

Veränderungen des subgingivalen Mikrobioms nach subgingivaler Instrumentierung und 3- oder 7-tägiger Antibiotikagabe bei Parodontitispatienten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med. dent.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Johannes Harald Jakob Weber

aus Bitburg

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. Isabelle Béatrice Bekeredjian-Ding
2. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Bierbaum

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.07.2025

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie
Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde

Meiner größten Unterstützung gewidmet

für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	9
1.1. Parodontitis - Diagnostik und Klassifikation	9
1.2. Das orale Mikrobiom	11
1.3. Pathogenese der Parodontitis	12
1.4. Nicht-chirurgische Therapiemaßnahmen bei Parodontitis-Erkrankten	17
1.5. Systemische Antibiotika in der Parodontaltherapie	17
1.5.1. Auswirkungen der Antibiotikatherapie	20
1.6. Mikrobiomanalyse durch Sequenziertechnologien der nächsten Generation	22
1.6.1. Mikrobiomanalyse mittels 16S ribosomale RNA Metagenom-Sequenzierung	24
1.6.2. Gesamt-Genom-Schrotschussesequenzierung mit Oxford Nanopore Technologies	24
1.6.3. Gesamt-Genom-Amplifikation	25
1.7. Hypothesen und Fragestellung	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Patientenkollektiv und durchgeführte Therapie	27
2.2. Klinisches Protokoll	27
2.3. Probenentnahme	28
2.4. Extraktion verwendeter DNA-Proben	29
2.4.1. Bestimmung der Probenreinheit und des DNA-Gehalts	29
2.5. Amplifikation des prokaryotischen ribosomalen RNA-Gens mittels Polymerasekettenreaktion für Metagenom-Sequenzierung mit dem Illumina Miseq Sequenzierer	29
2.5.1. Nachweis des Amplifikats durch gelelektrophoretische Auftrennung	31
2.5.2. Aufreinigung des PCR-Produkts	31

2.5.3.	Index PCR	32
2.5.4.	Fluorometrische Quantifizierung der indexierten Proben	33
2.5.5.	Vereinigung der Proben	34
2.5.6.	Sequenzieren	34
2.5.7.	Bioinformatische Auswertung	34
2.6.	Kultivierung des <i>Porphyromonas gingivalis</i>	36
2.6.1.	Isolation der genomischen <i>Porphyromonas gingivalis</i> DNA	37
2.6.2.	Durchführung der Gesamtgenomamplifikation (WGA)	38
2.6.3.	Fluorometrische Quantifizierung und Fragmentanalyse des Genomamplikats	39
2.6.4.	Erste Aufreinigung des Gesamtgenomamplikats	39
2.7.	Transposase-basierte Erstellung einer DNA-Library eines <i>P. gingivalis</i> -Gesamtgenom-Amplikats sowie einer Negativkontrolle für die Nanoporen-Sequenzierung	40
2.7.1.	Vorbereitung und Beladung der Flow Cell für die Nanoporen-Sequenzierung	41
2.7.2.	Gesamtgenomamplifikation, Amplifikatkontrolle und Aufreinigung von Probanden-DNA	41
2.7.3.	Ligationsbasiertes erstellen der DNA-Library des Gesamtgenomamplikats einer Probandenprobe für die Nanoporen-Sequenzierung	42
2.7.4.	Vorbereitung und Beladung der Flow Cell für die Nanoporen-Sequenzierung der Probandenprobe	44
2.7.5.	Bioinformatische Auswertung der Nanoporen-Sequenzierung	44
2.8.	Laborgeräte und Software	45
2.9.	Verbrauchsmaterialien	46
2.10.	Benutzerhandbücher und Protokolle	49
2.11.	Verwendete Primer	50
3.	Ergebnisse	51
3.1.	Aufstellung des Patientenkollektivs	51
3.2.	Ergebnisse der Illumina-Sequenzierung	51

3.3.	Ergebnisse der Oxford Nanoporen Sequenzierung	65
4.	Diskussion	66
5.	Zusammenfassung	72
6.	Anhang	74
7.	Abbildungsverzeichnis	80
8.	Tabellenverzeichnis	82
9.	Literaturverzeichnis	83
10.	Erklärung zum Eigenanteil	95

