

Das Mikrobiom periimplantärer Läsionen
Der Nachweis dysbiotischer Veränderungen in Assoziation
mit dem Schweregrad der Erkrankung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Annika Therese Kröger
aus Aachen

2020

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Moritz Kepschull

2. Gutachter: Prof. Dr. Achim Hörauf

Tag der Mündlichen Prüfung: 07.10.2020

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Søren Jepsen

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1 Periimplantitis	8
1.1.1 Dentale Implantate und umgebendes Gewebe in periimplantären gesunden Situationen	8
1.1.2 Periimplantitis	10
1.1.3 Periimplantitis versus Parodontitis	14
1.2 Das Mikrobiom bei Periimplantitis und Parodontitis	17
1.3 16s rRNA Sequenzierung	18
1.3.1 Hochdurchsatzsequenziermethodiken	18
1.3.2 Das 16s Gen	18
1.4 Hypothese und Fragestellung dieser Studie	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Studienpopulation	21
2.1.1 Allgemeines	21
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	21
2.1.3 Dokumentierte Parameter	22
2.2 Probengewinnung und -aufbereitung	23
2.3 16s rRNA Sequenzierung und Datenaufbereitung	24
2.3.1 ‚Paired-End‘-Hochdurchsatz-Sequenzierung der V3-V4 Region des 16s rRNA Genes	25
2.3.2 Post-Sequenzierungs-Prozesse	28
2.4 Statistische Analyse	32
2.4.1 Assoziation mit PD	32
2.4.2 Netzwerkanalyse	33
2.4.3 Mikrobieller Dysbiose Index	34
2.4.4 Signifikante Unterschiede der bakteriellen Charakteristika	34

3.	Ergebnisse	35
3.1	Studienpopulation (Tab. 1)	35
3.2	Struktur und Diversität der Bakteriengemeinschaft	35
3.3	Dysbiose	35
3.4	Charakteristika des Mikrobioms in Relation zum Erkrankungsschweregrad	37
3.5	Korrelationsnetzwerk	42
4.	Diskussion	47
4.1	Die Rolle der Dysbiose	48
4.2	Zusammensetzung und Eigenschaften des periimplantären Mikrobioms	49
4.3	Bakterielle Komplexe in der Periimplantitis	54
4.4	Stärken und Limitationen der Studie	56
4.5	Schlusswort	57
5.	Zusammenfassung	59
6.	Abbildungsverzeichnis	60
7.	Tabellenverzeichnis	61
8.	Literaturverzeichnis	62
9.	Danksagung	77

Abkürzungsverzeichnis

bp	base pair, Basenpaare
BoP	Bleeding on Probing, Blutung auf Sondierung
BoP+	positive Bleeding on Probing, positives Blutungszeichen bei Sondierung
MDI	Microbial Dysbiosis Index, Mikrobieller Dysbiose Index
N/A	not available, nicht verfügbar
NGS	Next-Generation-Sequencing, Hochdurchsatzsequenzierung
OTU	operational taxonomic unit, operative taxonomische Einheit
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PD	probing depth, Sondierungstiefe
PDmax	maximale Sondierungstiefe
PERIO	periodontitis, Parodontitis
PI	Periimplantitis
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology, Quantitative Einblicke in die mikrobielle Ökologie
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SD	standard deviation, Standardabweichung
sp.	Spezies (singular)
spp.	Spezies (plural)
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Periimplantitis

1.1.1 Dentale Implantate und umgebendes Gewebe in periimplantären gesunden Situationen

In den vergangenen 50 Jahren haben sich dentale Titanimplantate als neue Methode des Zahnersatzes durchgesetzt. Die moderne Implantattherapie bietet dabei teil- und zahnlosen Patienten die Wiederherstellung einer nahezu natürlichen Funktion mit biologisch ähnlichen Eigenschaften vergleichbar zur Situation um einen Zahn und ist somit oftmals konventionellen prothetischen Versorgungen überlegen. Des Weiteren überzeugt die Zehn-Jahres-Überlebensrate, welche bei ca. 95% liegt (Buser, Janner et al. 2012, Degidi, Nardi et al. 2012, Fischer and Stenberg 2012, Gotfredsen 2012). Der Begriff ‚Osseointegration‘ (Branemark, Hansson et al. 1977), welcher von Professor P. I. Brånemark aufgrund seiner Studien in den 60er Jahren (Branemark, Adell et al. 1969) definiert wurde, beschreibt die Verankerung des Implantates auf direkten Knochenkontakt und ist heute ein etablierter Begriff im Fachbereich der Implantologie. Professor A. Schroeder war einer der Pioniere, welcher sich tiefergehend mit dem Implantat-umgebenden Gewebe beschäftigt hat. Seiner Arbeitsgruppe gelang es dabei erstmals Osseointegration – also eine Knochen-Implantat-Verbindung – von Titanimplantaten in nicht-dekalifizierten histologischen Schnitten nachzuweisen (Schroeder, Pohler et al. 1976).

Eine erfolgreiche Implantation führt zu einer Osseointegration der Titanschraube und der Ausbildung von gesundem umliegendem Weichgewebe. Um das belastete Implantat (Albrektsson, Branemark et al. 1981) bildet sich eine strukturelle und funktionelle Verbindung in Form von Knochen und Weichgewebe – eine ‚funktionelle Ankylose‘ (Schroeder, Pohler et al. 1976), wobei sich der Knochen direkt an das dentale Implantat anlagert und mechanische Stabilität bietet (Abb. 1). Zusätzlich bildet sich nach Implantation auch ein weichgewebiges Attachment, welches sich aus dem periimplantären Saumepithel und einer bindegewebigen Zone zusammensetzt (Berglundh 2019).

Periimplantäre Gesundheit (Abb. 2) wird dabei interessanterweise durch die Abwesenheit klinischer Entzündungszeichen definiert: keine Schwellung, keine Blutung auf Son-

dierung (BoP) und keine Rötung des umliegenden Weichgewebes darf vorhanden sein. In der Definition der periimplantären Gesundheit ist der Parameter Sondierungstiefe (PD) nicht berücksichtigt, da er insbesondere in periimplantären Situationen hoher Variabilität ausgesetzt ist (Berglundh, Armitage et al. 2018). Zusätzlich lässt diese Definition auch den Schluss zu, dass periimplantäre Gesundheit auch bei reduziertem knöchernem Attachment auftreten kann – wie z.B. nach erfolgreicher Periimplantitis-Therapie (Berglundh, Armitage et al. 2018).

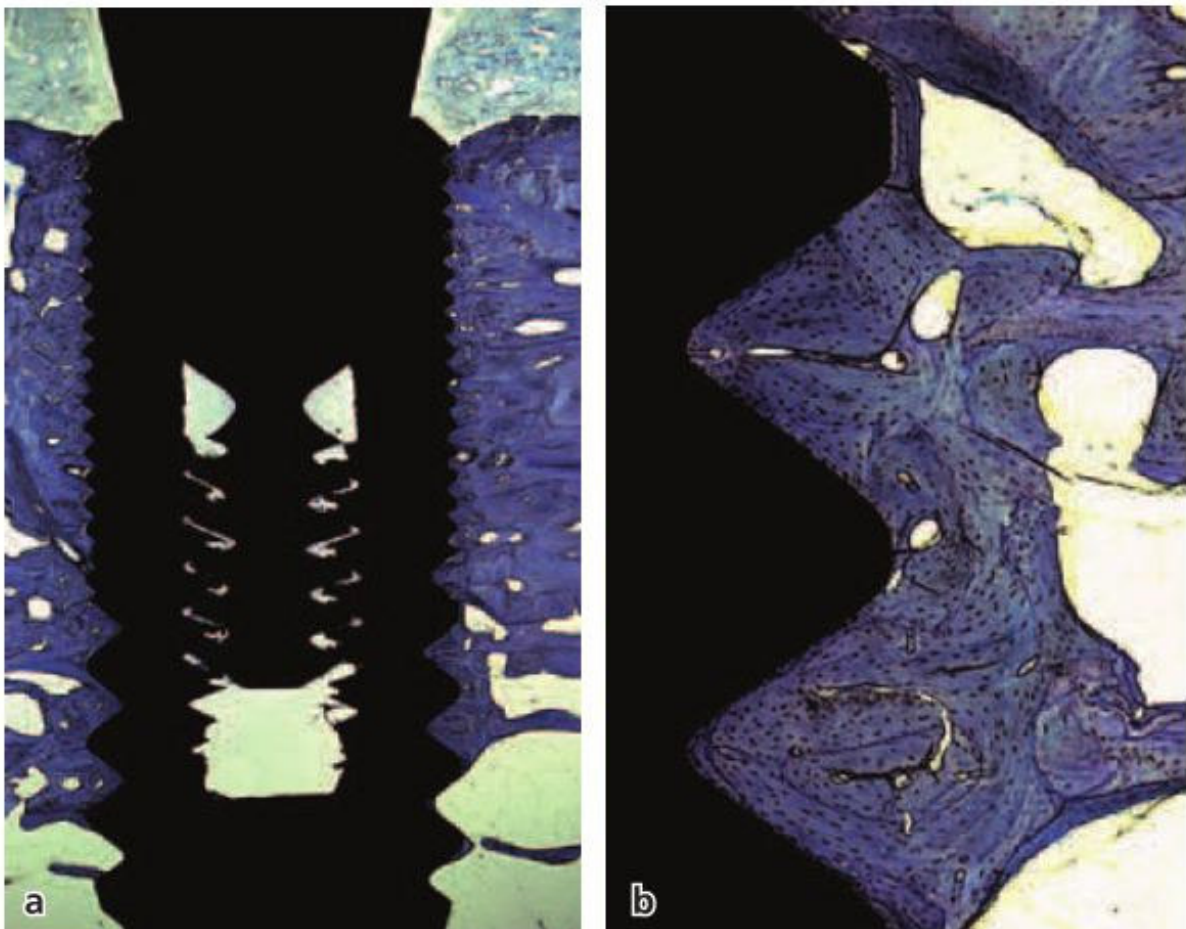


Abb. 1: Osseointegration eines dentalen Implantates

Histologischer Schnitt eines osseointegrierten Implantates – 16 Monate nach Insertion. (a) zeigt dichten laminären Knochen um das Implantat; (b) selbige Situation in höherer Auflösung

Abbildung aus (Lindhe, Lang et al. 2008); mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc.

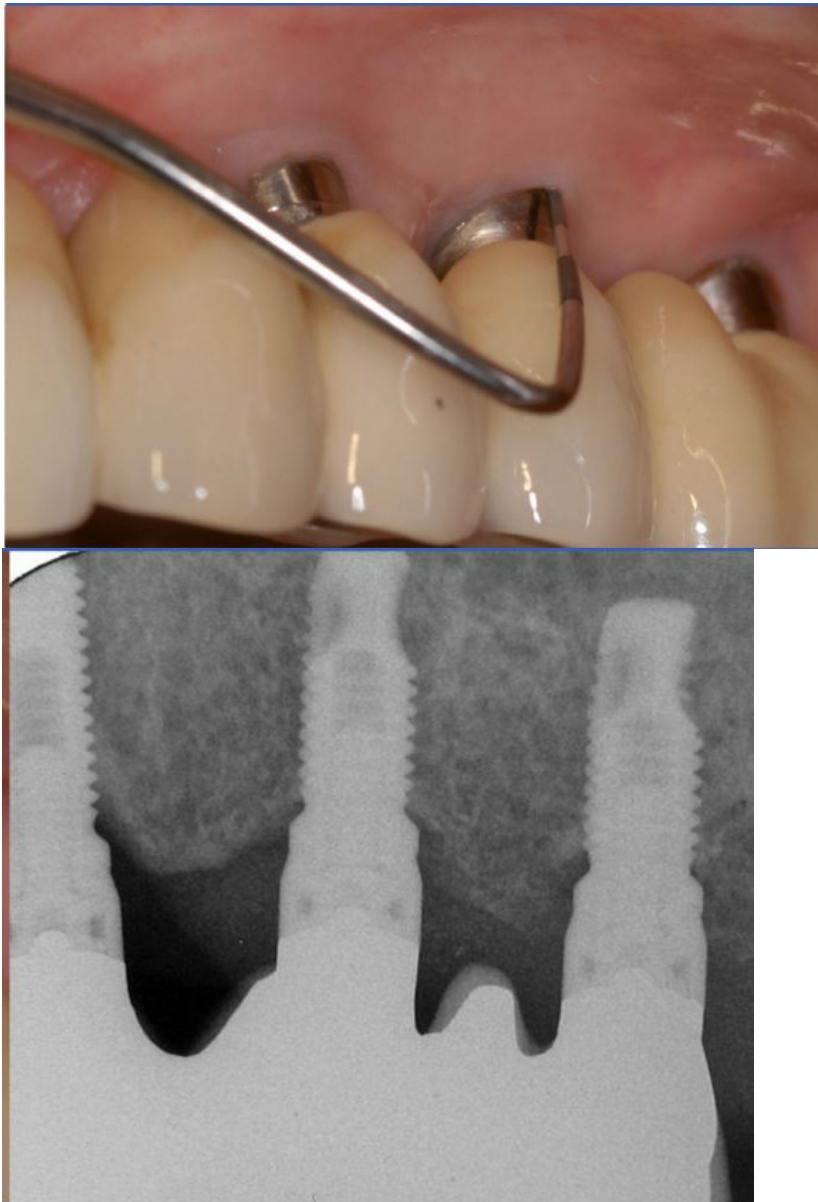


Abb. 2: Periimplantäre Gesundheit

Oben zeigt eine gesunde periimplantäre Situation, welche sich durch die Abwesenheit klinischer Entzündungszeichen kennzeichnet. Darunter ist das korrespondierende Röntgenbild abgebildet.

Abbildung aus (Berglundh 2019); mit freundlicher Genehmigung von Prof. Berglundh und der European Federation of Periodontology

1.1.2 Periimplantitis

In der seit 2018 geltenden Klassifikation der Parodontalerkrankungen wurden Implantate und deren umliegendes Gewebe erstmals schematisch aufgearbeitet und mit in ein Klassifikationssystem aufgenommen (Abb. 3). Dabei wurden folgende Kategorien im Konsensus definiert: ‚Periimplantäre Gesundheit‘, ‚Periimplantäre Mukositis‘, ‚Periimplantitis‘ und ‚Periimplantäre Weich- und Hartgewebsdefekte‘ (J, Armitage et al. 2018).

Die Periimplantitis (PI, Abb. 4) ist eine Plaque-assoziierte chronische inflammatorische Erkrankung, welche das Gewebe um dentale Implantate betrifft und nach einer vorherigen erfolgreichen Osseointegration auftritt (Berglundh, Armitage et al. 2018). Sie kennzeichnet sich durch irreversiblen Verlust des Implantat-stützenden Gewebes, insbesondere des alveolären Knochens. Schlussendlich - ohne erfolgreiche Therapie - führt die PI zu dem Verlust des dentalen Implantates (Lindhe, Meyle et al. 2008). In klinischen Situationen sind klassische Entzündungszeichen wie Blutung bei Sondierung (Bleeding on Probing, BoP), Suppuration, erhöhte PD und/oder Rezessionen sowie radiologischer Knochenverlust zu verzeichnen (Berglundh 2019).

Ihr voran geht die periimplantäre Mukositis (Abb. 5) – eine reversible Entzündung des Weichgewebes um das Implantat ohne Attachmentverlust (Berglundh, Armitage et al. 2018). Ein weiteres – insbesondere diagnostisch relevantes – Kennzeichen ist das Vorhandensein der BoP. Die Entzündung bei einer periimplantären Mukositis begrenzt sich dabei auf den Bereich des Saumepithels; bei der PI dagegen extendiert die Entzündung apikal über das Saumepithel hinaus ins Bindegewebe und knöchernes Attachment (Berglundh 2019).

Die Prävalenz der periimplantären Mukositis liegt dabei bei knapp 45% der Implantate. Bei bis zu 22% gehen diese inflammatorischen Prozesse bereits mit irreversibler Schädigung einher und leiden demnach unter einer PI (Derks and Tomasi 2015). Schlussendlich ist die Frage der Ätiologie und der pathophysiologischen Prozesse ursächlich für die Ausbildung einer PI noch nicht vollends geklärt (Heitz-Mayfield and Lang 2010).

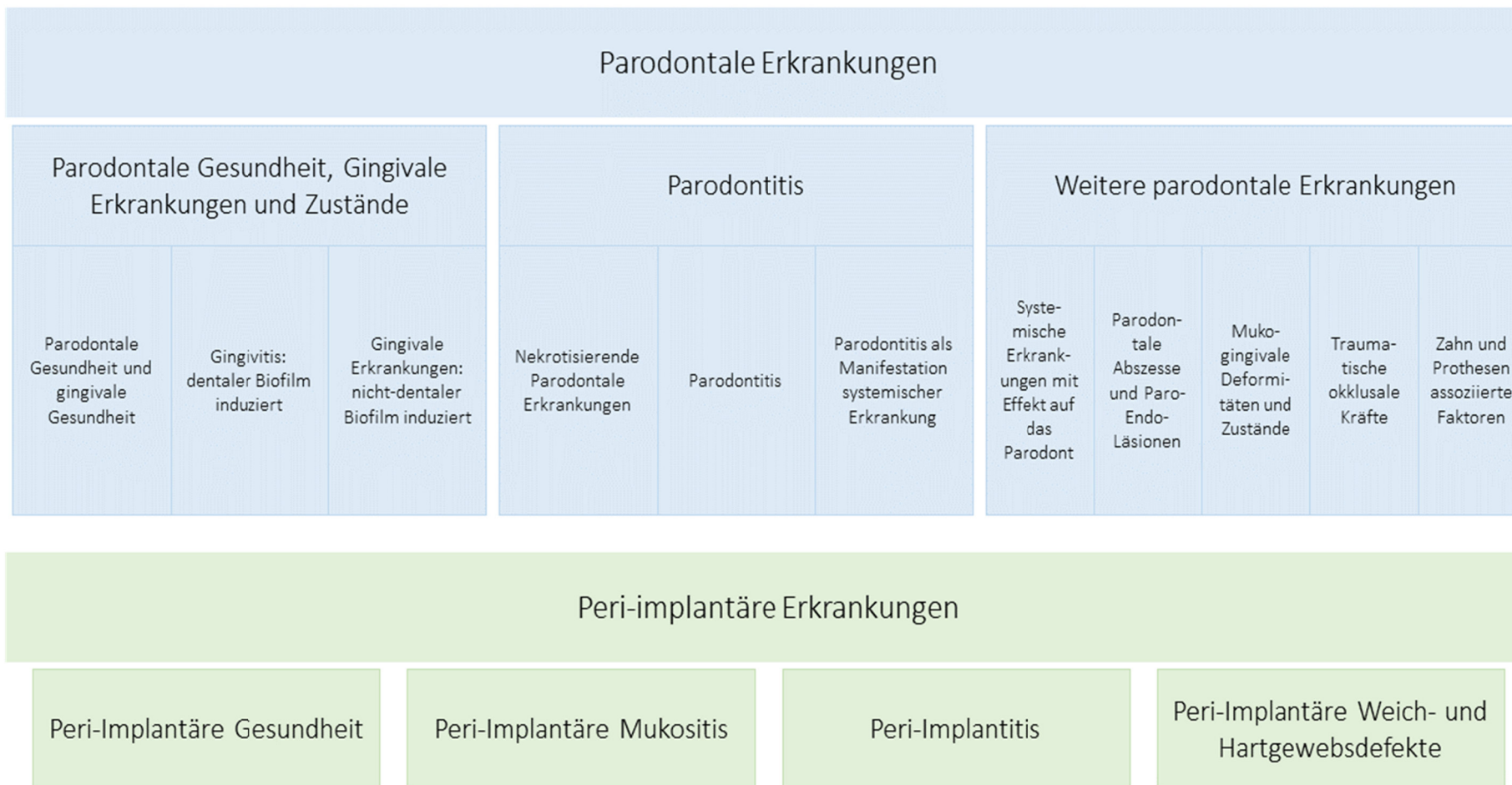


Abb. 3: Klassifikation der parodontalen und periimplantären Erkrankungen

Übersicht der seit 2018 geltenden neuen Klassifikation parodontaler und peri-implantärer Erkrankungen, die erstmals auch periimplantäre Situationen einschließt.

