.07.2006	

Abbildung 23: Der ParoReport des neueren ParoChips2

Anhang C

CD-ROM zur GenePix-Software, Bildauswertung

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Wiebke Schulthoff
Adresse	Maastrichter Str. 18, 52074 Aachen
Telefon	0241/ 8942553
e-mail	weebes@gmx.de
Geburtsdatum	03. 12. 1979
Geburtsort	Hamm (Westfalen)
Konfession	evangelisch
Familienstand	ledig
Eltern	Klaus Schulthoff, Dipl. Ingenieur Helga Schulthoff geb. Liesegang, Hausfrau
Geschwister	Birte Schulthoff, Studentin Maike Schulthoff, Bankkauffrau

Schulische Laufbahn

08/1986 – 06/1990	Selmigerheideschule, Hamm
08/1990 – 06/1999	Gymnasium Hammonense, Hamm Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
08/1996 – 02/1997	Forest Heights Collegiate Institute in Kitchener/Ontario in Kanada im Rahmen eines Schüleraustausches

Weiterer Werdegang

10/1999	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der RWTH Aachen
03/2001	Ablegen der Naturwissenschaftlichen Vorprüfung an der RWTH Aachen
04/2002	Ablegen der zahnärztlichen Vorprüfung an der RWTH Aachen
11/2004	Ablegen des zahnärztlichen Staatsexamens an der RWTH Aachen
12/2004	Erhalt der Approbation als Zahnärztin
01/2005 – 04/2005	Famulatur auf den Cook Islands, selbstständige Betreuung von Patienten in der örtlichen Klinik und örtlichen Praxen
seit 08/2005	Tätigkeit als Assistentenzahnärztin bei Dr. med. dent. Werner Brocker, Wollenweberstr. 18, 52249 Eschweiler