Abkürzungsverzeichnis

A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AMX	Amoxicillin
BOP	Bleeding On Probing
CAL	Clinical Attachment Loss
DNA	Desoxyribonukleinsäure
F. nucleatum	Fusobakterium nucleatum
FMPS	Full Mouth Plaque Score
Ig	Immunglobulin
MDA	Multiple Displacement Amplification
MET	Metronidazol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
P. intermedia	Prevotella intermedia
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDL	Parodontales Ligament
pH	pondus Hydrogenii
PSI	Parodontal Screening Index
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RpoS	RNA Polymerase Sigma-Faktor
S.	Streptococcus
SI	Subgingivale Instrumentierung
T. denticola	Treponema denticola
T. forsythia	Tannerella forsythia
TST	tastbare Sondierungstiefe
Vgl.	vergleiche
WGA	Whole Genome Amplification
WGS	Whole Genome Sequencing

1. Einleitung

1.1. Parodontitis - Diagnostik und Klassifikation

Parodontitis, als Teil der Gruppe von parodontalen Erkrankungen und Zuständen, ist trotz der sich stetig fortentwickelnden Maßnahmen zur Prävention eine hoch prävalente Erkrankung in industrialisierten Ländern (Kassebaum et al., 2014; Tonetti et al., 2015). In Deutschland sind über 50 % der Erwachsenen von einer Parodontitis betroffen (Jordan et al., 2014). Ihre Pathomechanismen beschränken sich nicht nur auf die orale Kavität, sondern sind darüber hinaus mit Krankheiten, wie beispielsweise Diabetes Mellitus oder Arteriosklerose, assoziiert (Almeida et al., 2018; Demmer et al., 2012).

Der Diagnose und der darauffolgenden Behandlungsnotwendigkeit sowie der Behandlungsplanung einer Parodontalerkrankung muss die Befunderhebung vorausgehen (Tonetti et al., 2015). Um den parodontal Gesunden von dem parodontal Erkrankten im Rahmen des Vorsorgebesuchs beim Zahnarzt zeiteffizient unterscheiden zu können, wird ein parodontales Screening durchgeführt. Dafür werden die Kiefer in Sextanten unterteilt und um jeden Zahn wird zirkulär sondiert. Unter Beachtung der tastbaren Sondierungstiefe (TST), Blutung auf Sondierung (BOP) sowie weiterer Parameter wird eine Einteilung in ein Codesystem für jeden Sextanten vorgenommen. Die Codes stellen die Indikation für die weitere parodontale Befunderhebung dar (Ainamo et al., 1982). Bei einem PSI-Code von 4 und sichtbarem radiologischen Knochenabbau sollte eine weitere parodontalspezifische Befunderhebung stattfinden (Tonetti und Sanz, 2019).

Ergab das Screening Veranlassung zu weiteren Parodontalbefunden, so wird nun überprüft, ob der klinische Attachmentverlust von lokalen Faktoren wie beispielsweise Wurzelfrakturen, retinierten Molaren oder Karies ausgeht. Kann dies ausgeschlossen werden und der klinische Attachmentverlust geht nach 6-Punktsondierung jedes Zahnes von mehr als zwei nicht benachbarten Zähnen aus, wird zusätzlich eine Röntgendiagnostik durchgeführt, um das Knochenniveau zu beurteilen (Tonetti und Sanz, 2019). Weiterhin dient das Bluten auf Sondieren als das signifikanteste klinische Entzündungsmerkmal und Zeichen für parodontale Entzündung (Lang et al., 1990). Liegen TST-Werte von 4 mm oder höher vor, wird die Parodontitis nach Stadien (Staging) und Gradeinteilung (Grading) weiter beurteilt. Dazu werden weitere parodontalspezifische Parameter erhoben, welche

nach Anwendung in der Staging- und Gradingtabelle (Abb. 1) Aufschluss über Schwere, Komplexität und Progression geben. Das Staging sieht eine Einordnung in Stadium I bis IV vor und beschreibt das Stadium der Krankheit, abhängig vom Schweregrad der Diagnose. Das Grading zielt darauf ab, die Rate der Krankheitsprogression zu beurteilen, wobei signifikante Risikofaktoren wie das Rauchen oder eine Diabetes-Mellitus-Erkrankung berücksichtigt werden (Sanz et al., 2020a).