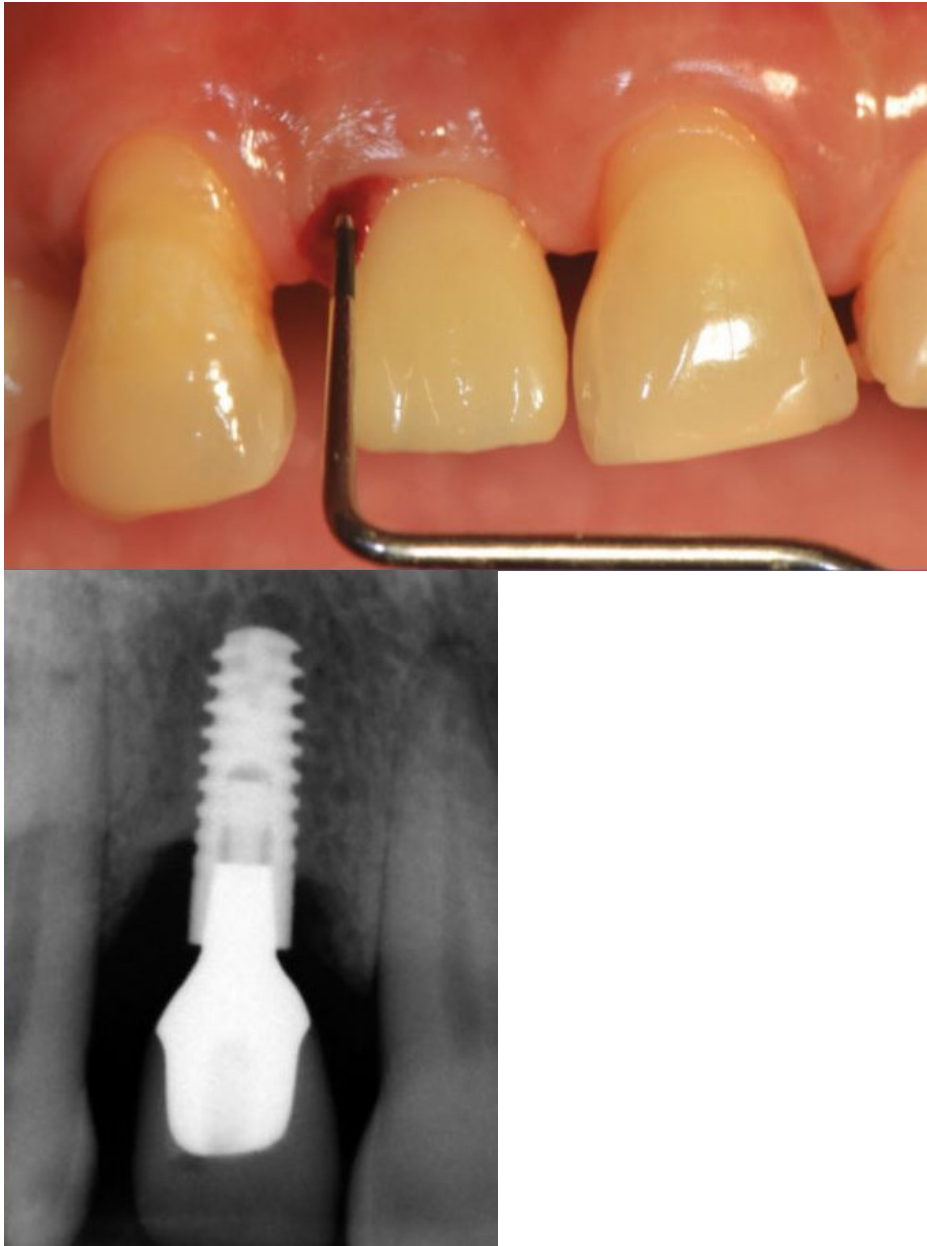


Abb. 4: Periimplantitis

Oben: Klinische Darstellung einer Periimplantitis; deutlich gekennzeichnet durch die Blutung auf Sondierung als klassisches Entzündungszeichen und (unten: korrespondierendes Röntgenbild) knöchernem Attachmentverlust.

Abbildung aus (Berglundh 2019); mit freundlicher Genehmigung von Prof. Berglundh und der European Federation of Periodontology

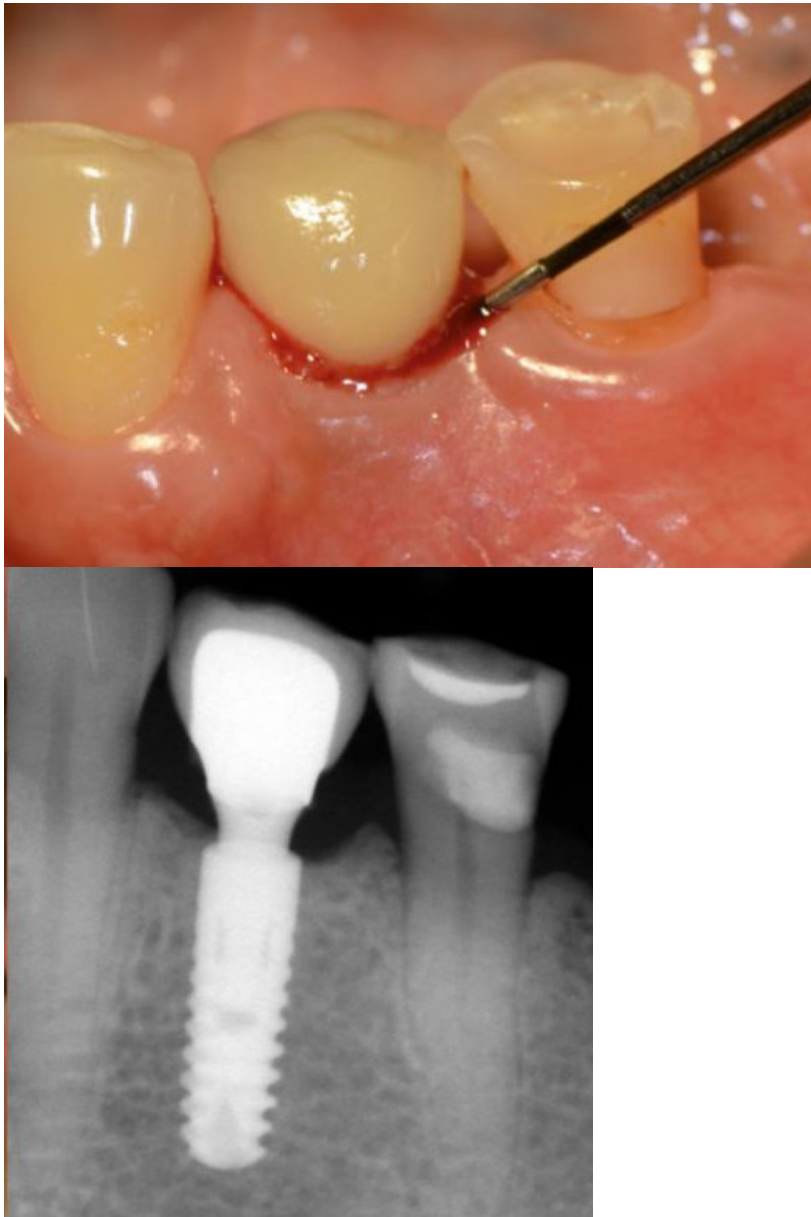


Abb. 5: Periimplantäre Mukositis

Klinisches Erscheinungsbild (oben) einer periimplantären Mukositis, die wie bei der PI typische Entzündungszeichen wie BoP aufweist, sich jedoch durch die Abwesenheit röntgenlogischen Knochenverlustes (siehe unten: korrespondierendes Röntgenbild) deutlich von der PI abgrenzt. Abbildung aus (Berglundh 2019); mit freundlicher Genehmigung von Prof. Berglundh und der European Federation of Periodontology

1.1.3 Periimplantitis versus Parodontitis

Die Parodontitis (PERIO) wird als das Gegenstück der PI am Zahn dargestellt. Sie definiert sich als bakterielle Infektion des Zahnhalteapparates und führt zu knöchernem Attachmentverlust. PERIO und PI kennzeichnen sich durch eine Vielzahl von klinischen Ähnlichkeiten. Beide Erkrankungen resultieren in unwiderrufbarer Destruktion tragenden Gewebes/Parodonts. In fortgeschrittenen Stadien führen die Erkrankungen im schlimmsten Fall zum Verlust des betroffenen Zahnes oder Implantats (Lindhe, Meyle et al. 2008).

Weiter teilen sich beide Erkrankungen dieselben Risikofaktoren: Rauchen, schlechte Mundhygiene und systemische Veranlagungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit an diesen Leiden zu erkranken. All diese Faktoren lassen die Hypothese zu, dass es sich bei der Periimplantitis und Parodontitis um dieselbe Erkrankung handelt (Renvert and Quirynen 2015, Sousa, Mardas et al. 2016, Stacchi, Berton et al. 2016).

Jedoch weisen diese Erkrankungen entscheidende Unterschiede auf. Bereits auf anatomischer Ebene sind Variationen zu erkennen (Abb. 6). Zwar sind korrespondierende Strukturen in beiden Situationen um Zahn und Implantat zu finden – dazu gehören ein Saumepithel und Sulkusepithel. Jedoch werden bei genauerer mikroskopischer Betrachtung relevante Unterschiede deutlich: Der Zahn ist durch kollagene Fasern in dem Zahnfach aufgehängt; das Implantat hingegen steht im direkten Kontakt zum alveolären Knochen. Daraus resultiert, dass die Zahnoberfläche durch zweierlei Gefäßeinströmungen versorgt wird: sowohl aus dem oralen subepitheliale Gewebe, als auch aus dem bindegewebigen Spalt zwischen Zahn und Alveolarknochen. Im Gegensatz dazu ist das periimplantäre Gewebe lediglich auf subepitheliale Versorgung angewiesen (Atsuta, Ayukawa et al. 2016).

Anatomische Gegebenheiten, wie zum Beispiel die Größe der Läsionen, sowie die zelluläre Komposition sind signifikant verschieden (Berglundh, Zitzmann et al. 2011, Carcuac and Berglundh 2014). Insbesondere fällt die Differenz in der Progressionsrate auf. Periimplantitis, im Gegensatz zur Parodontitis, charakterisiert sich durch ein wesentlich schnelleres Voranschreiten der Erkrankung (Salvi, Cosgarea et al. 2017). Auch sind erste Indizien für Unterschiede auf Transkriptom-Ebene der beiden Erkrankungen entdeckt und publiziert worden (Becker, Beck-Broichsitter et al. 2014).

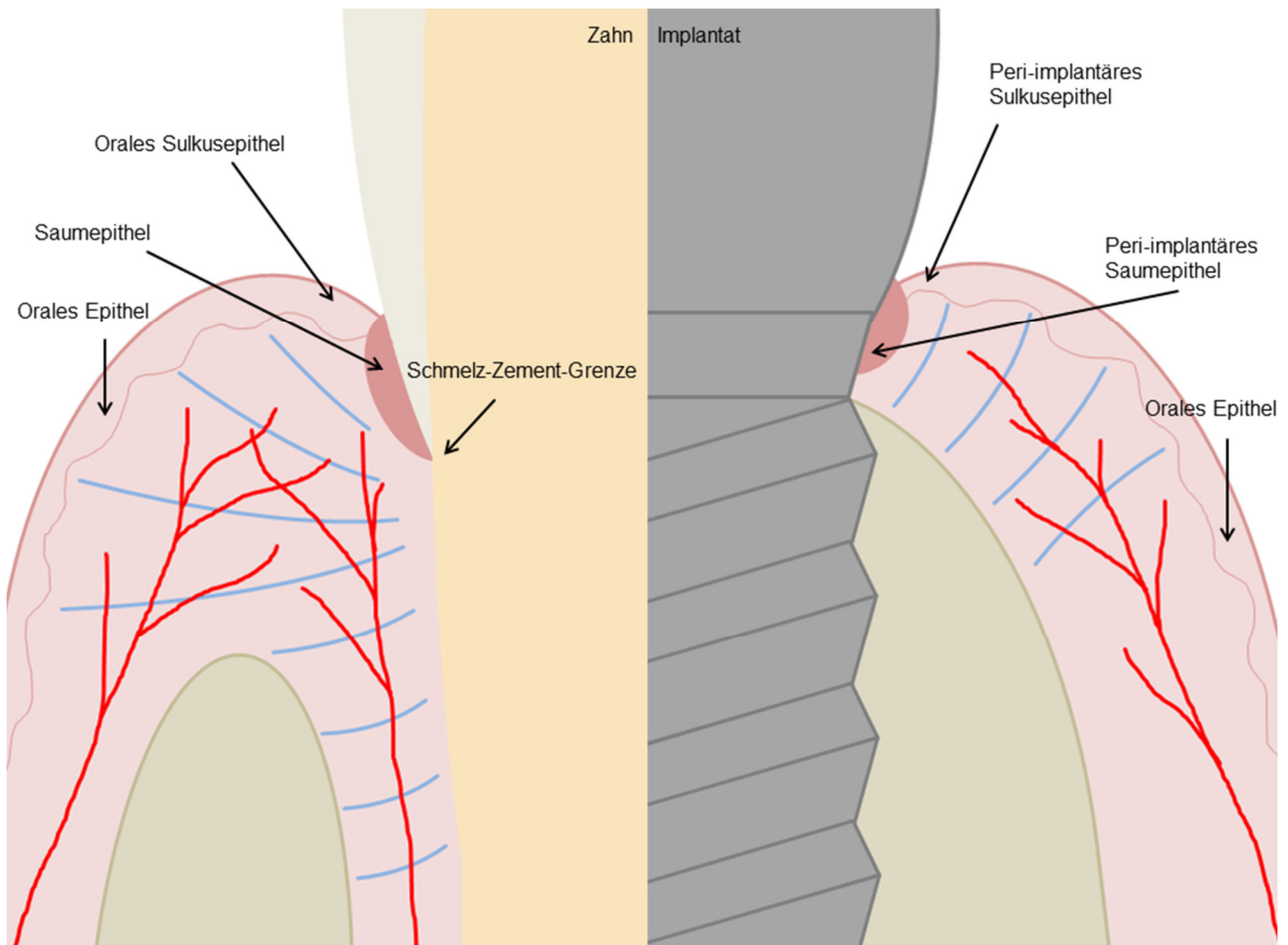


Abb. 6: Schematische Darstellung anatomischer und histologischer Begebenheiten um Zahn und Implantat

Die Umgebung von Zahn (links) zeigt deutliche Unterschiede zur periimplantären Situation (rechts). Kollagene Fasern (blau) stützen den Zahn im Zahnfach und bilden eine Verbindung zwischen Alveolarknochen (grün) und Zahnoberfläche. Das Implantat hingegen steht im direkten Kontakt zum Knochen (grün). Vaskuläre Versorgung (rot) ist folglich vermehrt bei parodontalen Situationen vertreten.

In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Therapiekonzepte für die Beseitigung einer PI entworfen worden, wobei allesamt direkt aus der Parodontitistherapie übertragen oder stark an diese angelehnt wurden (Claffey, Clarke et al. 2008, Renvert, Roos-Jansaker et al. 2008). Jedoch – im Gegensatz zur Therapie der PERIO – stellt sich keine der vorgestellten Therapien als vorhersagbar und effektiv heraus (Renvert, Polyzois et al. 2009, Renvert, Samuelsson et al. 2009, Faggion, Listl et al. 2010, Persson, Samuelsson et al. 2010, Sahrman, Attin et al. 2011).

Bis heute ist unklar, ob es sich bei der PI um eine Unterart und/oder spezielle Erscheinungsform der PERIO handelt, oder ob es zwei voneinander unabhängige eigenständige Erkrankungen sind.

1.2 Das Mikrobiom bei Periimplantitis und Parodontitis

Das Mikrobiom übernimmt sowohl in PERIO als auch in PI die Rolle als Verursacher. In der Lehre hat sich im Bereich der PERIO die Komplextheorie durchgesetzt (Socransky, Haffajee et al. 1998). Hierbei gelten besonders die Bakterienspezies des ‚roten Komplexes‘ als höchst parodontal-pathogen und charakterisieren sich durch Virulenzfaktoren: zu diesen gehören die Bakterienspezies *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*. Des Weiteren unterliegt die PERIO einer Verschiebung der mikrobiologischen Zusammensetzung subgingivaler Plaques (einer sogenannten ‚Dysbiose‘), wobei anaerobe Charaktereigenschaften parallel zum Schweregrad der Erkrankung (bzw. der Läsion) zunehmen. Auch bei der PI wurden eine Vielzahl bekannter parodontal-pathogener Keime nachgewiesen. Insbesondere *F. nucleatum*, *P. intermedia* und *Eubacterium* wurden sowohl in PI- als auch in PERIO-Läsionen gefunden (Koyanagi, Sakamoto et al. 2010, Faveri, Figueiredo et al. 2015). Jedoch lässt sich festhalten, dass laut Literatur das Mikrobiom in PI eine höhere Diversität im Vergleich zu PERIO aufweist (Koyanagi, Sakamoto et al. 2010, Koyanagi, Sakamoto et al. 2013, Lafaurie, Sabogal et al. 2017). Zusammenfassend ist darauf hinzuweisen, dass die Mikrobiome beider Erkrankungen offensichtliche Ähnlichkeiten aufweisen, sind jedoch nicht identisch (Cortelli, Cortelli et al. 2013).

1.3 16s rRNA Sequenzierung

1.3.1 Hochdurchsatzsequenziermethodiken

Die Hochdurchsatzsequenzierverfahren (Next-Generation-Sequencing, NGS) sind eine neue Entwicklung im Bereich des Nachweises bakterieller Probenbestandteile. Dabei löst diese Methodik klassische Herangehensweisen ab, die durch ihre technologischen Limitationen nunmehr als veraltet gelten. Das Bakterienspektrum, welches durch bisherige Ansätze nachgewiesen werden konnte, ist eingeschränkt (Yang, Wang et al. 2016): Bakterienkulturen beschränken sich auf kultivierbare Spezies; oftmals gestaltet sich darüber hinaus die Kultivierung anaerober Keime als kompliziert (Rinke, Schwientek et al. 2013). Dabei spielen anaerobe Keime eine wichtige Rolle in periimplantären und parodontalen Erkrankungen (Socransky, Haffajee et al. 1998). *Filifactor alocis* – eine Spezies, welche einzigartige parodontal- und periimplantär-pathogene Eigenschaften aufweist, konnte nur durch DNA-basierte Techniken nachgewiesen werden (Aruni, Chioma et al. 2014). In den letzten Jahren haben sich meta-genomische Analysen in Form von Hochdurchsatzsequenzierungen durchgesetzt und bisher unbekannte Einblicke in unbeschreiblicher Tiefe ermöglicht – auch im Bereich mikrobieller Studien (Tamaki, Wright et al. 2011). Auch die Untersuchungen von mikrobiellen Proben mittels DNA-Sonden oder rt-PCR (real-time PCR, Polymerase-Ketten-Reaktion) reduzieren sich auf den Nachweis von vorher bekannten und festgelegten Marker-Keimen und finden somit nur noch bedingt Anwendung (Yang, Wang et al. 2016). Dementsprechend haben sich in den letzten Jahren Hochdurchsatzsequenziermethodiken zum Nachweis bakterieller Komponenten durchgesetzt.

1.3.2 Das 16s Gen

Das 16s rRNA (ribosomale Ribonukleinsäure) Gen codiert einen Bestandteil der 30S Untereinheit von prokaryotischen 70S Ribosomen. Es besteht dabei aus neun hypervariablen Regionen, die durch neun robuste Genabschnitte unterbrochen sind (Baker, Smith et al. 2003, Wang and Qian 2009). Durch die Kombination aus robusten Genregionen, die für Primerdesign geeignet sind, und hypervariablen Zonen (V1 – V9), welche eine Identifizierung phylogenetischer Eigenschaften ermöglichen, bildet das 16s rRNA Gen eine zuverlässige Grundlage für die Mikrobiom-Profilierung (Tringe and Hugenholtz 2008). Im Jahre 1985 wurde das 16s rRNA Gen erstmals in der Sequenzierung für phy-

logenetische Analysen verwendet (Lane, Pace et al. 1985). Heute gilt das 16s rRNA Gen, bzw. seine Abschnitte, als zuverlässiger Marker für die taxonomische Klassifizierung und phylogenetische Analysen (Yang, Wang et al. 2016). Die 16s rRNA Sequenzierung hat sich als Goldstandard durchgesetzt und ist eine etablierte Technik zu Identifikation bakterielle Probenkomponenten (Clarridge 2004, Woo, Lau et al. 2008).

1.4 Hypothese und Fragestellung dieser Studie

Aufgrund der bislang ungeklärten Ätiologie der Periimplantitis können die Unterschiede - insbesondere im Hinblick auf die unterschiedlichen Progressionsraten der Erkrankungen - nicht vollends geklärt werden. Da beide Erkrankungen maßgeblich durch das läsionsassoziierte Mikrobiom beeinflusst werden, könnten Unterschiede in diesen die oben genannten Differenzen schlüssig begründen. Des Weiteren könnten Periimplantitis-Läsionen bestimmten Schweregrades spezifische mikrobielle Signaturen aufweisen, welche die signifikant erhöhte Progressionsrate erklären. Nach jetziger Kenntnis haben bisher keine Studien den Zusammenhang von Schweregrad der PI und mikrobieller Zusammensetzung submuköser Plaque untersucht. Es existieren ausschließlich Arbeiten, die sich auf den Vergleich gesunder und erkrankter periimplantärer Proben konzentrieren (Koyanagi, Sakamoto et al. 2010, Kumar, Mason et al. 2012, Tamura, Ochi et al. 2013, Maruyama, Maruyama et al. 2014, Zheng, Xu et al. 2015, Shiba, Watanabe et al. 2016, Apatzidou, Lappin et al. 2017, Sanz-Martin, Doolittle-Hall et al. 2017, Al-Ahmad, Muzafferiy et al. 2018). Im Gegensatz zu den oben genannten Studien berücksichtigt und adressiert diese Arbeit best-möglichst folgende potentielle Störgrößen: Genderverteilung, allgemeiner Gesundheitsstatus, Raucherstatus und vorangegangene Therapien. Diese Faktoren wurden in den anderen oben genannten Studien nicht einkalkuliert. Dies erschwert die Rückschlüsse, die durch diese Arbeiten gezogen werden können - insbesondere im Hinblick auf mikrobielle Besonderheiten in Abhängigkeit von dem Schweregrad der PI-Erkrankung.

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Charakterisierung des submukösen Mikrobioms der PI auf verschiedenen Ebenen der Erkrankungsschwere. Um dies zu realisieren wurde eine 16s rRNA Hochdurchsatzsequenzierung und deren Datenanalyse durchgeführt. Dabei wurden Proben von systemisch gesunden Nichtrauchern gewählt,

welche mit einer Periimplantitis diagnostiziert wurden und keine Vorbehandlung erhalten hatten.

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit ist dabei ein umfassenderes Verständnis über die Pathobiologie hinter der PI zu erlangen. Dieses Projekt wird Einblicke über die bakterielle Zusammensetzung submukösen Biofilms ermöglichen und Grundlage für die Entwicklung potentieller Ansätze für neue Therapien und/oder diagnostischen Hilfsmitteln sowie der Erarbeitung von Risikoprofilen darbieten.

2. Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

2.1.1 Allgemeines

Die Ethikkommissionen und institutionellen Prüfungsausschüsse aller beteiligten Studienzentren (Universität zu Bonn, Würzburg, Düsseldorf, Tübingen, Jönköping, Schweden) genehmigten vor Beginn der Probandenrekrutierung das Studienprotokoll. Diese Studie wurde entsprechend der Leitlinien des Weltärztebundes ‚Deklaration von Helsinki‘ durchgeführt. Alle Patienten wurden über potentielle Risiken informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Die Patientenrekrutierung fand an den Universitätskliniken Bonn, Würzburg, Tübingen, Düsseldorf und der Zahnklinik Jönköping, Schweden, statt.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Folgende Einschlusskriterien wurden für die Patientenrekrutierung vorausgesetzt:

- Volljährigkeit (≥ 18 Jahre)
- Keine vorausgegangene invasive Therapie in den letzten drei Monaten vor Probenentnahme (Vermeidung von Veränderungen des submukösen Mikrobioms durch submuköse Instrumentierung und Re-Kolonisierung mit variierenden bakteriellen Spezies)
- Keine systemische oder lokale Antibiotikatherapie in den letzten sechs Monaten vor Probenentnahme (Vermeidung von Alteration des submukösen Mikrobioms)
- Keine anti-inflammatorische Medikation in den letzten sechs Monaten vor Probenentnahme (Vermeidung von Alteration des submukösen Mikrobioms)
- Keine systemische Erkrankung, welche eine Diagnose ‚Parodontitis als Manifestation einer systemischen Erkrankung‘ (J, Armitage et al. 2018) zulässt
- Kein diagnostizierter Diabetes Mellitus
- Keine Schwangerschaft und nicht in Stillzeit

- Keine Raucher, oder Tabak-Alternativ-Medikation in den letzten sechs Monaten vor Probenentnahme

Proben-spezifische Einschlusskriterien umfasste folgende Punkte:

- PI-Läsionen, welche sich für das C.I.S.T. Therapie Schema D (Lang, Wilson et al. 2000) qualifizieren:
 - Sondierungstiefen (PD) ≥ 5 mm
 - positives Zeichen bei Blutung auf Sondierung (positive bleeding on probing, BoP+)
 - röntgenologischer Knochenverlust ≥ 3 mm

Zunächst wurden alle Probanden einer vollständigen parodontalen Kontrolle unterzogen.

2.1.3 Dokumentierte Parameter

Folgende Patienten-spezifische Parameter wurden dokumentiert:

- Einwilligungserklärung
- Datum der Probenentnahme
- Ethnizität
- Alter
- Systemische Erkrankungen
- Medikation
- Raucherstatus
- Anzahl vorhandener Zähne
- Anzahl vorhandener Implantate
- Parodontalstatus (Parodontitis ja/nein, Sondierungstiefen)
- Blutungs- und Suppurationsstatus

Folgende Proben-spezifische Parameter wurden registriert:

- Betroffene Position nach FDI-Schema
- Probenröhrchenlabel
- Implantatcharakteristika (Typ, Hersteller, Modell, Oberflächenbeschaffenheit, Durchmesser in mm, Länge in mm)
- Breite der keratinisierten Gingiva (oral und buccal in mm)
- Röntgenologischer Knochenverlust
- Sondierungstiefen (sechs Messstellen: mesio-buccal, buccal, disto-buccal, disto-oral, oral und mesio-oral); maximale Sondierungstiefe (PD) dieser Werte wurde je Probe dokumentiert
- Art des prothetischen Ersatzes

2.2 Probengewinnung und -aufbereitung

Submuköse Plaque-Proben wurden an allen in die Studie eingeschlossenen Läsionen nach supragingivaler Reinigung entnommen. Dabei wurden sterile Papierspitzen in den periimplantären Sulkus (mesial, distal, buccal, lingual/palatinal je eine Papierspitze) gelegt und gemeinsam in Probenröhrchen verwahrt (siehe Abb. 7) (Jervoe-Storm, Alahdab et al. 2007). Die Proben wurden unmittelbar nach Entnahme bei -20°C oder -80°C gelagert. Die DNA wurde mittels Zentrifugensäulen (spin columns, Sigma- Aldrich GenElute Bacterial Genomic DNA Kit, Sigma- Aldrich, Munich, Germany) extrahiert und aufbereitet. Die DNA-Qualität und Quantität wurde durch spektrophotometrische Untersuchungen mittels eines NanoDrop Spektrometers durchgeführt.



Abb. 7: Beispiel der Probenröhrchen für die Plaque-Proben

Oben: Sterile Papierspitzen, welche in den periimplantären Sulkus eingelegt wurden um submuköse Plaque zu gewinnen.

Unten: Probenröhrchen zur Lagerung der Proben.

2.3 16s rRNA Sequenzierung und Datenaufbereitung

2.3.1 ‚Paired-End‘-Hochdurchsatz-Sequenzierung der V3-V4 Region des 16s rRNA Genes

Als Verfahren wurde eine 2x300 bp (base pair, Basenpaare) ‚Paired-End‘-Sequenzierung der hypervariablen V3-V4 Region des 16s rRNA Genes auf der Illumina MiSeq Plattform (Illumina, San Diego, California, USA) gewählt (Caporaso, Lauber et al. 2011). Das ‚Paired-End‘-Verfahren ermöglicht dabei die Sequenzierung beider Enden einzelner Probenfragmente. Zum einen liefert dieser Ansatz die doppelte Anzahl an Sequenzierungs-Reads in gleicher Zeit und im selber Aufwand im Vergleich zur ‚Single-End‘-Sequenzierung. Zum anderen können auf diese Weise PCR-Duplikate – Artefakte, welche im Laufe der Sequenzierung auftreten – entfernt werden (Nakazato, Ohta et al. 2013). Diese Methodik zeichnet sich aufgrund der überlegenen Sequenzierungstiefe und –breite aus (Nakazato, Ohta et al. 2013, Frey, Herrera-Galeano et al. 2014, Nelson, Morrison et al. 2014).

Der Illumina NGS-Sequenzierungsablauf sieht folgende Punkte vor:

1. Herstellung der Sequenzierbibliothek (Abb. 8)

Die Sequenzierbibliothek wurde gemäß dem Herstellerprotokoll ‚Illumina 16s rRNA Sequencing library preparation guide‘ (Illumina, 2013) angelegt und folgende Reagenzien verwendet: Nextera XT Index Kit (Illumina), PhiX Control Kit (Illumina), und MiSeq V3 reagent kit (Illumina).

2. Cluster Amplifikation (Abb. 9)

Daraufhin wurde eine Brücken-Amplifikation mittels KAPA HiFi Hotstart ReadyMix (KAPABIOSYSTEMS, Boston, Massachusetts, USA) und den V3-V4 spezifischen Primer-Paar

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG 5’-

und

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGG- 5’-

TATCTAATCC durchgeführt (Klindworth, Priesse et al. 2013).

3. Sequenzierung (Abb. 10)

Die Sequenzierung selbst wurde gemäß Herstelleranweisung ausgeführt. Sie erfolgt auf Grundlage einer ‚Sequencing by synthesis‘ verwandten PCR. Dabei werden in Echtzeit die eingebauten fluoreszierenden Nukleotide bestimmt und dokumentiert. Insgesamt wurden 300 Sequenzierzyklen – daher 300 bp Readlänge - durchlaufen. Die durchschnittliche Anzahl von sequenzierten DNA-Abschnitten pro Probe lag bei $109,945 \pm 35,169$.

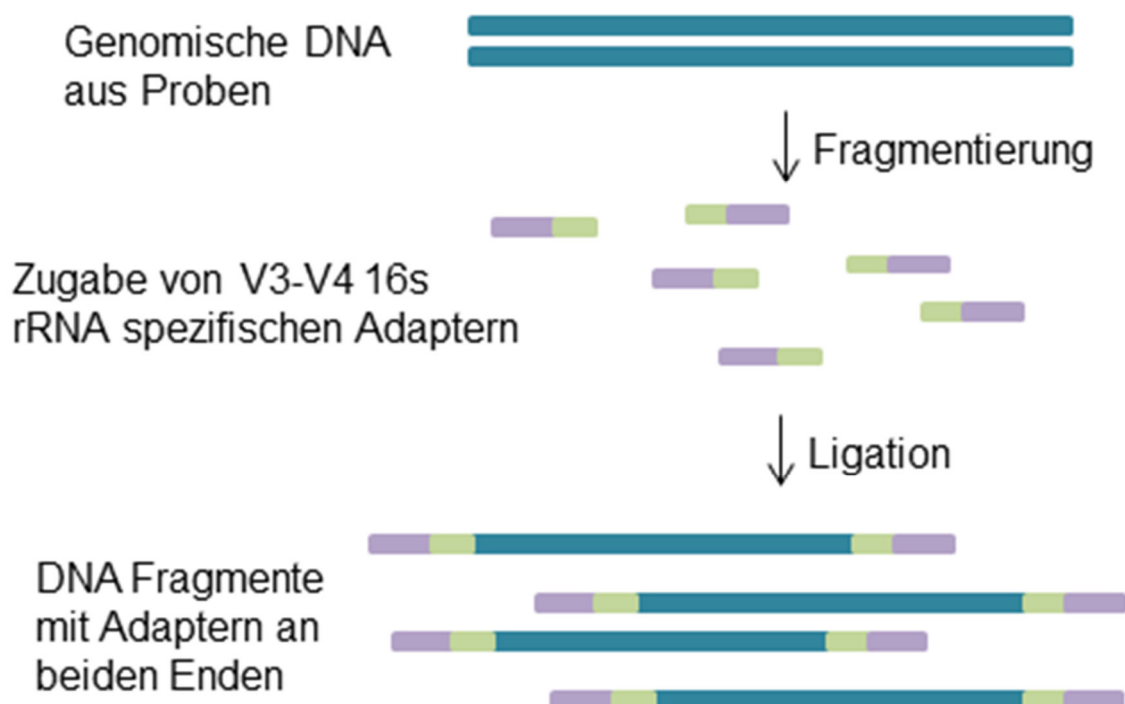


Abb. 8: Herstellung der Sequenzierungsbibliothek

Erster Schritt der Illumina NGS-Sequenzierung bildet die Synthese der Probenbibliothek. Genomische DNA, welche in vorherigen Schritten nach Protokoll aus den Plaqueproben gewonnen wurde, wird fragmentiert. Nach Zugabe V3-V4 spezifischer Primer, Flow-Cell spezifischer Adapter und probenspezifischer Indizes folgt die Ligation dieser an die DNA Fragmente.

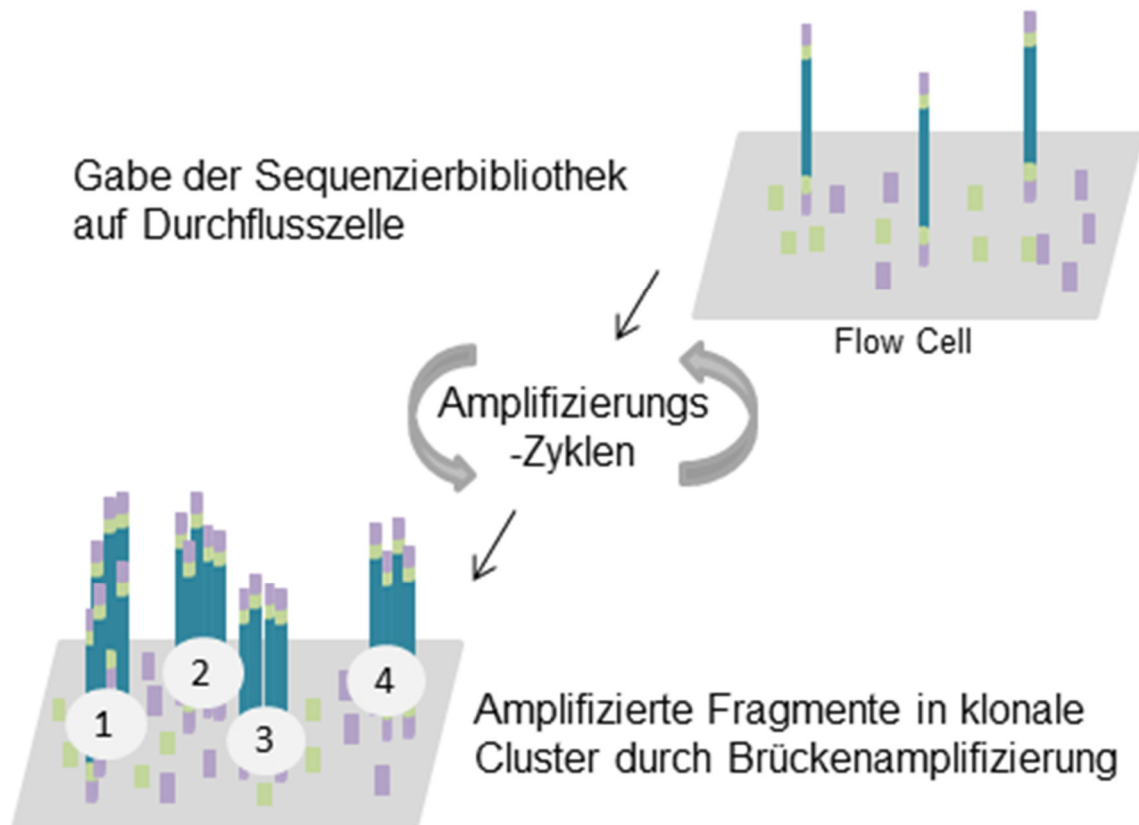


Abb. 9: Cluster Amplifikation

Nach Aufbringen der Proben auf die Durchflusszelle erfolgt das Binden der Fragmente an diese durch Hybridisierung. Durch Brückenamplifikation bilden sich Cluster mit angereicherter DNA gleicher Sequenz (siehe oben: Cluster ein bis vier).

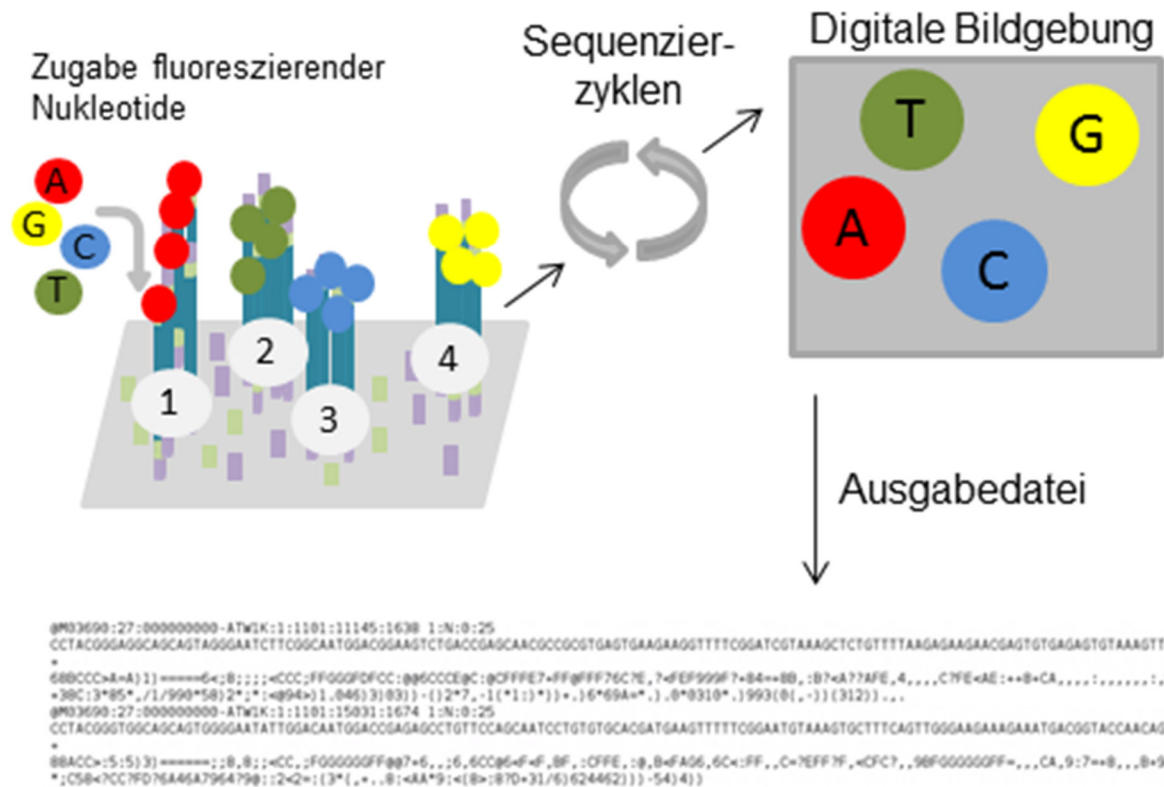


Abb. 10: Sequenzierung

Auf die Durchflusszelle werden fluoreszierende Nukleotide gegeben. Im Zuge der Sequenzierungszyklen werden in Echtzeit die gebundenen Nukleotide mittels Wellenlängenbestimmung identifiziert. Diese Daten werden gespeichert und sind im Nachhinein durch die Ausgabedatei zugänglich.