Parodontitis-Stadium Staging	Stadium I	Stadium II		Stadium III	Stadium IV
Schweregrad	interdentaler CAL an Stellen mit höchstem Verlust	1 - 2 mm	3 - 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	Knochenabbau	< 15 %	15 – 33 %	> 33 %	> 33 %
	Zahnverlust aufgrund von Parodontitis	kein Zahnverlust	kein Zahnverlust	≤ 4 Zähne	≥ 5 Zähne
Komplexität	lokal	ST ≤ 4 mm Vorwiegend horizontaler KA	ST 5 mm Vorwiegend horizontaler KA	Zusätzlich zu Stadium II: ST ≥ 6 mm Vertikaler KA ≥ 3 mm Furkationsbefall Grad II oder III	Zusätzlich zu Stadium III: Komplexe Rehabilitation erforderlich durch: - Mastikatorische Dysfunktion - Sekundäres okklusales Trauma (Zahnbeweglichkeit ≥ Grad 2) - Zahnwanderung - Ausgeprägten Kammdedefekt - Bisshöhenverlust - < 20 Restzähne (10 okkludierende Paare)
Ausmaß und Verteilung	Wird zur genaueren Beschreibung des Staging verwendet	für jedes Stadium Ausmaß als lokalisiert (< 30 % der Zähne betroffen), generalisiert oder Molaren-Inzisivi-Muster beschreiben			

Parodontitis Grading			Grad A: Langsame Progressionsrate	Grad B: Moderate Progressionsrate	Grad C: Rasche Progressionsrate
Primäre Kriterien	Direkte Evidenz für Progression	Longitudinale Daten für KA oder CAL	Kein Verlust	< 2 mm über 5 Jahre	≥ 2 mm über 5 Jahre
	Indirekte Evidenz für Progression	KA (%) / Alter	< 0,25	0,25 – 1,0	> 1,0
		Phänotyp	- Erheblicher Biofilm mit geringer parodontaler Destruktion	- Zerstörung proportional zum Biofilm	- Zerstörung überproportional zum Biofilm - Episoden rapider Zerstörung - Früher Erkrankungsbeginn
Modifikatoren	Risikofaktoren	Rauchen	Nichtraucher	Raucher < 10 Zigaretten / Tag	Raucher ≥ 10 Zigaretten / Tag
		Diabetes	Kein Diabetiker, normoglykämisch	HbA1c < 7,0 % bei Patienten mit Diabetes	HbA1c ≥ 7,0 % bei Patienten mit Diabetes

Abb. 1 Staging- und Gradingssystem der Parodontitis (Inhalt aus: (Dannewitz et al., 2021))

1.2. Das orale Mikrobiom

Durch die vielen verschiedenen Strukturen, die die Mundhöhle bietet (Zähne, gingivaler Sulkus, befestigte Gingiva, Zunge, Lippe, harte und weiche Gaumen, Wangen), ergeben sich Lebensräume für eine Fülle von Mikroorganismen, die man in deren Gesamtheit als Mikrobiom bezeichnet (Dewhirst et al., 2010). Neben den Mikroorganismen auf beziehungsweise in den Strukturen der Mundhöhle werden auch die Mikroorganismen auf den daran angrenzenden Bereichen (wie Mandeln, Rachen, Speiseröhre, Eustachische Röhre, Mittelohr, Luftröhre, Lunge, Nasengänge, Nebenhöhlen), bis zum distalen Oesophagus zum sogenannten oralen Mikrobiom gezählt (Mager et al., 2003).

Von den circa 700 vorkommenden Spezies des oralen Mikrobioms konnten bisher lediglich etwa die Hälfte kultiviert werden (Paster et al., 2001). Erst die kulturunabhängigen Methoden, wie die 16S-rRNA-Gensequenzierung (siehe Abschnitt 1.5.1), ermöglichten die Bestimmung der bisher nicht detektierten Spezies (Dewhirst et al., 2010).