2.3.2 Post-Sequenzierungs-Prozesse

FastQC wurde genutzt um die Qualität der gewonnenen Abschnitte zu prüfen (Andrews 2010). Daraufhin folgte die Datenaufbereitung mittels der bioinformatischen Pipeline ‚QIIME‘ (Caporaso, Kuczynski et al. 2010). QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, Quantitative Einblicke in die mikrobielle Ökologie) wurde entworfen, um die Auswertung roher Sequenzierdaten - insbesondere der Illumina Plattform - zu analysieren und visualisieren. QIIME ist eine Open-Source-Software und wurde in diesem Falle auf einer CentOS Linux Distribution installiert. Der Hauptteil der Skripte, die per QIIME anwählbar sind, basieren auf der Programmiersprache Python (Version: 2.7.15).

Folgende Abhängigkeiten wurden in einer virtuellen Software-Umgebung installiert:

#Dependency versions

```
# QIIME library version: 1.9.1
# QIIME script version: 1.9.1
# qiime-default-reference version: 0.1.3
# NumPy version: 1.10.4
# SciPy version: 0.17.1
# pandas version: 0.23.1
# matplotlib version: 1.4.3
# biom-format version: 2.1.6
# h5py version: 2.8.0 (HDF5 version: 1.10.2)
# qcli version: 0.1.1
# pyqi version: 0.3.2
# scikit-bio version: 0.2.3
# PyNAST version: 1.2.2
```

```
# Emperor version: 0.9.51
# burrito version: 0.9.1
# burrito-fillings version: 0.1.1
# sortmerna version: SortMeRNA version 2.0, 29/11/2014
# sumaclust version: SUMACLUSt Version 1.0.00
# swarm version: Swarm 1.2.19 [Mar 1 2016 23:41:10]
# gdata: Installed.
```

Folgende QIIME Konfiguration wurde gewählt:

#QIIME config values

```
# blastmat_dir: None
# pick_otus_reference_seqs_fp:
  /home/annika/new16s/HOMD/homdref/pick_otu_ref_seq2/HOMD_16S_rRNA_Ref
  Seq_V15.1.fasta
# sc_queue: all.q
# topiaryexplorer_project_dir: None
# pynast_template_alignment_fp:
  /home/annika/new16s/HOMD/homdref/pynast_templ2/HOMD_16S_rRNA_RefSe
  q_V15.1.aligned.fasta
# cluster_jobs_fp: start_parallel_jobs.py
# pynast_template_alignment_blastdb: None
# assign_taxonomy_reference_seqs_fp:
  /home/annika/new16s/HOMD/homdref/ass_tax_ref_seq2/HOMD_16S_rRNA_Ref
  Seq_V15.1.fasta
# torque_queue: friendlyq
```

```

# jobs_to_start: 1

# slurm_time: None

# denoiser_min_per_core: 50

# assign_taxonomy_id_to_taxonomy_fp:
/home/annika/new16s/HOMD/homdref/taxid_to_tax2/HOMD_16S_rRNA_RefSeq
_V15.1.qiime.taxonomy.txt

# temp_dir: /tmp/

# slurm_memory: None

# slurm_queue: None

# blastall_fp: blastall

# seconds_to_sleep: 1

```

Erster Schritt umfasst das Vereinigen der korrespondierenden ‚Paired-End‘-Sequenzen nach dem ‚fastq-join‘-Verfahren (Aronesty 2011):

```

> multiple_join_paired_ends.py -i /dir/ -o /dir/ --read1_indicator def:_R1_ --
read2_indicator def:_R1_ --include_input_dir_path --remove_filepath_in_name

```

Das Demultiplexing, welches danach folgt, dient dem Entfernen von Primer- und Proben-Index-Rückständen. Diese müssen vor der Sequenzanalyse entfernt werden, da sie vorher im Schritt der Probenbibliotheken-Synthese (siehe Abb. 8) dazugegeben wurden und nicht Bestandteil der originalen Probe sind. Im selben Schritt erfolgt ebenso eine Qualitätsfilterung. Die Sequenzierabschnitte, die den Schwellenwert von Phred > 19 nicht erreichen, werden dabei ausgeschlossen. Ein Phred-Qualitätswert von 20 und mehr, bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, dass die richtige Base identifiziert wurde, bei mindestens 99% liegt (Ewing and Green 1998, Ewing, Hillier et al. 1998).

```

> multiple_split_libraries_fastq.py -i /home/dir/join/ -o /dir/ -p /dir/parameter.txt

```

Anschließend wurde die ‚open-reference-picking‘-Methode gewählt. Sequenzen mit einem Ähnlichkeitswert von 97% oder mehr wurden zu einer OTU (operational taxonomic

unit, operative taxonomische Einheit) gruppiert. Eine repräsentative Sequenz wurde gewählt, die taxonomische Einteilung mittels RDP classifier v2.2 (Wang, Garrity et al. 2007) durchgeführt. Die Zuordnung zur Referenzdatenbank Human Oral Microbiome Database v15.1 (Chen, Yu et al. 2010) wurde mit Hilfe von PyNAST (Caporaso, Bittinger et al. 2010) realisiert.

```
> pick_open_reference_otus.py -i /dir/seqs.fna -o /dir/otu/ -a --jobs_to_start 10 -f
```

Danach erfolgt die Zusammenführung der Datensätze auf verschiedene taxonomische Untergruppen: Spezies-, Genus- und Phylum-Level wurden in dieser Arbeit gewählt:

```
> summarize_taxa.py -i /dir/otu/otu_table_mc2_w_tax.biom -v -a -m /dir/map.txt -o /dir/ -L 2,6,7
```

OTU-Datensätze wurden durch das DESeq2 Vorgehen (Love, Huber et al. 2014, McMurdie and Holmes 2014) normalisiert.

```
> normalize_table.py -i /dir/.biom -o biom -a DESeq2
```

Whole tree PD (Moritz and Faith 1998) wurde als Maß der Alpha-Diversität gewählt und durch QIIME ermittelt. Ebenso wurde QIIME für die Ermittlung der Beta-Diversität durch unweighted UniFrac (Lozupone and Knight 2005) genutzt.

```
> alpha_diversity.py -i /dir/ -o /dir/ -m PD_whole_tre
```

```
> core_diversity_analyses.py -i biom -o /dir/ -m /dir/map.txt -e 000 -a -O 6 -t /dir/tree.tre -c categories
```

2.4 Statistische Analyse

2.4.1 Assoziation mit PD

Der Zusammenhang von PD und der Häufigkeit einer OTU wurde durch Regressionsanalysen linear gemischter Modelle adressiert und mit Hilfe der Pakete lme4 (Bates, Mächler et al. 2015) und lmerTest (Kuznetsova, Brockhoff et al. 2017) in R (Team 2008) ermittelt und auf Signifikanz geprüft. Der Patient wurde als zufälliger Effekt in die Analyse miteinbezogen um interpersonelle Korrelationen zu berücksichtigen. Des Weiteren wurden das Geschlecht und das Alter als fixe Faktoren im Modell integriert.

Das Regressionsmodell lautet somit:

Normalisierte Bakterienzahl ~ PDmax + Geschlecht + Alter + (1|Patient)

Alle Ergebnisse wurden einer FDR Korrektur (Benjamini, Drai et al. 2001) unterzogen um multiples Testen und die daraus resultierender Alpha-Fehler-Kumulierung zu berücksichtigen.

```
> fdrcorr <- p.adjust(data[,5],method="fdr")
```

```
> totalcorr <- cbind(data, fdrcorr)
```

2.4.2 Netzwerkanalyse

Taxa, welche durch oben genannte Analyse signifikante Assoziationen mit Sondierungstiefe aufwiesen, wurden in der Netzwerkanalyse berücksichtigt. Das gehäufte gemeinsame Auftreten von Taxa (Co-Existenz, co-occurrence) und/oder der Ausschluss der Co-Existenz von Taxa (Co-Exklusion, co-exclusion) wurde mittels Renormalisierung und Permutation durch Nutzung des R-Paketes *ccepe* v1.10.0 (Schwager and Bielski in progress) verwirklicht.

Zunächst werden alle R-Pakete und Abhängigkeiten in R-Studio geladen:

```
> library(ccrepe)
```

```
> library(Biobase)
```

```
> library(reshape2)
```

```
> library(dplyr)
```

Daraufhin erfolgt die Normalisierung der bakteriellen Count-Datensätze dieser Studie. Die Art der Normalisierung ist durch die *ccepe*-Nutzung festgelegt:

```
> data.rowsum <- apply(data,1,sum)
```

```
> data.norm <- data/data.rowsum
```

Danach erfolgt die eigentliche Netzwerkanalyse durch die Ermittlung des *nc.scores*, welches eine Erweiterung des Checkerboard-Wertes als Ähnlichkeits-Maß ist. Durch

den Bezug des nc.scores auf ordinale Daten ist dieser besser für die Analyse von Zusammensetzungen des Mikrobioms und die Relationen dessen Bestandteile geeignet (Schwager and Bielski in progress).

```
> ccrepe.results <- ccrepe(x = testdata, sim.score = nc.score, min.subj = 10, iterations = 1000, verbose = TRUE)
```

Die Datenmatrizen dieser Analyse werden anschließend für die Bildung der Adjazenzliste genutzt. Diese wiederum wird zur Visualisierung und Filterung in Cytoscape (Shannon, Markiel et al. 2003) geladen.

2.4.3 Mikrobieller Dysbiose Index

Um die Dysbiose in den submukösen Biofilmen jeder Probe zu ermitteln wurde der Mikrobielle Dysbiose Index MDI (Microbial Dysbiosis Index (Gevers, Kugathasan et al. 2014)) verwendet. Dieser wird wie folgt ermittelt:

$$MDI = \log \left(\frac{\text{Summe der Häufigkeit mit PDmax positiv assoziierter OTUs}}{\text{Summe der Häufigkeit mit PDmax negativ assoziierter OTUs}} \right)$$

Die potentielle Assoziation von MDI und PDmax wurde – parallel zu oben genanntem Ansatz – durch Regressionsanalysen mit linear gemischten Modellen durchgeführt, welche für Alter, Gender und Korrelation innerhalb des Subjekts korrigierten.

Das Regressionsmodell, welches verwendet wurde, lautet:

$$MDI \sim PDmax + \text{Geschlecht} + \text{Alter} + (1|Patienten)$$

2.4.4 Signifikante Unterschiede der bakteriellen Charakteristika

Die statistische Analyse bezüglich der Charakteristika des Mikrobioms tiefer und flacher periimplantärer Taschen wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests (Chernoff and Lehmann 1954) adressiert.

3. Ergebnisse

3.1 Studienpopulation (Tab. 1)

Insgesamt wurden 45 Proben submukösem Plaques von 30 Probanden in die Studie eingeschlossen. 70 % der Patienten waren weiblich; das Durchschnittsalter lag bei $64,7 \pm 11,5$ Jahren. Im Durchschnitt waren $15,85 \pm 8,04$ Zähne und $3,46 \pm 1,61$ Implantate vorhanden. Die durchschnittliche maximale PD lag bei $8,00 \pm 2,04$ mm. Alle Implantate bluteten beim Sondieren, Pus wurde bei 73% der Proben beobachtet.

3.2 Struktur und Diversität der Bakteriengemeinschaft

Alle Proben wiesen eine ausreichende DNA-Qualität und -Quantität auf, um weiterführende Analysen durchzuführen. Insgesamt konnten die OTUs in 14 Phyla, 169 Genera und 337 Spezies zusammengefasst werden.

3.3 Dysbiose

MDI weist eine höchst signifikante positive Assoziation ($p = 1,32 \times 10^{-7}$) mit steigender PDmax auf (Abb. 11).

Tab. 1: Übersicht der Studienpopulation

Populationsspezifische Charakteristika	
Kohortengröße	30 Patienten
Weiblich	70 % (21 Patienten)
Männlich	30 % (9 Patienten)
Alter (Durchschnitt, Standardabweichung (SD))	64,7 ± 11,5 Jahre (von 32 bis 82 Jahre)
Anzahl Zähne pro Patient (Durchschnitt, SD)	15,85 ± 8,04 (von 0 bis 27 Zähne)
Anzahl Zähne pro Patient (Durchschnitt, SD)	3,46 ± 1,6 (von 1 bis ≥ 8 Implantate)
Probenspezifische Charakteristika	<p>45 mit Periimplantitis diagnostizierte Implantate</p> <p>Inklusionskriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Implantate: Indikation für CIST (Lang et al., 2000) Therapie Schema D • PD ≥ 5 mm • BoP + • Knochenverlust (röntgenologisch) ≥ 3 mm
PDmax (Durchschnitt, SD)	8,00 ± 2,04 mm (von 5 mm bis 11 mm)
Suppuration	Bei 73 % der Probenstellen beobachtet

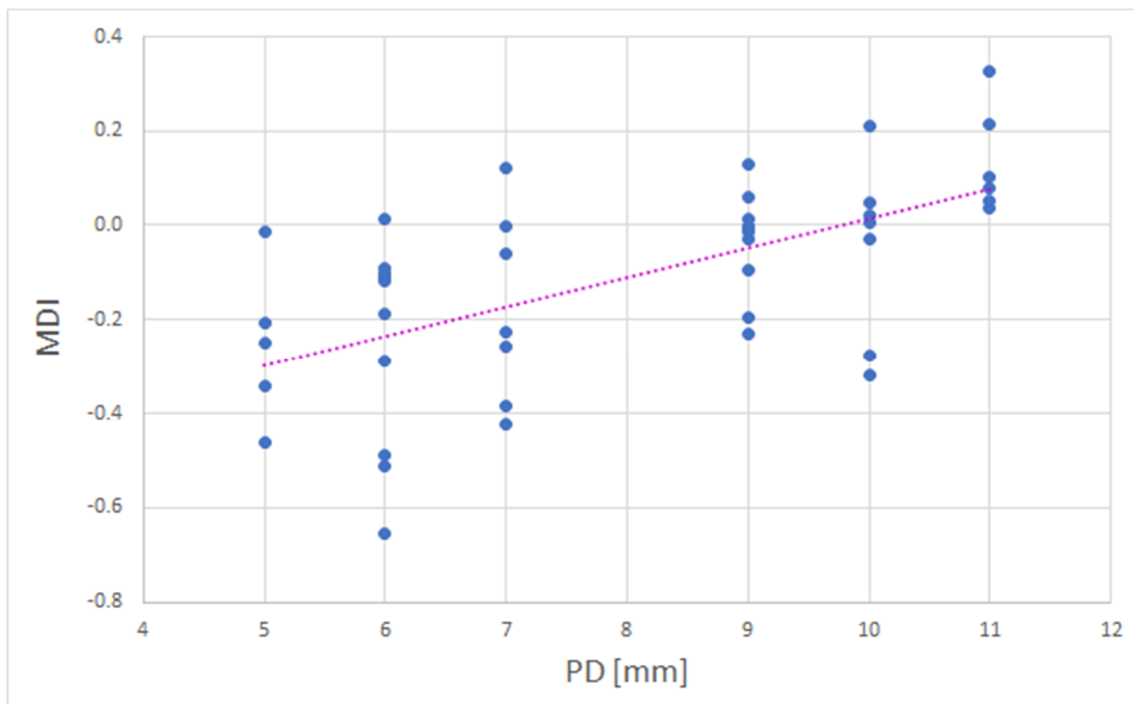


Abb. 11: MDI je Probe gegen Sondierungstiefe graphisch dargestellt

Die Dysbiose steigt signifikant mit höherer Sondierungstiefe (siehe Annäherungslinie, $p = 1,32 \times 10^{-7}$). Dies deutet auf eine Häufung von Taxa, die positive mit erhöhter Erkrankungsschwere assoziiert sind, während Taxa, welche mit frühen Erkrankungsstadien assoziiert sind, weniger häufig vorhanden sind. Abbildung aus (Kroger, Hulsmann et al. 2018); mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc.

3.4 Charakteristika des Mikrobioms in Relation zum Erkrankungsschweregrad

Um Assoziationen zwischen Verschiebungen in der mikrobiellen Zusammensetzung sub-mukösem Biofilms und PDmax nachzuweisen wurden Regressionsanalysen mit linearen gemischten Modellen durchgeführt. Dafür wurden normalisierte relative Häufigkeiten der Phylotypen auf Spezieslevel verwendet. Insgesamt wurden 28 signifikant differenziell assoziierte Taxa gefunden, nachdem für Geschlecht, Alter und multiples Testen an einem Testsubjekt korrigiert wurde. *Eubacteriaceae* [XV], *Fretibacterium* sp. HMT 362, *Fretibacterium fastidiosum*, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-6], *Alloprevotella* sp. HMT 473, *Fastidiosipila sanguinis*, *Filifactor alocis*, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4], *Bacteriodetes* [G-3] bacterium HMT 365, *Treponema parvum*, *Clostridiales* [F-1][G-1] bacterium HMT 093, und *Oribacterium* sind signifikant (FDR-korrigierter p -Wert $< 0,05$) häufiger in Proben mit höheren PDmax zu finden (Tab. 2). Die Taxa *Selenomonas* sp. HMT 136, *Granulicatella elegans*, *Rothia aeria*, *Corynebacterium durum*, *Veillonella dispar*, *Acinetobacter*, *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* clade 398, *Veillonella parvula*, *Bifidobacterium*, *Bergeyella*, *Veillonella rogosae*, *Neisseria*, *Veillonella atypica*, *Rhodobacteriaceae*, *Lautropia mirabilis*, und *Oribacterium asaccacroyticum* wiederum sind signifikant (FDR-korrigierter p -Wert $< 0,05$) weniger in Taschen mit steigender PDmax vorhanden (Tab. 2).

Taxa, welche signifikante positive Assoziationen mit PDmax aufweisen, sind allesamt Anaerobia (Tab. 3), während die Taxa, welche wiederum negative Assoziationen aufzeigen, signifikant ($p < 0,03$) variable Sauerstoffanforderungen aufwiesen (Tab. 4). Die α -Diversität ist signifikant ($p < 0,033$) niedriger in Proben mit tieferen Sondierungstiefen (> 7 mm; siehe Abb. 12), welches für eine höhere Bakterienvielfalt in Proben mit flacheren Taschen spricht - und umgekehrt. Die Hauptkoordinatenanalyse (Abb. 13) zeigt eine Verteilung der Proben nach Sondierungstiefe auf der zweiten Hauptkoordinate (PC2) (Abb. 13 (A)), welche eine positive Assoziation mit dem MDI aufweist (Abb. 13 (C)) – dies suggeriert ähnliche Diversitäten der Spezies in Proben mit ähnlichen Sondierungstiefen. Die α -Diversität hingegen verteilt sich entlang der ersten Hauptkoordinate (PC1) (Abb. 13 (B)). Das Dichtediagramm, welches die α -Diversität (Maß: whole tree PD) gegen MDI aufzeichnet, veranschaulicht, dass Proben mit höheren MDI ($> 0,1$) sich durch deutlich reduzierter Speziesvielfalt kennzeichnen (Abb. 13 (D)).

Tab. 2: Mit PDmax signifikant assoziierte Taxa

Positive Differenz reflektieren positive Assoziationen und umgekehrt. Lediglich Taxa, die die Signifikanzschwelle von FDR-korrigiertem p -Wert $< 0,05$ unterschritten, wurden aufgeführt.