Als Eintrittspforte in den Körper bietet das Besiedlungsareal des oralen Mikrobioms großes Potential einer Ausbreitung der zunächst lokal begrenzten Pathologien. Neben infektiösen Erkrankungen wie Karies, Parodontitis oder der Tonsillitis können die oralen Spezies auch mit systemischen Erkrankungen wie Pneumonien, Diabetes oder kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Almeida et al., 2018; Jepsen et al., 2011b; Sanz et al., 2020b). Mit der Gewissheit, dass sich die Bakterien in komplexen Biofilmen in Abhängigkeit von äußeren Faktoren organisieren, wurde deutlich, dass für viele Erkrankungen wie beispielsweise Karies oder Parodontitis nicht nur ein bestimmtes Bakterium eine Rolle spielt, sondern vielmehr das Zusammenspiel vieler Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen, dem Wirt und exogenen Faktoren (Jenkinson und Lamont, 2005).

Die vorherrschenden Stämme der oralen bakteriellen Gemeinschaft setzen sich zu 96 % aus Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Spirochäten, Fusobacteria und Bacteroidetes zusammen (Dewhirst et al., 2010). Die konkrete Zusammensetzung des Mikrobioms variiert jedoch erheblich. Die Ernährung beeinflusst das orale Mikrobiom, indem die dadurch bereitgestellten Nahrungsressourcen selektiv von den am besten an die aktuelle Situation des Wirtes angepassten Bakterien zu deren Vorteil genutzt werden (Moye et al., 2014). Die im Laufe der Zeit veränderten Grundnahrungsmittel wie Milchprodukte,

raffinierte Pflanzenöle oder verarbeitete Getreidekörner haben zu pathologischen Veränderungen geführt, wie einer Zunahme von säureproduzierenden, säuretoleranten sowie parodontalen Pathogenen (Adler et al., 2013; Moye et al., 2014). Da die Mundhöhle ständig dem Einfluss der Außenwelt ausgesetzt ist, herrscht eine sich ständig ändernde Dynamik auf mikrobiologischer Ebene, die sich im physiologischen Zustand stets in Symbiose befindet. Ist der Wirt in einem Zustand, bei dem die Symbiose gestört ist, wie es beispielsweise bei Immunsupprimierten der Fall ist, können sich durch das Ungleichgewicht Pathologien entwickeln und / oder sich ortsfremde Keime einnisten, wie Darmkoliforme, Hefen oder Koagulase positive Staphylokokken (Jobbins et al., 1992; Wade, 2013).

1.3. Pathogenese der Parodontitis

Üblicherweise bilden Mikroorganismen auf Oberflächen einen Biofilm. Falls dieser nicht durch Mundhygienemaßnahmen zerstört oder entfernt wird, haben Bakterien die Chance, geschützt durch eine Matrix aus Kapsel-Polysacchariden, sich ungehindert fortzuentwickeln (Bascones-Martínez und Figuero-Ruiz, 2004). Dadurch können sie voneinander profitieren, indem beispielsweise das verstoffwechselte Substrat einer Spezies die Ernährungsgrundlage für eine andere bildet. Weiterhin entsteht aus einem rein aeroben Milieu eine Lebensgrundlage für Anaerobier, was die Diversität erhöht. Die Kommunikation mittels Signalmolekülen und die Einbettung in eine Matrix machen den Biofilm zunehmend weniger angreifbar für körpereigene Abwehrmechanismen (Marsh, 2003). Somit können die Mikroorganismen bei fehlenden Mundhygienemaßnahmen ungehindert proliferieren und Entzündungsreaktionen auslösen (Löe et al., 1965).

Ursprünglich ging man davon aus, dass die schlichte Menge an Bakterien, unabhängig von der Spezies, ausschlaggebend für die entzündlichen Prozesse waren, welche bis zum Überschreiten eines Schwellenwerts vom Körper toleriert würden und schließlich in einer Entzündungsreaktion mündeten (Loesche, 1973). Dies wurde aus der Beobachtung gefolgert, dass der Entzündungsprozess reversibel schien, da die klinischen Entzündungszeichen nach Wiederaufnahme der Mundhygiene nachließen (Löe et al., 1965; Theilade et al., 1966).

Bis heute ist diese Theorie unter dem Namen der unspezifischen Plaquehypothese bekannt und hat nach wie vor Relevanz im Hinblick auf die Prophylaxe von Mundhöhlenerkrankungen (Rosier et al., 2014).