Taxon	Differenz	Standard- fehler	p-Wert	FDR-korr.
<i>Eubacteriaceae [XV]</i>	0.7598	0.1414	0.0000	0.0014
<i>Fretibacterium sp. HMT 362</i>	0.4660	0.0938	0.0001	0.0088
<i>Selenomonas sp. HMT 136</i>	-0.7589	0.1695	0.0001	0.0095
<i>Granulicatella elegans</i>	-0.6547	0.1450	0.0002	0.0135
<i>Fretibacterium fastidiosum</i>	0.4069	0.0916	0.0002	0.0135
<i>Rothia aerea</i>	-0.7634	0.1916	0.0003	0.0167
<i>Corynebacterium durum</i>	-0.3884	0.1046	0.0006	0.0206
<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-6]</i>	0.5954	0.1561	0.0005	0.0206
<i>Veillonella dispar</i>	-0.5955	0.1539	0.0005	0.0206
<i>Acinetobacter</i>	-0.6184	0.1526	0.0006	0.0206
<i>Streptococcus oralis subsp. dentisani clade 398</i>	-0.4994	0.1313	0.0009	0.0267
<i>Alloprevotella sp. HMT 473</i>	0.4511	0.1222	0.0010	0.0286
<i>Veillonella parvula</i>	-0.4540	0.1233	0.0012	0.0310
<i>Fastidiosipila sanguinis</i>	0.3670	0.1065	0.0014	0.0326
<i>Bifidobacterium</i>	-0.5306	0.1563	0.0019	0.0332
<i>Bergeyella</i>	-0.4549	0.1326	0.0018	0.0332
<i>Filifactor alocis</i>	0.4915	0.1312	0.0017	0.0332
<i>Veillonella rogosae</i>	-0.4570	0.1367	0.0018	0.0332
<i>Neisseria</i>	-0.6571	0.1906	0.0016	0.0332
<i>Veillonella atypica</i>	-0.6161	0.1904	0.0025	0.0414
<i>Rhodobacteraceae</i>	-0.4294	0.1328	0.0026	0.0416
<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-4]</i>	0.4873	0.1424	0.0028	0.0424
<i>Bacteroidetes [G-3] bacterium HMT 365</i>	0.4473	0.1322	0.0034	0.0468
<i>Lautropia mirabilis</i>	-0.5693	0.1793	0.0032	0.0468
<i>Treponema parvum</i>	0.5249	0.1628	0.0035	0.0468
<i>Clostridiales [F-1][G-1] bacterium HMT 093</i>	0.4993	0.1516	0.0037	0.0473
<i>Oribacterium</i>	0.4296	0.1377	0.0041	0.0496
<i>Oribacterium asaccharolyticum</i>	-0.3888	0.1272	0.0040	0.0496

Tab. 3: Eigenschaften der mit PDmax signifikant positiv assoziierten Taxa

* Information aus 'American Type Culture Collection database'

** Information aus 'BacDive' (Sohnsen, Podstawka et al. 2016)

Taxa	Gram +/-	Anaerob /aerob
<i>Eubacteriaceae</i> [XV]**	+	NA
<i>Fretibacterium</i> sp. HMT 362 **	-	Anaerob
<i>Fretibacterium fastidiosum</i> **	-	Anaerob
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-6] *	+	Anaerob
<i>Bacteroidetes</i> [G-3] bacterium HMT 365 **	N/A	Anaerob
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-4] *	+	Anaerob
<i>Oribacterium</i> **	N/A	Anaerob
<i>Treponema parvum</i> **	-	Anaerob
<i>Filifactor alocis</i> (Jalava and Eerola 1999)	+	Anaerob
<i>Alloprevotella</i> sp. HMT 473 **	N/A	Anaerob
<i>Fastidiosipila sanguinis</i> **	+	Anaerob
<i>Clostridiales</i> [F-1][G-1] bacterium HMT 093 (Yutin and Galperin 2013)	+	Anaerob

Tab. 4: Eigenschaften der mit PDmax signifikant negativ assoziierten Taxa

* Information aus 'American Type Culture Collection database'

** Information aus 'BacDive' (Sohnngen, Podstawka et al. 2016)

Taxa	Gram +/-	Anaerob/aerob
<i>Bifidobacterium</i> (Schell, Karmirantzou et al. 2002)	+	Anaerob
<i>Selenomonas</i> sp. HMT 136 **	-	Anaerob
<i>Granulicatella elegans</i> **	+	Anaerob
<i>Rothia aeria</i> **	+	Aerob
<i>Acinetobacter</i> (Bitrian, Gonzalez et al. 2013)	-	Aerob
<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>dentisani</i> clade 398 **	+	Anaerob
<i>Neisseria</i> **	-	Aerob
<i>Veillonella parvula</i> **	-	Anaerob
<i>Rhodobacteraceae</i> (Simon, Scheuner et al. 2017)	-	N/A
<i>Bergeyella</i> (Shukla, Paustian et al. 2004)	-	Aerob
<i>Veillonella rogosae</i> **	-	Anaerob
<i>Lautropia mirabilis</i> **	-	Anaerob
<i>Veillonella atypica</i> **	-	Anaerob
<i>Veillonella dispar</i> **	-	Anaerob
<i>Oribacterium asaccharolyticum</i> **	+	Anaerob
<i>Corynebacterium durum</i> **	+	Aerob

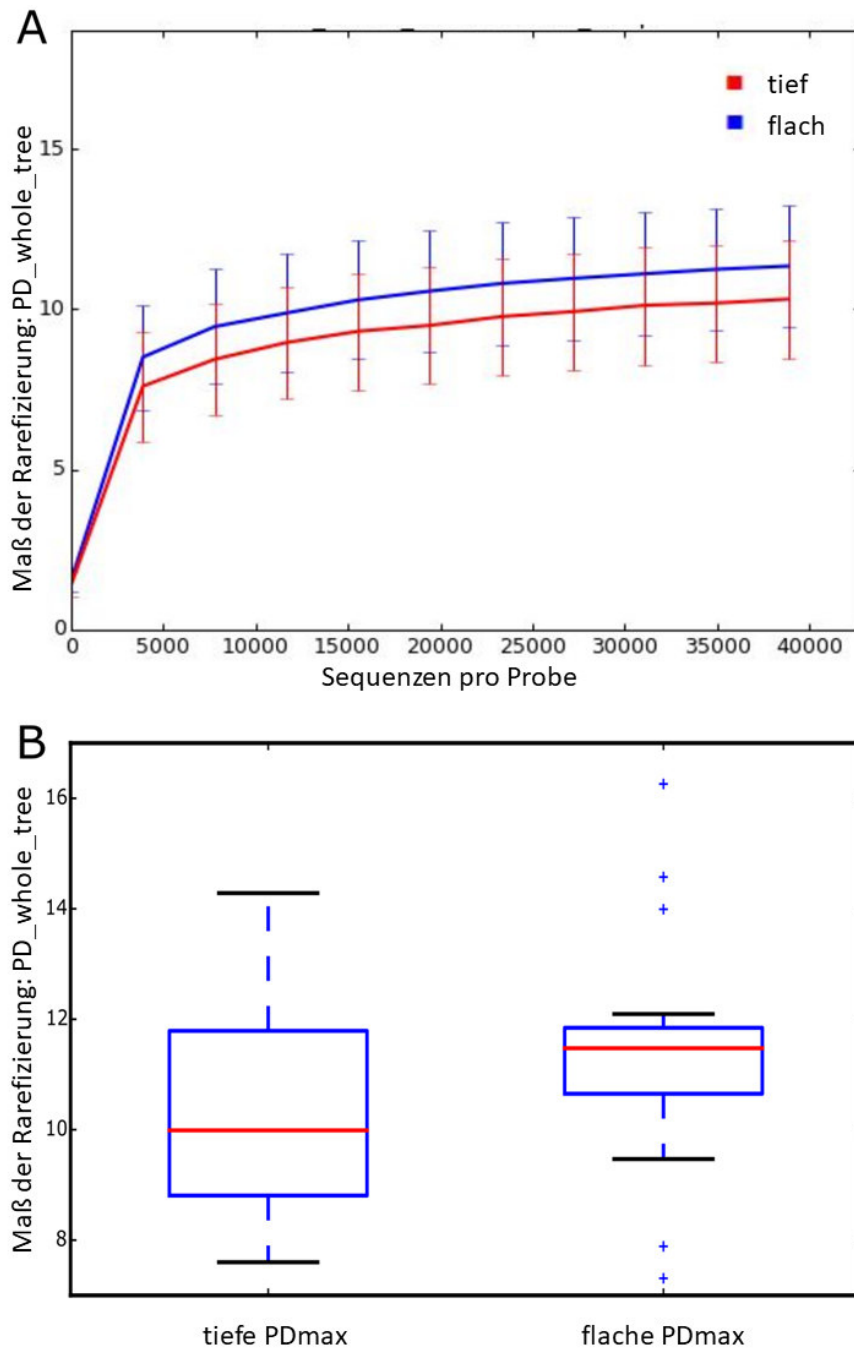


Abb. 12: Alpha-Diversitäts-Analyse

(A) Rarefizierungsdiagramm: Proben mit flacheren Taschen (blau) weisen höhere Werte der α -Diversität ‚whole tree PD‘ auf. Proben mit tieferen Taschen (PD_{max} > 7 mm) wiederum kennzeichnen sich durch geringeren Speziesreichtum.

(B) Boxplot-Diagramm der ‚whole tree PD‘ tiefer und flacher Taschen: α -Diversität ist signifikant ($p < 0.033$) niedriger in der Gruppe mit geringerer PD_{max}.

Abbildung aus (Kroger, Hulsmann et al. 2018); mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc.

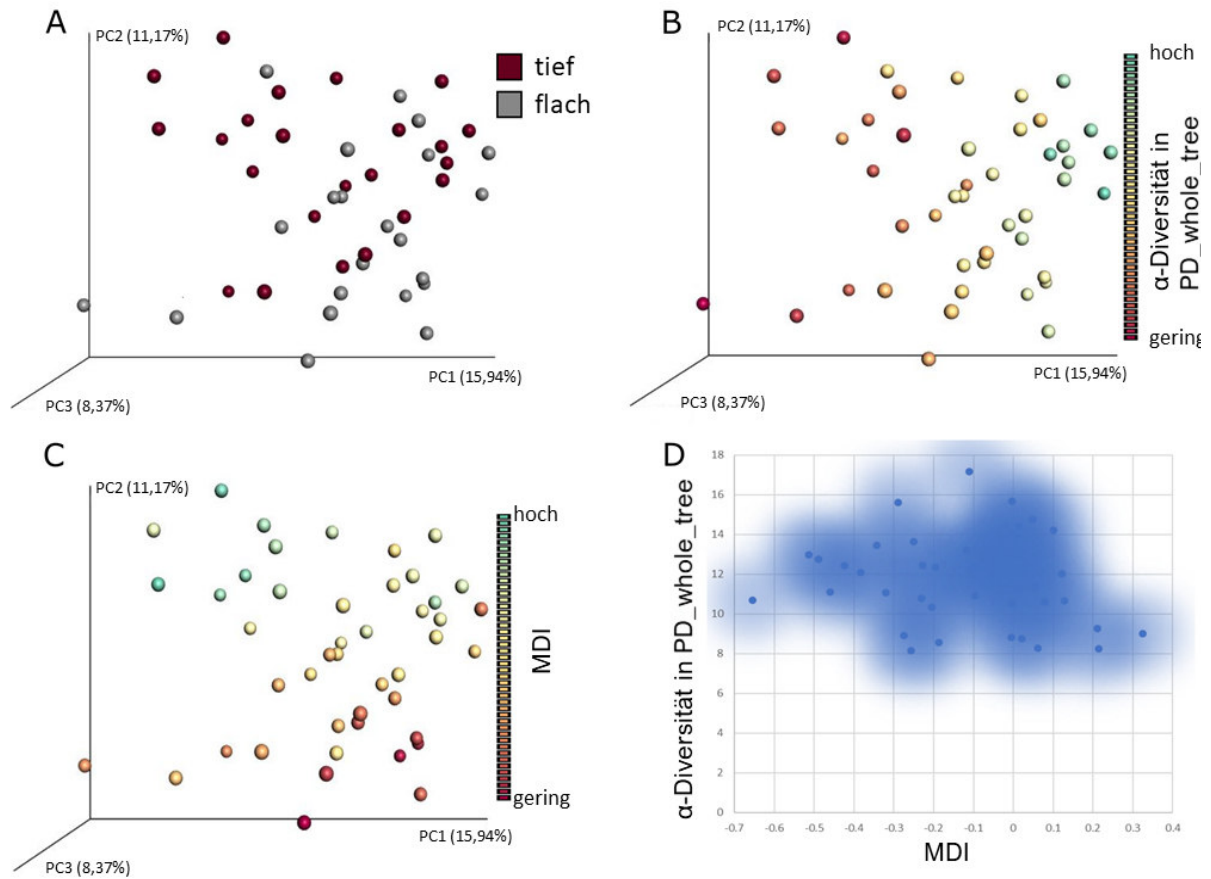


Abb. 13: Diagramm zur Hauptkoordinatenanalyse

Jede Achse spiegelt eine Hauptkoordinate wider. Gewählt wurden die drei Hauptkoordinaten, welche den größten Anteil an Diversität einfangen – prozentual sind dabei die Einzelanteile an den Achsen festgehalten.

(A) teilt die Proben nach PDmax auf: tiefere (lila, PDmax > 7 mm) und flachere Taschen (grau, PDmax ≤ 7 mm), (B) Aufteilung nach α -Diversität (whole tree PD) und (C) nach MDI als Gradient. Das Wolkendiagramm in (D) zeichnet α -Diversität gegen MDI auf: Proben, welche einen erhöhten MDI aufweisen (> 0.1) zeigen eine plötzliche Reduktion in Artenreichtum.

Abbildung aus (Kroger, Hulsmann et al. 2018); mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc.

3.5 Korrelationsnetzwerk

Die Netzwerkanalyse, welche mit Hilfe des ‚cocrepe‘-Paketes in R durchgeführt wurde, zeigt eine deutliche Unterteilung in zwei Kooperationskomplexe. Dabei bilden *L. mirabilis*, *Neisseria*, *G. elegans*, *Bergeyella*, *R. aeria*, *C. durum*, *Oribacterium asaccharolyticum*, *Selenomonas sp. HMT 136*, *V. rogosae*, *V. parvula*, *V. atypica*, *V. dispar*, *Streptococcus oralis subsp. dentisani clade 398*, und *Bifidobacterium* eine durch Co-Existenz gekennzeichnete Untereinheit, welche ausschließlich aus Taxa besteht, die negative Assoziationen mit dem Schweregrad der Erkrankungen aufwiesen. Den zweiten Komplex, ebenso negativ mit PDmax assoziiert, bilden *Acinetobacter* und *Rhodobacteriaceae*. Beide Komplexe zeigen ein signifikant konkurrierendes Verhalten mit drei Komplexen, die lediglich von Taxa geformt wird, die positiv mit Sondierungstiefe assoziiert sind: (a) *F. alocis*, *Bacteroidetes bacterium HMT 365*, and *Clostridiales [F-1][G-1] bacterium HMT 093*; (b) *Peptostreptococcaceae [XI][G-6]*, *Peptostreptococcaceae [XI][G-4]*, *Fretibacterium sp. HMT 362*, und *F. fastidiosum*; und (c) *Eubacteriaceae [XV]*. Abbildung 14 visualisiert die Bakterienkomplexe. Ergebnisse der Netzwerkanalyse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

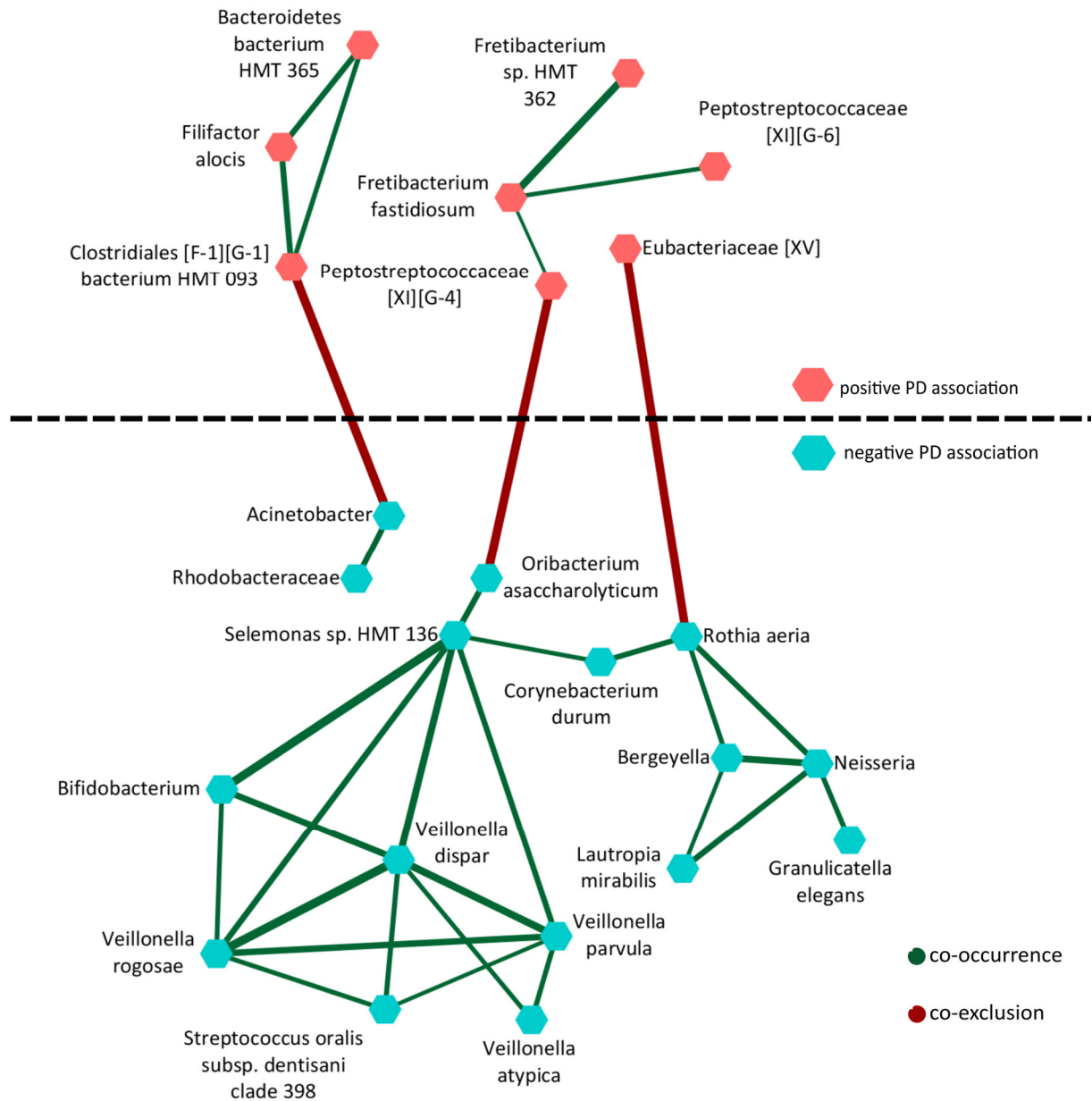


Abb. 14: Netzwerk der signifikant mit PDmax assoziierten Taxa

Rote Linien stellen Co-Exklusionen dar; grüne Linien spiegeln Co-Auftreten wider. Für eine bessere Veranschaulichung wurden die Resultate gefiltert - lediglich Korrelationen mit FDR-korrigiertem p -Wert $< 0,1$ wurden mit einbezogen. Die Gewichtungen der Korrelationen (Dicke der Verbindungslinien) liegen zwischen $-0,424$ und $0,673$. Über der gestrichelten Linie sind ausschließlich Taxa zu finden, welche in vorangegangener Analyse positive Assoziationen mit PDmax aufgewiesen haben. Taxa, welche gehäuft in flachen Taschen vorkamen, gruppieren sich unterhalb der gekennzeichneten Linie.

Abbildung aus (Kroger, Hulsmann et al. 2018); mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc.

Tab. 5: Adjazenzliste der Netzwerkanalyse

Die Liste führt Interaktionen zwischen zwei Taxa auf, wobei jede Linie eine einzelne Interaktion widerspiegelt. Negative Werte in der Gewichtung-Spalte repräsentieren Co-Exklusionen, positive Werte hingegen stehen für eine Co-Existenz genannter Taxa. Es werden nur Verbindungen mit signifikantem FDR-korrigiertem p -Wert $< 0,1$ aufgeführt.

	Bakterium	Gewichtung	FDR-corr.	Interaktionstyp
Von	<i>Selenomonas sp. HMT 136</i>	0.661	0	co-occurrence
Zu	<i>Bifidobacterium</i>			
Von	<i>Fretibacterium sp. HMT 362</i>	0.589	0	co-occurrence
Zu	<i>Fretibacterium fastidiosum</i>			
Von	<i>Veillonella rogosae</i>	0.673	0	co-occurrence
Zu	<i>Veillonella dispar</i>			
Von	<i>Veillonella dispar</i>	0.561	0	co-occurrence
Zu	<i>Selenomonas sp. HMT 136</i>			
Von	<i>Neisseria</i>	0.549	0	co-occurrence
Zu	<i>Bergeyella</i>			
Von	<i>Veillonella parvula</i>	0.585	0	co-occurrence
Zu	<i>Veillonella dispar</i>			
Von	<i>Veillonella dispar</i>	0.526	0.000	co-occurrence
Zu	<i>Bifidobacterium</i>			
Von	<i>Acinetobacter</i>	0.487	0.000	co-occurrence
Zu	<i>Rhodobacteraceae</i>			
Von	<i>Neisseria</i>	0.486	0.000	co-occurrence
Zu	<i>Rothia aeria</i>			
Von	<i>Neisseria</i>	0.500	0.000	co-occurrence
Zu	<i>Lautropia mirabilis</i>			
Von	<i>Veillonella rogosae</i>	0.527	0.001	co-occurrence
Zu	<i>Veillonella parvula</i>			
Von	<i>Veillonella dispar</i>	0.442	0.004	co-occurrence
Zu	<i>Streptococcus oralis subsp. dentisani clade 398</i>			
Von	<i>Neisseria</i>	0.443	0.004	co-occurrence
Zu	<i>Granulicatella elegans</i>			
Von	<i>Selenomonas sp. HMT 136</i>	0.495	0.004	co-occurrence
Zu	<i>Oribacterium asaccharolyticum</i>			
Von	<i>Corynebacterium durum</i>	0.469	0.005	co-occurrence
Zu	<i>Rothia aeria</i>			
Von	<i>Veillonella parvula</i>	0.482	0.006	co-occurrence
Zu	<i>Selenomonas sp. HMT 136</i>			

Tab. 5: Fortsetzung: Adjazenzliste der Netzwerkanalyse

	Bakterium	Gewichtung	FDR-corr.	Interaktionstyp
Von	<i>Veillonella rogosae</i>	0.503	0.006	co-occurrence
Zu	<i>Selenomonas sp. HMT 136</i>			
Von	<i>Veillonella dispar</i>	0.413	0.007	co-occurrence
Zu	<i>Veillonella atypica</i>			
Von	<i>Filifactor alocis</i>	0.488	0.007	co-occurrence
Zu	<i>Bacteroidetes bacterium HMT 365</i>			
Von	<i>Eubacteriaceae [XV]</i>	-0.406	0.008	co-exclusion
Zu	<i>Rothia aeria</i>			
Von	<i>Veillonella rogosae</i>	0.420	0.011	co-occurrence
Zu	<i>Streptococcus oralis subsp. dentisani clade 398</i>			
Von	<i>Filifactor alocis</i>	0.491	0.011	co-occurrence
Zu	<i>Clostridiales [F-1][G-1] bacterium HMT 093</i>			
Von	<i>Bergeyella</i>	0.429	0.011	co-occurrence
Zu	<i>Rothia aeria</i>			
Von	<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-4]</i>	-0.423	0.021	co-exclusion
Zu	<i>Oribacterium asaccharolyticum</i>			
Von	<i>Lautropia mirabilis</i>	0.383	0.042	co-occurrence
Zu	<i>Bergeyella</i>			
Von	<i>Fretibacterium fastidiosum</i>	0.401	0.044	co-occurrence
Zu	<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-6]</i>			
Von	<i>Clostridiales [F-1][G-1] bacterium HMT 093</i>	0.432	0.045	co-occurrence
Zu	<i>Bacteroidetes bacterium HMT 365</i>			
Von	<i>Veillonella parvula</i>	0.445	0.057	co-occurrence
Zu	<i>Veillonella atypica</i>			
Von	<i>Veillonella rogosae</i>	0.422	0.066	co-occurrence
Zu	<i>Bifidobacterium</i>			
Von	<i>Acinetobacter</i>	-0.424	0.067	co-exclusion
Zu	<i>Clostridiales [F-1][G-1] bacterium HMT 093</i>			
Von	<i>Fretibacterium fastidiosum</i>	0.325	0.075	co-occurrence
Zu	<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-4]</i>			
Von	<i>Veillonella parvula</i>	0.381	0.094	co-occurrence
Zu	<i>Streptococcus oralis subsp. dentisani clade 398</i>			
Von	<i>Selenomonas sp. HMT 136</i>	0.410	0.094	co-occurrence
Zu	<i>Corynebacterium durum</i>			

4. Diskussion

Mit Hilfe dieser Arbeit wurde nach unserem besten Wissen erstmals signifikante Assoziationen zwischen spezifischen Einheiten des submukösem Mikrobioms bei periimplantären Erkrankungen und dem Schweregrad der Erkrankung nachgewiesen. Dabei gilt hier die maximale Sondierungstiefe als Maß des Schweregrades. Darüber hinaus konnte die Analyse zusätzliche Charakteristika dieses Biofilms in Abhängigkeit mit PDmax untersuchen. Zusätzlich konnten eindeutige Korrelationsmuster der Bakterien in der submukösen Plaque identifiziert werden. (Kroger, Hulsmann et al. 2018)

Nach bestem Wissen ist dies die erste Arbeit, die sich mit den oben genannten Assoziationen beschäftigt und sich dabei durch die Methodik auf das gesamte Mikrobiom bezieht. Ebenfalls wurde zum ersten Mal eine wohldefinierte Patientenkohorte rekrutiert. Deren Einschlusskriterien wurden speziell zur Minimierung jeglicher subjekt-bezogener und lokaler Einflüsse aufgestellt – dies umfasst Raucherstatus, systemische Erkrankung (insbesondere Diabetes mellitus), Medikamenteneinnahme und vorangegangene Therapien. Weiter potentielle Störgrößen wurden durch unseren stringenten statistischen Analyseplan durch die multivariaten Regressionsanalysen adressiert.

4.1 Die Rolle der Dysbiose

Die bakterielle Besiedlung humaner Oberflächen ist ein natürliches Geschehen. Oft stehen Mikroorganismen und Wirt in symbiotischen Beziehungen. Die Art der Besiedlung ist dabei von der Oberfläche, welche sie bewohnen, abhängig – jedes Gewebe bildet ein neues Habitat, welches sich optimal für ein individuell angepasstes Mikrobiom eignet (Marsh 2015). So ist zu erwarten, dass sich die bakterielle Zusammensetzung im Magen-Darm-Trakt von der im Mund-Rachenraum unterscheidet. Das Mikrobiom in seiner Struktur ist somit dynamisch und von verschiedenen biologischen Faktoren abhängig. In gesunden Situationen existiert ein Gleichgewicht von pathogenen und apathogenen Keimen. Die Anwesenheit einzelner Pathogene führt folglich nur in seltenen Fällen oder Umständen zur Ausbildung einer Erkrankung, besonders dann wenn sie nicht zu den natürlichen Besiedlern gehören. Zu diesen pathogenen Erregern gehören z.B. Legionellen. Eine Infektion mit *Legionella pneumophila* führt zu einer akuten Pneumonie, der so-

genannten ‚Legionärskrankheit‘ (Newton, Ang et al. 2010). Das Bekämpfen des spezifischen Keimes führt schlussendlich zur Genesung.

Zumeist jedoch liegen Erkrankungen ein Ungleichgewicht des Mikrobioms zugrunde - eine Verschiebung zu Gunsten der natürlich vorkommenden, jedoch fakultativ pathogenen Keime. Dieses Auskonkurrieren von Pathogenen gegenüber gesundheitsassoziierten Spezies wird als ‚Dysbiose‘ bezeichnet. Die Ursache für die dysbiotische Veränderung hingegen kann vielfältig sein: z.B. können geschwächte Immunabwehr, Antibiotika-Überexposition (Mikkelsen, Allin et al. 2016), Ernährung (Chan, Estaki et al. 2013) und Alkoholmissbrauch (Yan, Fouts et al. 2011) allesamt einen Einfluss haben. Es gibt eine Vielzahl von Erkrankungen, bei denen Dysbiose nachgewiesen und auch als kausaler Faktor festgelegt wurden: z.B. Diabetes mellitus, Autismus und Adipositas (Carding, Verbeke et al. 2015, Boulange, Neves et al. 2016, Buffington, Di Prisco et al. 2016). Auch spielt die ökologische Verschiebung bei der Parodontitis eine entscheidende Rolle (Deng, Szafranski et al. 2017).

Die Analysen, die sich mit den Effekten der ökologischen Verschiebung auf den Erkrankungsschweregrad beschäftigten, zeigen, dass bei der Periimplantitis der MDI – eine Messgröße für submuköse bakterielle Dysbiose – positiv mit steigender Sondierungstiefe assoziiert ist. Dies weist darauf hin, dass potentielle Pathogene mit gesundheitsassoziierte Taxa konkurrieren und schließlich Überhand gewinnen (Marsh 2015). Nach bestem Wissen ist diese Studie die erste, die einen solchen Prozess in humaner PI nachweist.

4.2 Zusammensetzung und Eigenschaften des periimplantären Mikrobioms

Vorangegangene Studien, welche das Mikrobiom bei periimplantärer Gesundheit und PI untersuchten, zeigen, dass das mikrobielle Profil von gram-negativen anaeroben Taxa dominiert wird (Koyanagi, Sakamoto et al. 2010, Kumar, Mason et al. 2012, Tamura, Ochi et al. 2013, Apatzidou, Lappin et al. 2017, Sanz-Martin, Doolittle-Hall et al. 2017, Al-Ahmad, Muzafferiy et al. 2018). Bei detaillierterer Betrachtung der mikrobiellen Profile, die der dysbiotischen Veränderungen dieser Arbeit zugrunde liegen, decken sich die Ergebnisse mit vorherig genannten Resultaten anderer Arbeitsgruppen. Unsere Arbeit konzentrierte sich jedoch im Gegensatz dieser auf Läsionen unterschiedlichen Schwe-

regrades. Interessanterweise stimmen die Taxa überein, welche bei unserer Arbeit gehäuft in flacheren Taschen – also Läsionen geringeren Schweregrades – vorkamen, mit denen, welche in Proben aus gesunden Situationen gewonnen wurden; z.B. *Streptococcus* und diverse *Veillonella spp.*

Bei genauerer Betrachtung der Taxa, welche mit niedrigeren Sondierungstiefen assoziiert waren, zeigt sich das Potential der Hochdurchsatzsequenzierung. Zum einen konnten wir bekannte gesundheitsassoziierte Taxa nachweisen, zum anderen sind jedoch auch neue noch nicht mit PI in Verbindung gebrachte Bakterien vorhanden:

(i) *Selenomonas sp. HMT 136*

Eine Vielzahl von *Selenomonas* Spezies wurde bereits mit PERIO in Verbindung gebracht. Weiter wurde eine kausale Pathogenität dieses Keims diskutiert, jedoch sind genaue destruktive Mechanismen und Virulenzfaktoren noch nicht bekannt. (Drescher, Schlafer et al. 2010, Medikeri, Lele et al. 2015)

(ii) *Granulicatella elegans*

Diese Spezies ist ein natürlicher Bewohner des Mundraums. Jedoch gilt der Keim als hochpathogen. Es sind Fälle infektiöser Endokarditis dokumentiert, deren Ursache *Granulicatella elegans* oral Ursprungs war (Ohara-Nemoto, Kishi et al. 2005). Die Rolle in PI und PERIO ist bisweilen nicht diskutiert.

(iii) *Rothia aeria*

Diverse *Rothia* Spezies sind mit oralen Weichgewebsinfektionen assoziiert – Perikoronitis (Peltroche-Llacsahuanga, Reichhart et al. 2000) und Parodontitis (Leshner, Gerencser et al. 1977). In immunkomprimierten Patienten können *Rothia sp.* (und speziell *Rothia aeria*) Bakteriämien und daraus resultierend schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen und auch zum Tode führen (Ramanan, Barreto et al. 2014). Interessanterweise sind Fälle dokumentiert, in denen *Rothia aeria* Infektionen an Endoprothesen (z.B. künstliche Kniegelenke) verursacht hat (Mahobia, Chaudhary et al. 2013). Dies eröffnet die Frage bezüglich Parallelen zu Infektionen um dentale Implantaten.

(iv) *Acinetobacter*

Acinetobacter spp. sind eine der häufigsten Verursacher nosokomialer Infektionen – insbesondere bei hospitalisierten Patienten. Da ihre Anwesenheit ebenfalls mit der PERIO assoziiert ist, liegt die Hypothese nahe, dass der submuköse Biofilm ein Reservoir und schlussendlich Ursprung solcher nosokomialer Infektionen darstellen kann (Souto, Silva-Boghossian et al. 2014). Unsere Arbeit erweitert die Hypothese, dass nicht nur PERIO Patienten einem Risiko ausgesetzt sind, sondern auch solche, die an PI erkrankt sind.

(v) *Streptococcus oralis subsp. dentisani clade 398*

Diese Spezies gehört zu der *Streptococcus mitis*-Gruppe und wurde erst vor geraumer Zeit als eigenständige Spezies klassifiziert (Zheng, Tan et al. 2016). Bis zuletzt gilt die Klassifizierung aller 13 Vertreter der Mitis-Gruppe als einzelne Spezies als umstritten (Jensen, Scholz et al. 2016). Jedoch haben alle Taxa gemein, dass sie eine der häufigsten Vertreter oraler Bakterien sind und zum natürlichen oralen Mikrobiom gehören (Zheng, Tan et al. 2016). Aufgrund der Inkonsistenz der Literatur und des frühen Forschungsstandes kann die Bedeutung unserer Resultate in Bezug dieser Taxa nicht vollumfänglich evaluiert werden.

(vi) *Veillonella parvula, Veillonella dispar, Veillonella rogosae, Veillonella atypica*

In der Komplextheorie Socranky's ist *Veillonella parvula* im grünen Komplex vertreten. Somit gilt dieser Keim als früher Besiedler des oralen Biofilms und ist natürlicher Bestandteil der oralen Flora (Socransky, Haffajee et al. 1998). Auch die restlichen genannten *Veillonella spp.* sind frühe Kolonialisierer und daher gesundheitsassoziiert (Mashima and Nakazawa 2014). Auch in unseren Proben sind all diese Spezies mit flacheren Taschen, also Läsionen geringeren Schweregrades assoziiert.

(vii) *Bifidobacterium*

Hoyo et al. zeigen in Ihrer Arbeit, dass die Anwesenheit von diversen *Bifidobacterium spp.* mit parodontaler Gesundheit assoziiert sind (Hoyo,

Mizoguchi et al. 2007). Des Weiteren reduziert die Anwesenheit des Taxons die Häufigkeit vom parodontal-pathogenen Keim *Porphyromonas gingivalis* (Jasberg, Soderling et al. 2016). Zusätzlich wurden positive Resultate im Sinne protektiver Eigenschaften präventiv progressivem Attachmentverlusts mit der topischen Applikation von *Bifidobacterium* nachgewiesen (Oliveira, Salvador et al. 2017). Auch unsere Untersuchungen suggerieren eine Gesundheitsassoziation dieses Bakteriums bei PI. Die potentiellen protektiven Eigenschaften bei periimplantären Läsionen muss noch geklärt werden.

(viii) *Bergeyella*

Die Rolle des Bakteriums *Bergeyella* ist bisweilen in der human oralen Flora ungeklärt. Laut Literatur ist diese Spezies ein gängiger Vertreter caniner Parodontitis (Davis, Wallis et al. 2013) und häufiger Besiedler porkiner Nasalräume (Lorenzo de Arriba, Lopez-Serrano et al. 2018).

(ix) *Neisseria*

Neisseria ist Hauptteil des bakteriellen Anteils von Speichel und somit ein natürlicher Vertreter auf oraler Mukosa (Chen, Hemme et al. 2018). Auch in periimplantären Situationen gelten – wie bei PERIO – Vertreter der *Neisseria* als gesundheitsassoziiert (Gao, Zhou et al. 2018). Damit decken sich unsere Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Studien.

(x) *Lautropia mirabilis*

Dieses Taxon ist ein natürlicher Vertreter des Mund- und Rachenraums. Die Erstisolation erfolgte aus Proben gesunden Gingivarändern. Die Anwesenheit und Besiedlung mit *Lautropia mirabilis* gilt als symbiotisch und ist parodontal gesundheitsassoziiert (Colombo, Bennet et al. 2012, Shaddox, Huang et al. 2012). Auch wurde *L. mirabilis* bereits in der PI nachgewiesen (Koyanagi, Sakamoto et al. 2010). Unsere Resultate decken sich somit auch hier mit der vorhandenen Literatur.

(xi) *Oribacterium asaccacroliticum, Corynebacterium durum, Rhodobacteriaceae*

Diese Taxa waren bisherig noch nicht in Zusammenhang mit PI gebracht worden. Sie kommen natürlicherweise in humanen Aerodigestiv-Trakt vor (Kumar, Leys et al. 2006, Sizova, Muller et al. 2014, Chen, Hemme et al. 2018). Ihre potentielle Rolle in infektiösen Erkrankungen wie PI muss noch geklärt werden.

Detaillierte Betrachtung der bakteriellen Taxa, welche mit höheren Sondierungstiefen und schlussendlich schwereren Erkrankungsgraden assoziiert sind, weist bekannte parodontale Pathogene nach. Jedoch sind auch in dieser Gruppe Bakterien vertreten, die bislang weder im Bereich der PI noch der PERIO eine Assoziation aufgewiesen haben:

(i) *Fretibacterium fastidiosum*, *Fretibacterium* sp. HMT 362

Die Isolation des Bakteriums *F. fastidiosum* gelang aus einer tiefen parodontalen Läsion (Vartoukian, Downes et al. 2013). Potentielle Pathomechanismen und Auswirkungen auf parodontale oder periimplantäre Erkrankungen sind bisweilen unbekannt.

(ii) *Peptostreptococcaceae* [XI][G-6], *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4], *Alloprevotella* sp. HMT 473, *Clostridiales* [F-1][G-1] bacterium HMT 093, *Eubacteriaceae* [XV], *Bacteriodetes* [G-3] bacterium HMT 365, *Oribacterium*

Diese sind allesamt Taxa, welche in der Vergangenheit in subgingivaler Plaque nachgewiesen wurden. Sie sind dadurch Vertreter der PERIO (Chen, Hemme et al. 2018). Auch in der PI sind die Bakterien gefunden worden (Apatzidou, Lappin et al. 2017). Genaue Virulenzfaktoren und pathologische Mechanismen sind bisweilen jedoch noch nicht geklärt.

(iii) *Fastidiosipila sanguinis*

Positive Assoziationen wurden auch bei einigen Taxa nachgewiesen, bei denen bislang noch keine Verbindungen zu PI oder Parodontitis demonstriert wurde. Dazu gehört auch unser nachgewiesenes *F. sanguinis* – eine Spezies, die jüngst in humanen Blutproben gefunden, jedoch keine humane Nosologie nachgewiesen wurde (Falsen, Collins et al. 2005).

(iv) *Filifactor alocis*

Dieses Taxon wird als neu identifizierter parodontaler-pathogener Keim diskutiert, der letztendlich aufgrund seiner schweren Kultivierbarkeit nur dank neuer Sequenzieretechniken entdeckt wurde. Durch seine hochvirulenten Eigenschaften trägt dieser Keim beträchtlich zum Weich- und Hartgewebsabbau bei und ist ein Markerkeim für die PERIO. Auch wurde – wie auch in unserer Arbeit – eine signifikante Assoziation von *F. alocis* mit PI festgestellt. (Aruni, Chioma et al. 2014, Aruni, Mishra et al. 2015)

(v) *Treponema parvum*

Treponemen im Allgemeinen gelten als höchst parodontal-destruktiv (Socransky, Haffajee et al. 1998). Insbesondere die Spezies *T. parvum* wurde in Fällen akuter nekrotisierender Gingivitis gefunden (Wyss, Dewhirst et al. 2001). Auch in unseren periimplantären Proben steigt die Häufigkeit von *T. parvum* mit steigender Destruktion.

Die dysbiotische Veränderung, welche im Zusammenhang mit der Änderung der Sondierungstiefe von flachen zu tiefen Taschen auftritt, geht mit einer Reduktion des Artenreichtums einher. Die Gruppe, welche ausschließlich aus - meist gram-negativen - Anaerobien besteht und bereits nachgewiesene parodontal-pathogene Keime beinhaltet, konkurrieren erfolgreich im Laufe der steigenden Erkrankungsschwere mit gesundheitsassoziierten Taxa, welche gehäuft in flachen Taschen zu finden sind.

4.3 Bakterielle Komplexe in der Periimplantitis

In der Parodontitis besteht seit Jahren die Komplextheorie, welche die bakterielle Besiedlung der Mundhöhle in funktionelle Cluster einteilt. Dabei unterscheidet man frühe Kolonisierer der Zahnoberfläche (wie zum Beispiel *A. oris* und diverse *Streptokokken*) und gesundheitsassoziierte Spezies, welche im ‚grünen Komplex‘ festgehalten wurden. Der ‚orangene Komplex‘ umfasst potentiell parodontal-pathogene Keime, welche natürlich in geringer Menge im Mundraum vorkommen. Nur bei Änderung eigentlich stabiler biologischer Situationen und/oder der Immunantwort des Wirtes kommt es zu einer Verlagerung des ökologischen Gleichgewichts und die Anzahl der ‚orangenen Komplex‘-Bakterien nimmt zu. Diese wiederum bilden eine Brückengruppe zum ‚roten Komplex‘.

Dieser besteht aus bekannten höchst parodontal-destruktiven Taxa: *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*. Jedoch gibt es auch Spezies, die sich nicht in die Komplextheorie einfinden und daher gesondert aufgeführt werden: bei *A. actinomycetemcomitans* beispielsweise hängt die Virulenz und Assoziation mit Gewebsdestruktion vom Serotypen ab und ist deshalb keinem Cluster genau zuzuordnen (Socransky, Haffajee et al. 1998). Ebenso stellt die Weiterentwicklung der Untersuchungsmöglichkeiten subgingivaler Plaque und der Nachweis- und Identifikationsmethoden von Bakterien die Vollständigkeit dieser Theorie in Frage. Besonders die Resultate der Arbeitsgruppe Aruni et al. verdeutlicht das Potential der neuen Hochdurchsatzsequenzierung. Durch diese wurde *F. alocis* als parodontaler Markerkeim entdeckt und identifiziert. Ohne moderne Techniken wäre dies nahezu unmöglich gewesen, da sich die klassische Kultivierung dieses Keims als komplex darstellt (Aruni, Roy et al. 2011, Aruni, Zhang et al. 2014, Aruni, Chioma et al. 2014, Aruni, Mishra et al. 2015). Auch in unseren Proben der PI spielt *F. alocis* eine zentrale Rolle. Die Spezies weist eine signifikante Häufung in Taschen mit hohen Sondierungstiefen auf. Die pathomechanistischen Hintergründe in der spezialisierten Situation um das dentale Implantat bedürfen noch weiterer Klärung.

Anhand unserer Arbeit und unserer Netzwerkanalyse haben wir erstmals bakterielle Komplexe in humaner PI identifiziert - unter Berücksichtigung des gesamten Mikrobiomlevels. Es wurden insgesamt fünf Komplexe nachgewiesen. Dabei waren drei dieser Komplexe mit steigendem PI-Schweregrad assoziiert:

- (i) *Eubacteriaceae* [XV]
- (ii) *Peptostreptococcaceae* [XI][G-6], *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4], *Fretibacterium fastidiosum*, *Fretibacterium* sp. HMT 362
- (iii) *Clostridiales* [F-1][G-1] bacterium HMT 093, *Bacteriodetes* [G-3] bacterium HMT 365, *Filifactor alocis*

Die zwei weiteren hingegen bestehen ausschließlich aus Bakterien, die signifikant häufiger in flachen Taschen zu finden sind:

- (iv) *Acinetobacter*, *Rhodobacteriaceae*

- (v) *Oribacterium asaccacroliticum*, *Corynebacterium durum*, *Lautropia mirabilis*, *Neisseria*, *Bergeyella*, *Veillonella parvula*, *Veillonella dispar*, *Veillonella rogosae*, *Veillonella atypica*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* clade 398, *Rothia aeria*, *Granulicatella elegans*, *Selenomonas* sp. HMT 136

Dabei konkurrieren die Komplexe (i) bis (iii) mit Komplexen (iv) und (v) und schließen sich gegenseitig aus.

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass es sich bei PI nicht um eine Mono-Infektion mit einem bestimmten Pathogen handelt, sondern der Erkrankung ein multifaktorielles, dysbiotisches Geschehen zugrunde liegt. Speziell im Hinblick der Limitationen unserer Studie, die lediglich erkrankte Implantate einschließt, verdeutlicht unsere Arbeit die Wichtigkeit eines balancierten periimplantären Ökosystems bestehend aus einem Gleichgewicht von gesundheits-assoziierten Bakterien und Pathogenen (Socransky and Haffajee 2005). Weiter wurden zum ersten Mal funktionelle bakterielle Gruppen in der humanen PI identifiziert und als Komplexe zusammengefasst.

4.4 Stärken und Limitationen der Studie

Die primäre Stärke der Studie besteht aus der Patientenkohorte. Nach bestem Wissen ist dies die größte Studienpopulation, welche stringente Einschlusskriterien erfüllt. Alle Patienten sind systemisch gesund und Nicht-Raucher. Systemische Gesundheit – insbesondere im Hinblick auf eine Diabetes mellitus Erkrankung – und Raucherstatus spielen speziell bezüglich bakterieller Besiedlung eine entscheidende Rolle. Beide Parameter beeinflussen das Mikrobiom signifikant (Chan, Estaki et al. 2013, Genco and Borgnakke 2013, Renvert and Quirynen 2015, Stacchi, Berton et al. 2016). Der Ausschluss solcher Patienten minimiert dementsprechend eine Störgröße, sodass mikrobielle Veränderungen und Signifikanzen, welche in unserer Kohorte gefunden wurden, nicht auf diese Faktoren zurückzuführen sind. Des Weiteren wurden alle Proben aus Läsionen gewonnen, welche keine Therapie erfahren haben. Submuköse/Subgingivale Instrumentierung und lokale/systemische Antibiotikagabe modifiziert das Mikrobiom signifikant (Chen, Hemme et al. 2018, Jockel-Schneider, Pretzel et al. 2018). Auch diese potentielle Störgröße wurde durch die Einschlusskriterien in dieser Kohorte eliminiert. Wei-

tere möglicherweise einflussnehmende Faktoren – wie das Alter und das Geschlecht, sowie das multiple Testen am selben Patienten - wurden mit Hilfe des robusten statistischen Analyseplans adressiert. Die Regressionsanalyse mit linearen gemischten Modellen bildet die zweite Stärke dieser Arbeit und grenzen unsere Ergebnisse im Maße der Verlässlichkeit deutlich von ähnlichen Studien ab. Zum Dritten setzt sich – wie bereits genannt - die 16s rRNA Sequenzierung als Goldstandard durch und ist Mittel der Wahl bei der Mikrobiom-Profilierung. So überzeugt diese Arbeit zusätzlich durch moderne und zeitgemäße Methodik.

Limitationen sind zum einen der querschnittsbasierte Aufbau der Studie. Querschnittstudien beinhalten in sich eine begrenzte Aussagekraft, da lediglich Korrelation oder bestenfalls Assoziationen entdeckt werden können. Des Weiteren kann das Fehlen einer gesunden Kontrollgruppe als Limitation aufgeführt werden. Beide Faktoren führen dazu, dass Rückschlüsse auf die Zeitlichkeit der beobachteten Assoziationen ausgeschlossen sind und keine Kausalbeziehung zwischen submuköser mikrobieller Dysbiose und PI nachgewiesen werden können. Um Kausalität plausibel nachzuweisen, sind Studien mit longitudinalem Charakter von Nöten. Deren Durchführung ist jedoch aufgrund von ethischen und logistischen Fragen schwierig.

Ein Großteil unserer Resultate deckt sich mit bisherigen Studienergebnissen. Mögliche Abweichungen können durch Unterschiede in der statistischen Analyse, Datenverarbeitung, Verwendung von Sequenzierungsplattformen und –qualität und variable 16s Zielregionen erklärt werden (Kozich, Westcott et al. 2013).

4.5 Schlusswort

Schlussendlich ist dies die erste Studie, welche eine Assoziation bekannter und neuer Taxa mit dem Schweregrad der humanen Periimplantitis nachweist. Innerhalb des Mikrobioms der PI haben wir Gruppen identifiziert, welche signifikant konkurrieren und kooperieren. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass der PI ein multifaktorielles Geschehen in Form einer dysbiotischen Veränderung des Mikrobioms im Krankheitsverlauf unterliegt. Die Dysbiose ist ein wichtiger Mechanismus bei der Ausbildung von einer Vielzahl von Erkrankungen. Nun konnte dies erstmals auch bei humaner Periimplantitis nachgewiesen werden. Schlussfolgernd ist eine frühe Intervention bei ersten Entzün-

dungszeichen elementar um eine Ausbildung einer etablierten dysbiotischen Veränderung zu verhindern. Diese Arbeit bildet die Grundlage für weitere mechanistische Untersuchungen der mikrobiellen Dysbiose und daraus resultierende Immunantwort des Wirts und des erkrankten Gewebes. Des Weiteren wurden erstmals funktionelle bakterielle Komplexe in submuköser Plaque nachgewiesen. Basierend auf diese Resultate sind weitere Untersuchungen bezüglich funktioneller and pathomechanistischer Vorgänge in den einzelnen Komplexen und zwischen den konkurrierenden Komplexen von Nöten.

5. Zusammenfassung

Diese Querschnittsstudie hat zum Ziel das submuköse Mikrobiom periimplantärer Läsionen in verschiedenen Krankheitsstadien zu analysieren.

Dafür wurden mikrobielle Signaturen von 45 submukösen Plaque-Proben aus untherapierten PI-Läsionen von 30 systemisch gesunden Nichtrauchern per Hoch-Durchsatz-16s-Sequenzierung bestimmt. Lineare gemischte Regressionsmodelle wurden verwendet um Taxa zu identifizieren, welche signifikante Assoziationen mit Sondierungstiefen aufweisen. Dabei wurde für das Geschlecht, Alter und multiples Testen am Subjekt korrigiert. Des Weiteren wurden mit Hilfe einer Netzwerkanalyse Gruppierungen innerhalb des Mikrobioms nachgewiesen, welche sich durch Co-Exklusion und Co-Existenz voneinander abgrenzen. Schlussendlich wurde der Einfluss des Erkrankungsschweregrads auf die mikrobielle submuköse Dysbiose mit Hilfe des Mikrobiellen Dysbiose Index kalkuliert.

Insgesamt wurden 337 verschiedene Taxa im submukösen Biofilm unserer PI-Proben identifiziert. Zwölf Taxa traten dabei signifikant häufiger in Proben mit tieferen Sondierungstiefen auf. Gegensätzlich dazu waren 16 Taxa signifikant mit flacheren Taschen assoziiert. Die Netzwerkanalyse suggeriert die Existenz von zwei sich ausschließenden mikrobiellen Komplexen, welche mit flacheren bzw. tieferen Taschen assoziiert sind. Läsionen mit hohen Sondierungstiefen wiesen signifikant erhöhte Dysbiose-Werte auf.

Schlussfolgernd gehen Läsionen erhöhter Sondierungstiefe mit tiefgreifender Veränderung im submukösen Mikrobiom einher. Des Weiteren steigt auch der Grad der Dysbiose.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Osseointegration eines dentalen Implantates	9
Abb. 2: Periimplantäre Gesundheit	10
Abb. 3: Klassifikation der parodontalen und periimplantären Erkrankungen	12
Abb. 4: Periimplantitis	13
Abb. 5: Periimplantäre Mukositis	14
Abb. 6: Schematische Darstellung anatomischer und histologischer Begebenheiten um Zahn und Implantat	16
Abb. 7: Beispiel der Probenröhrchen für die Plaque-Proben	24
Abb. 8: Herstellung der Sequenzierungsbibliothek	26
Abb. 9: Cluster Amplifikation	27
Abb. 10: Sequenzierung	28
Abb. 11: MDI je Probe gegen Sondierungstiefe graphisch dargestellt	37
Abb. 12: Alpha-Diversitäts-Analyse	42
Abb. 13: Diagramm zur Hauptkoordinatenanalyse	43
Abb. 14: Netzwerk der signifikant mit PDmax assoziierten Taxa	45

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der Studienpopulation	36
Tab. 2: Mit PDmax signifikant assoziierte Taxa	39
Tab. 3: Eigenschaften der mit PDmax signifikant positiv assoziierten Taxa.....	40
Tab. 4: Eigenschaften der mit PDmax signifikant negativ assoziierten Taxa	41
Tab. 5: Adjazenzliste der Netzwerkanalyse	46

8. Literaturverzeichnis

Al-Ahmad, A., F. Muzaffery, A. C. Anderson, J. P. Wölber, P. Ratka-Krüger, T. Fretwurst, K. Nelson, K. Vach and E. Hellwig (2018). "Shift of microbial composition of peri-implantitis-associated oral biofilm as revealed by 16S rRNA gene cloning." Journal of Medical Microbiology.

Albrektsson, T., P. I. Branemark, H. A. Hansson and J. Lindstrom (1981). "Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man." Acta Orthop Scand **52**(2): 155-170.

Andrews, S. (2010). "FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data."

Apatzidou, D., D. F. Lappin, G. Hamilton, C. A. Papadopoulos, A. Konstantinidis and M. P. Riggio (2017). "Microbiome of peri-implantitis affected and healthy dental sites in patients with a history of chronic periodontitis." Arch Oral Biol **83**: 145-152.

Aronesty, E. (2011). "Command-line tools for processing biological sequencing data." Expression Analysis, Durham, NC.

Aruni, A. W., A. Mishra, Y. Dou, O. Chioma, B. N. Hamilton and H. M. Fletcher (2015). "Filifactor alocis--a new emerging periodontal pathogen." Microbes Infect **17**(7): 517-530.

Aruni, A. W., F. Roy and H. M. Fletcher (2011). "Filifactor alocis has virulence attributes that can enhance its persistence under oxidative stress conditions and mediate invasion of epithelial cells by porphyromonas gingivalis." Infect Immun **79**(10): 3872-3886.

Aruni, A. W., K. Zhang, Y. Dou and H. Fletcher (2014). "Proteome analysis of coinfection of epithelial cells with Filifactor alocis and Porphyromonas gingivalis shows modulation of pathogen and host regulatory pathways." Infect Immun **82**(8): 3261-3274.

Aruni, W., O. Chioma and H. M. Fletcher (2014). "Filifactor alocis: The Newly Discovered Kid on the Block with Special Talents." J Dent Res **93**(8): 725-732.

- Atsuta, I., Y. Ayukawa, R. Kondo, W. Oshiro, Y. Matsuura, A. Furuhashi, Y. Tsukiyama and K. Koyano (2016). "Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation." J Prosthodont Res **60**(1): 3-11.
- Baker, G. C., J. J. Smith and D. A. Cowan (2003). "Review and re-analysis of domain-specific 16S primers." J Microbiol Methods **55**(3): 541-555.
- Bates, D., M. Mächler, B. Bolker and S. Walker (2015). "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4." 2015 **67**(1): 48.
- Becker, S. T., B. E. Beck-Broichsitter, C. Graetz, C. E. Dorfer, J. Wiltfang and R. Hasler (2014). "Peri-implantitis versus periodontitis: functional differences indicated by transcriptome profiling." Clin Implant Dent Relat Res **16**(3): 401-411.
- Benjamini, Y., D. Drai, G. Elmer, N. Kafkafi and I. Golani (2001). "Controlling the false discovery rate in behavior genetics research." Behav Brain Res **125**(1-2): 279-284.
- Berglundh, T. (2019). "Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis - Guidance for clinicians." European Federation of Periodontology.
- Berglundh, T., G. Armitage, M. G. Araujo, G. Avila-Ortiz, J. Blanco, P. M. Camargo, S. Chen, D. Cochran, J. Derks, E. Figuero, C. H. F. Hammerle, L. J. A. Heitz-Mayfield, G. Huynh-Ba, V. Iacono, K. T. Koo, F. Lambert, L. McCauley, M. Quirynen, S. Renvert, G. E. Salvi, F. Schwarz, D. Tarnow, C. Tomasi, H. L. Wang and N. Zitzmann (2018). "Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions." J Clin Periodontol **45 Suppl 20**: S286-S291.
- Berglundh, T., N. U. Zitzmann and M. Donati (2011). "Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions?" J Clin Periodontol **38 Suppl 11**: 188-202.
- Bitrian, M., R. H. Gonzalez, G. Paris, K. J. Hellingwerf and C. B. Nudel (2013). "Blue-light-dependent inhibition of twitching motility in *Acinetobacter baylyi* ADP1: additive involvement of three BLUF-domain-containing proteins." Microbiology **159**(Pt 9): 1828-1841.

Boulangé, C. L., A. L. Neves, J. Chilloux, J. K. Nicholson and M. E. Dumas (2016). "Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease." Genome Med **8**(1): 42.

Branemark, P. I., R. Adell, U. Breine, B. O. Hansson, J. Lindstrom and A. Ohlsson (1969). "Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies." Scand J Plast Reconstr Surg **3**(2): 81-100.

Branemark, P. I., B. O. Hansson, R. Adell, U. Breine, J. Lindstrom, O. Hallen and A. Ohman (1977). "Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period." Scand J Plast Reconstr Surg Suppl **16**: 1-132.

Buffington, S. A., G. V. Di Prisco, T. A. Auchtung, N. J. Ajami, J. F. Petrosino and M. Costa-Mattioli (2016). "Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring." Cell **165**(7): 1762-1775.

Buser, D., S. F. Janner, J. G. Wittneben, U. Bragger, C. A. Ramseier and G. E. Salvi (2012). "10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients." Clin Implant Dent Relat Res **14**(6): 839-851.

Caporaso, J. G., K. Bittinger, F. D. Bushman, T. Z. DeSantis, G. L. Andersen and R. Knight (2010). "PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment." Bioinformatics **26**(2): 266-267.

Caporaso, J. G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Pena, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld and R. Knight (2010). "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data." Nat Methods **7**(5): 335-336.

Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, C. A. Lozupone, P. J. Turnbaugh, N. Fierer and R. Knight (2011). "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample." Proc Natl Acad Sci U S A **108** Suppl 1: 4516-4522.

- Carcuac, O. and T. Berglundh (2014). "Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions." J Dent Res **93**(11): 1083-1088.
- Carding, S., K. Verbeke, D. T. Vipond, B. M. Corfe and L. J. Owen (2015). "Dysbiosis of the gut microbiota in disease." Microb Ecol Health Dis **26**: 26191.
- Chan, Y. K., M. Estaki and D. L. Gibson (2013). "Clinical consequences of diet-induced dysbiosis." Ann Nutr Metab **63 Suppl 2**: 28-40.
- Chen, C., C. Hemme, J. Beleno, Z. J. Shi, D. Ning, Y. Qin, Q. Tu, M. Jorgensen, Z. He, L. Wu and J. Zhou (2018). "Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy." ISME J **12**(5): 1210-1224.
- Chen, T., W. H. Yu, J. Izard, O. V. Baranova, A. Lakshmanan and F. E. Dewhirst (2010). "The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information." Database (Oxford) **2010**: baq013.
- Chernoff, H. and E. L. Lehmann (1954). "The Use of Maximum Likelihood Estimates in χ^2 Tests for Goodness of Fit." Ann. Math. Statist. **25**(3): 579-586.
- Claffey, N., E. Clarke, I. Polyzois and S. Renvert (2008). "Surgical treatment of peri-implantitis." J Clin Periodontol **35**(8 Suppl): 316-332.
- Clarridge, J. E., 3rd (2004). "Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases." Clinical microbiology reviews **17**(4): 840-862.
- Colombo, A. P., S. Bennet, S. L. Cotton, J. M. Goodson, R. Kent, A. D. Haffajee, S. S. Socransky, H. Hasturk, T. E. Van Dyke, F. E. Dewhirst and B. J. Paster (2012). "Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray." J Periodontol **83**(10): 1279-1287.
- Cortelli, S. C., J. R. Cortelli, R. L. Romeiro, F. O. Costa, D. R. Aquino, P. R. Orzechowski, V. C. Araujo and P. M. Duarte (2013). "Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses." Arch Oral Biol **58**(1): 67-74.

- Davis, I. J., C. Wallis, O. Deusch, A. Colyer, L. Milella, N. Loman and S. Harris (2013). "A cross-sectional survey of bacterial species in plaque from client owned dogs with healthy gingiva, gingivitis or mild periodontitis." *PloS one* **8**(12): e83158-e83158.
- Degidi, M., D. Nardi and A. Piattelli (2012). "10-year follow-up of immediately loaded implants with TiUnite porous anodized surface." *Clin Implant Dent Relat Res* **14**(6): 828-838.
- Deng, Z. L., S. P. Szafranski, M. Jarek, S. Bhujju and I. Wagner-Dobler (2017). "Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host." *Sci Rep* **7**(1): 3703.
- Derks, J. and C. Tomasi (2015). "Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology." *J Clin Periodontol* **42 Suppl 16**: S158-171.
- Drescher, J., S. Schlafer, C. Schaudinn, B. Riep, K. Neumann, A. Friedmann, A. Petrich, U. B. Gobel and A. Moter (2010). "Molecular epidemiology and spatial distribution of *Seelenomonas* spp. in subgingival biofilms." *Eur J Oral Sci* **118**(5): 466-474.
- Ewing, B. and P. Green (1998). "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities." *Genome Research* **8**(3): 186-194.
- Ewing, B., L. Hillier, M. C. Wendl and P. Green (1998). "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment." *Genome Research* **8**(3): 175-185.
- Faggion, C. M., Jr., S. Listl and Y. K. Tu (2010). "Assessment of endpoints in studies on peri-implantitis treatment--a systematic review." *J Dent* **38**(6): 443-450.
- Falsen, E., M. D. Collins, C. Welinder-Olsson, Y. Song, S. M. Finegold and P. A. Lawson (2005). "Fastidiosipila sanguinis gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive, coccus-shaped organism from human blood." *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(Pt 2): 853-858.
- Faveri, M., L. C. Figueiredo, J. A. Shibli, P. J. Perez-Chaparro and M. Feres (2015). "Microbiological diversity of peri-implantitis biofilms." *Adv Exp Med Biol* **830**: 85-96.

Fischer, K. and T. Stenberg (2012). "Prospective 10-year cohort study based on a randomized controlled trial (RCT) on implant-supported full-arch maxillary prostheses. Part 1: sandblasted and acid-etched implants and mucosal tissue." Clin Implant Dent Relat Res **14**(6): 808-815.

Frey, K. G., J. E. Herrera-Galeano, C. L. Redden, T. V. Luu, S. L. Servetas, A. J. Mateczun, V. P. Mokashi and K. A. Bishop-Lilly (2014). "Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood." BMC Genomics **15**: 96.

Gao, X., J. Zhou, X. Sun, X. Li and Y. Zhou (2018). "Diversity analysis of subgingival microbial bacteria in peri-implantitis in Uygur population." Medicine (Baltimore) **97**(5): e9774.

Genco, R. J. and W. S. Borgnakke (2013). "Risk factors for periodontal disease." Periodontol 2000 **62**(1): 59-94.

Gevers, D., S. Kugathasan, L. A. Denson, Y. Vazquez-Baeza, W. Van Treuren, B. Ren, E. Schwager, D. Knights, S. J. Song, M. Yassour, X. C. Morgan, A. D. Kostic, C. Luo, A. Gonzalez, D. McDonald, Y. Haberman, T. Walters, S. Baker, J. Rosh, M. Stephens, M. Heyman, J. Markowitz, R. Baldassano, A. Griffiths, F. Sylvester, D. Mack, S. Kim, W. Crandall, J. Hyams, C. Huttenhower, R. Knight and R. J. Xavier (2014). "The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease." Cell Host Microbe **15**(3): 382-392.

Gotfredsen, K. (2012). "A 10-year prospective study of single tooth implants placed in the anterior maxilla." Clin Implant Dent Relat Res **14**(1): 80-87.

Heitz-Mayfield, L. J. and N. P. Lang (2010). "Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis." Periodontol 2000 **53**: 167-181.

Hojo, K., C. Mizoguchi, N. Taketomo, T. Ohshima, K. Gomi, T. Arai and N. Maeda (2007). "Distribution of salivary Lactobacillus and Bifidobacterium species in periodontal health and disease." Biosci Biotechnol Biochem **71**(1): 152-157.

J, G. C., G. Armitage, T. Berglundh, I. L. C. Chapple, S. Jepsen, S. K. K, L. M. B, P. N. Papapanou, M. Sanz and S. T. M (2018). "A new classification scheme for periodontal

and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification." J Clin Periodontol **45 Suppl 20**: S1-S8.

Jalava, J. and E. Eerola (1999). "Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 4**: 1375-1379.

Jasberg, H., E. Soderling, A. Endo, D. Beighton and A. Haukioja (2016). "Bifidobacteria inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model." Eur J Oral Sci **124**(3): 251-258.

Jensen, A., C. F. P. Scholz and M. Kilian (2016). "Re-evaluation of the taxonomy of the Mitis group of the genus *Streptococcus* based on whole genome phylogenetic analyses, and proposed reclassification of *Streptococcus dentisani* as *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* comb. nov., *Streptococcus tigurinus* as *Streptococcus oralis* subsp. *tigurinus* comb. nov., and *Streptococcus oligofermentans* as a later synonym of *Streptococcus cristatus*." Int J Syst Evol Microbiol **66**(11): 4803-4820.

Jervoe-Storm, P. M., H. Alahdab, M. Koltzsch, R. Fimmers and S. Jepsen (2007). "Comparison of curet and paper point sampling of subgingival bacteria as analyzed by real-time polymerase chain reaction." J Periodontol **78**(5): 909-917.

Jockel-Schneider, Y., B. Pretzel, B. Ehmke, U. Schlagenhauf, S. Sälzer, S. Abou-Ayash, R. Bürgers, S. Frantz, R. Kettner, S. Liepe, A. Moter, R. Müller, S. Riemer, S. Rupf, M. Schellmann, T. Schmitt and D. Ziebolz (2018). "s3-Leitlinie: Adjuvante systemische Antibiotikagabe bei subgingivaler Instrumentierung im Rahmen der systematischen Parodontitistherapie." AWMF online.

Klindworth, A., E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn and F. O. Glockner (2013). "Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies." Nucleic Acids Res **41**(1): e1.

Koyanagi, T., M. Sakamoto, Y. Takeuchi, N. Maruyama, M. Ohkuma and Y. Izumi (2013). "Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis and periodontitis." J Clin Periodontol **40**(3): 218-226.

Koyanagi, T., M. Sakamoto, Y. Takeuchi, M. Ohkuma and Y. Izumi (2010). "Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library." J Oral Microbiol **2**.

Kozich, J. J., S. L. Westcott, N. T. Baxter, S. K. Highlander and P. D. Schloss (2013). "Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform." Appl Environ Microbiol **79**(17): 5112-5120.

Kroger, A., C. Hulsmann, S. Fickl, T. Spinell, F. Huttig, F. Kaufmann, A. Heimbach, P. Hoffmann, N. Enkling, S. Renvert, F. Schwarz, R. T. Demmer, P. N. Papapanou, S. Jensen and M. Kepschull (2018). "The severity of human peri-implantitis lesions correlates with the level of submucosal microbial dysbiosis." J Clin Periodontol **45**(12): 1498-1509.

Kumar, P. S., E. J. Leys, J. M. Bryk, F. J. Martinez, M. L. Moeschberger and A. L. Griffen (2006). "Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing." J Clin Microbiol **44**(10): 3665-3673.

Kumar, P. S., M. R. Mason, M. R. Brooker and K. O'Brien (2012). "Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants." J Clin Periodontol **39**(5): 425-433.

Kuznetsova, A., P. B. Brockhoff and R. H. B. Christensen (2017). "lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models." Journal of Statistical Software.

Lafaurie, G. I., M. A. Sabogal, D. M. Castillo, M. V. Rincon, L. A. Gomez, Y. A. Lesmes and L. Chambrone (2017). "Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review." J Periodontol **88**(10): 1066-1089.

Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin and N. R. Pace (1985). "Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(20): 6955-6959.

- Lang, N. P., T. G. Wilson and E. F. Corbet (2000). "Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment." Clin Oral Implants Res **11 Suppl 1**: 146-155.
- Leshner, R. J., V. F. Gerencser and D. J. Morrison (1977). "Presence of *Rothia dentocariosa* strain 477 serotype 2 in gingiva of patients with inflammatory periodontal disease." J Dent Res **56**(2): 189.
- Lindhe, J., N. P. Lang and T. Karring (2008). "Clinical Periodontology and Implant Dentistry." Blackwell Munksgaard.
- Lindhe, J., J. Meyle and D. o. E. W. o. P. Group (2008). "Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology." J Clin Periodontol **35**(8 Suppl): 282-285.
- Lorenzo de Arriba, M., S. Lopez-Serrano, N. Galofre-Mila and V. Aragon (2018). "Characterisation of *Bergeyella* spp. isolated from the nasal cavities of piglets." The Veterinary Journal **234**: 1-6.
- Love, M. I., W. Huber and S. Anders (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." Genome Biology **15**(12): 550.
- Lozupone, C. and R. Knight (2005). "UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities." Appl Environ Microbiol **71**(12): 8228-8235.
- Mahobia, N., P. Chaudhary and Y. Kamat (2013). "Rothia prosthetic knee joint infection: report and mini-review." New Microbes New Infect **1**(1): 2-5.
- Marsh, P. D. (2015). "The commensal microbiota and the development of human disease - an introduction." J Oral Microbiol **7**: 29128.
- Maruyama, N., F. Maruyama, Y. Takeuchi, C. Aikawa, Y. Izumi and I. Nakagawa (2014). "Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis." Sci Rep **4**: 6602.
- Mashima, I. and F. Nakazawa (2014). "The influence of oral *Veillonella* species on biofilms formed by *Streptococcus* species." Anaerobe **28**: 54-61.

McMurdie, P. J. and S. Holmes (2014). "Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible." PLoS Comput Biol **10**(4): e1003531.

Medikeri, R. S., S. V. Lele, P. M. Jain, P. Mali and M. R. Medikeri (2015). "Quantification of *Selenomonas sputigena* in Chronic Periodontitis in Smokers Using 16S rDNA Based PCR Analysis." J Clin Diagn Res **9**(4): ZC13-17.

Mikkelsen, K. H., K. H. Allin and F. K. Knop (2016). "Effect of antibiotics on gut microbiota, glucose metabolism and body weight regulation: a review of the literature." Diabetes Obes Metab **18**(5): 444-453.

Moritz, C. and D. P. Faith (1998). "Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation." Molecular Ecology **7**(4): 419-429.

Nakazato, T., T. Ohta and H. Bono (2013). "Experimental design-based functional mining and characterization of high-throughput sequencing data in the sequence read archive." PLoS One **8**(10): e77910.

Nelson, M. C., H. G. Morrison, J. Benjamino, S. L. Grim and J. Graf (2014). "Analysis, optimization and verification of Illumina-generated 16S rRNA gene amplicon surveys." PLoS One **9**(4): e94249.

Newton, H. J., D. K. Y. Ang, I. R. van Driel and E. L. Hartland (2010). "Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*." Clinical microbiology reviews **23**(2): 274-298.

Ohara-Nemoto, Y., K. Kishi, M. Satho, S. Tajika, M. Sasaki, A. Namioka and S. Kimura (2005). "Infective endocarditis caused by *Granulicatella elegans* originating in the oral cavity." J Clin Microbiol **43**(3): 1405-1407.

Oliveira, L. F., S. L. Salvador, P. H. Silva, F. A. Furlaneto, L. Figueiredo, R. Casarin, E. Ervolino, D. B. Palioto, S. L. Souza, M. Taba, Jr., A. B. Novaes, Jr. and M. R. Messoria (2017). "Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis." J Periodontol **88**(2): 197-208.

Peltroche-Llacsahuanga, H., E. Reichhart, W. Schmitt, R. Lutticken and G. Haase (2000). "Investigation of infectious organisms causing pericoronitis of the mandibular third molar." J Oral Maxillofac Surg **58**(6): 611-616.

Persson, G. R., E. Samuelsson, C. Lindahl and S. Renvert (2010). "Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a single-blinded randomized longitudinal clinical study. II. Microbiological results." J Clin Periodontol **37**(6): 563-573.

Ramanan, P., J. N. Barreto, D. R. Osmon and P. K. Tosh (2014). "Rothia bacteremia: a 10-year experience at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota." J Clin Microbiol **52**(9): 3184-3189.

Renvert, S., I. Polyzois and R. Maguire (2009). "Re-osseointegration on previously contaminated surfaces: a systematic review." Clin Oral Implants Res **20 Suppl 4**: 216-227.

Renvert, S. and M. Quirynen (2015). "Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review." Clin Oral Implants Res **26 Suppl 11**: 15-44.

Renvert, S., A. M. Roos-Jansaker and N. Claffey (2008). "Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review." J Clin Periodontol **35**(8 Suppl): 305-315.

Renvert, S., E. Samuelsson, C. Lindahl and G. R. Persson (2009). "Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a double-blind randomized longitudinal clinical study. I: clinical results." J Clin Periodontol **36**(7): 604-609.

Rinke, C., P. Schwientek, A. Sczyrba, N. N. Ivanova, I. J. Anderson, J. F. Cheng, A. Darling, S. Malfatti, B. K. Swan, E. A. Gies, J. A. Dodsworth, B. P. Hedlund, G. Tsiamis, S. M. Sievert, W. T. Liu, J. A. Eisen, S. J. Hallam, N. C. Kyrpides, R. Stepanauskas, E. M. Rubin, P. Hugenholtz and T. Woyke (2013). "Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter." Nature **499**(7459): 431-437.

Sahrman, P., T. Attin and P. R. Schmidlin (2011). "Regenerative treatment of peri-implantitis using bone substitutes and membrane: a systematic review." Clin Implant Dent Relat Res **13**(1): 46-57.

Salvi, G. E., R. Cosgarea and A. Sculean (2017). "Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Diseases." J Dent Res **96**(1): 31-37.

Sanz-Martin, I., J. Doolittle-Hall, R. P. Teles, M. Patel, G. N. Belibasakis, C. H. F. Hammerle, R. E. Jung and F. R. F. Teles (2017). "Exploring the microbiome of healthy and diseased peri-implant sites using Illumina sequencing." J Clin Periodontol **44**(12): 1274-1284.

Schell, M. A., M. Karmirantzou, B. Snel, D. Vilanova, B. Berger, G. Pessi, M. C. Zwahlen, F. Desiere, P. Bork, M. Delley, R. D. Pridmore and F. Arigoni (2002). "The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14422-14427.

Schroeder, A., O. Pohler and F. Sutter (1976). "[Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer]." SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd **86**(7): 713-727.

Schwager, E. and C. Bielski (in progress). "Detecting statistically significant associations between sparse and high dimensional compositional data."

Shaddox, L. M., H. Huang, T. Lin, W. Hou, P. L. Harrison, I. Aukhil, C. B. Walker, V. Klepac-Ceraj and B. J. Paster (2012). "Microbiological characterization in children with aggressive periodontitis." J Dent Res **91**(10): 927-933.

Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski and T. Ideker (2003). "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." Genome Res **13**(11): 2498-2504.

Shiba, T., T. Watanabe, H. Kachi, T. Koyanagi, N. Maruyama, K. Murase, Y. Takeuchi, F. Maruyama, Y. Izumi and I. Nakagawa (2016). "Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms." Sci Rep **6**: 30997.

Shukla, S. K., D. L. Paustian, P. J. Stockwell, R. E. Morey, J. G. Jordan, P. N. Levett, D. N. Frank and K. D. Reed (2004). "Isolation of a fastidious *Bergeyella* species associated

with cellulitis after a cat bite and a phylogenetic comparison with *Bergeyella zoohelcum* strains." J Clin Microbiol **42**(1): 290-293.

Simon, M., C. Scheuner, J. P. Meier-Kolthoff, T. Brinkhoff, I. Wagner-Dobler, M. Ulbrich, H. P. Klenk, D. Schomburg, J. Petersen and M. Goker (2017). "Phylogenomics of Rhodobacteraceae reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats." ISME J **11**(6): 1483-1499.

Sizova, M. V., P. A. Muller, D. Stancyk, N. S. Panikov, M. Mandalakis, A. Hazen, T. Hohmann, S. N. Doerfert, W. Fowle, A. M. Earl, K. E. Nelson and S. S. Epstein (2014). "Oribacterium parvum sp. nov. and Oribacterium asaccharolyticum sp. nov., obligately anaerobic bacteria from the human oral cavity, and emended description of the genus Oribacterium." Int J Syst Evol Microbiol **64**(Pt 8): 2642-2649.

Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2005). "Periodontal microbial ecology." Periodontol **2000** **38**: 135-187.

Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith and R. L. Kent, Jr. (1998). "Microbial complexes in subgingival plaque." J Clin Periodontol **25**(2): 134-144.

Sohngen, C., A. Podstawka, B. Bunk, D. Gleim, A. Vetcinina, L. C. Reimer, C. Ebeling, C. Pendarovski and J. Overmann (2016). "BacDive--The Bacterial Diversity Metadatabase in 2016." Nucleic Acids Res **44**(D1): D581-585.

Sousa, V., N. Mardas, B. Farias, A. Petrie, I. Needleman, D. Spratt and N. Donos (2016). "A systematic review of implant outcomes in treated periodontitis patients." Clin Oral Implants Res **27**(7): 787-844.

Souto, R., C. M. Silva-Boghossian and A. P. Colombo (2014). "Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection." Braz J Microbiol **45**(2): 495-501.

Stacchi, C., F. Berton, G. Perinetti, A. Frassetto, T. Lombardi, A. Khoury, F. Andolsek and R. Di Lenarda (2016). "Risk Factors for Peri-Implantitis: Effect of History of Periodontal Disease and Smoking Habits. A Systematic Review and Meta-Analysis." J Oral Maxillofac Res **7**(3): e3.

- Tamaki, H., C. L. Wright, X. Li, Q. Lin, C. Hwang, S. Wang, J. Thimmapuram, Y. Kamagata and W. T. Liu (2011). "Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 next-generation titanium sequencing platform." PLoS One **6**(9): e25263.
- Tamura, N., M. Ochi, H. Miyakawa and F. Nakazawa (2013). "Analysis of bacterial flora associated with peri-implantitis using obligate anaerobic culture technique and 16S rDNA gene sequence." Int J Oral Maxillofac Implants **28**(6): 1521-1529.
- Team, R. D. C. (2008). "R: A Language and environment for statistical computing."
- Tringe, S. G. and P. Hugenholtz (2008). "A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene." Curr Opin Microbiol **11**(5): 442-446.
- Vartoukian, S. R., J. Downes, R. M. Palmer and W. G. Wade (2013). "Fretibacterium fastidiosum gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity." Int J Syst Evol Microbiol **63**(Pt 2): 458-463.
- Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje and J. R. Cole (2007). "Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy." Appl Environ Microbiol **73**(16): 5261-5267.
- Wang, Y. and P. Y. Qian (2009). "Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies." PLoS One **4**(10): e7401.
- Woo, P. C., S. K. Lau, J. L. Teng, H. Tse and K. Y. Yuen (2008). "Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories." Clin Microbiol Infect **14**(10): 908-934.
- Wyss, C., F. E. Dewhirst, R. Gmur, T. Thurnheer, Y. Xue, P. Schupbach, B. Guggenheim and B. J. Paster (2001). "Treponema parvum sp. nov., a small, glucuronic or galacturonic acid-dependent oral spirochaete from lesions of human periodontitis and acute necrotizing ulcerative gingivitis." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 3): 955-962.
- Yan, A. W., D. E. Fouts, J. Brandl, P. Starkel, M. Torralba, E. Schott, H. Tsukamoto, K. E. Nelson, D. A. Brenner and B. Schnabl (2011). "Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease." Hepatology **53**(1): 96-105.

Yang, B., Y. Wang and P.-Y. Qian (2016). "Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis." BMC Bioinformatics **17**(1): 135.

Yutin, N. and M. Y. Galperin (2013). "A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia." Environ Microbiol **15**(10): 2631-2641.

Zheng, H., L. Xu, Z. Wang, L. Li, J. Zhang, Q. Zhang, T. Chen, J. Lin and F. Chen (2015). "Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants." Sci Rep **5**: 10948.

Zheng, W., T. K. Tan, I. C. Paterson, N. V. Mutha, C. C. Siow, S. Y. Tan, L. A. Old, N. S. Jakubovics and S. W. Choo (2016). "StreptoBase: An Oral Streptococcus mitis Group Genomic Resource and Analysis Platform." PLoS One **11**(5): e0151908.

9. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Unterstützern dieser Arbeit rechtherzlich bedanken. Dank geht dabei an die vielen Kollegen, die diese Arbeit ermöglicht haben, ebenso wie dem NGS-Labor des Bonner Universitätsklinikums.

Besonderer Dank gilt darüber hinaus und vor allem meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. dent. Moritz Keschull - für die jahrelange Unterstützung, Geduld und unbezahlbaren Ratschläge, die ich auch in Zukunft nicht missen möchte.