Löe untersuchte eine Gruppe von 480 Menschen über mehrere Jahre, welche keine Mundhygienemaßnahmen betrieben sowie keinen Zugang zu zahnmedizinischer Versorgung hatten und stellte fest, dass trotz universell starker Biofilmanlagerungen und Entzündungszeichen unterschiedlich ausgeprägte Progredienz oder sogar keine Progredienz der gingivalen Entzündungen stattfand (Löe et al., 1986). Simultan wurde in mikrobiologischen Untersuchungen bestätigt, dass die Pathogenität mit der Anwesenheit bestimmter Spezies korreliert und der sub- mit dem supragingivalen Biofilm assoziiert ist, deren Eigenschaften jedoch voneinander abweichen (Theilade, 1986; Ximénez-Fyvie et al., 2000). Die nunmehr spezifische Plaquehypothese bedingte die Differenzierung der Bakterien je nach Auftreten in eigene Komplexe (Socransky et al., 2002). Socransky nutzte Hybridisierungstechniken und die daraus resultierenden Bakterienzahlen aus über 13000 Biofilmproben, um Cluster zu entwickeln. Dabei wurden 40 verschiedene Bakterienarten bestimmt. Die patientenindividuellen Bakterienprofile wurden unter Berücksichtigung parodontaler Diagnosen und Behandlungszeitpunkten miteinander verglichen und anhand dessen in Komplexe unterteilt. Die pyramidenförmige Grafik zeigt die Unterteilung der Bakterien je nach Eigenschaften und Pathogenität (Abb. 2) (Socransky et al., 1998; Socransky et al., 2002).

Als Erstbesiedler in einem oralen Biofilm gelten vor allem Streptokokken und Actinomyeten, da diese die Fähigkeit besitzen über Oberflächenrezeptoren an die glykoproteinreiche Zahnoberfläche anzudocken (Nobbs et al., 2009). Daran schließt sich die Besiedlung von Vertretern des violetten und orangen Komplexes an, wovon beispielsweise *Veillonella* als Substratgrundlage für die weitere Kolonisation von potentiell pathogenen Mikroorganismen dienen. *F. nucleatum* und *P. intermedia* spielen als Bakterien des orangen Komplexes eine Rolle als Brückenorganismen bei der Vereinigung von Früh- mit Spätbesiedlern durch ihre einzigartige Koaggregationsfähigkeiten (Jakubovics, 2015; Lamont et al., 2018). Die Pathogenität des orangenen Komplexes beruht nicht auf Toxinen, sondern auf der Schaffung einer Überlebensgrundlage für Anaerobier (He et al., 2016). *P. gingivalis*, ein Mitglied des roten Komplexes, ist stark mit parodontaler Destruktion assoziiert (Haffajee und Socransky, 2005; Socransky et al., 1998; Tanner et al., 1979). Jüngst

konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Menge an *P. gingivalis* am ehesten mit den klinischen Parametern des Parodontalstatus der Patienten in Verbindung gebracht werden kann (Chigasaki et al., 2021). Trotzdem sollte nicht unerwähnt bleiben, dass *P. gingivalis* auch bei parodontal Gesunden nachweisbar ist (Abusleme et al., 2013).

T. forsythia und *T. denticola* zeigen proteolytische und hämolytische Aktivität und wirken destruktiv auf die Wirtsmechanismen (Tan et al., 2001; Yao et al., 1996).

Die Bakterien der anderen Komplexe wird eine geringere pathogene Rolle bis zu parodontaler Nützlichkeit zugesprochen (Socransky et al., 1988). *A. actinomycetemcomitans* gilt, obwohl er nicht dem roten Komplex zugeordnet wird, als signifikant pathogen (Belibasakis et al., 2019). Er hat die Fähigkeit, die von dem Wirt ausgehenden neutrophilen Granulozyten und das Komplementsystem zu neutralisieren. Das bietet die kurzfristige Möglichkeit der Etablierung für weitere Parodontalpathogene und führt zu einer überschießenden Immunreaktion des Wirts, was die Destruktion durch körpereigene Zytokine verstärkt (Belibasakis et al., 2019; Fine et al., 2019). Die spezifische Plaquehypothese mit ihrer stringenten Unterteilung in Komplexe und deren Wechselwirkungen wurde durch die Forschung kontinuierlich erweitert. So hat sich abgezeichnet, dass das Zusammenspiel des Biofilms, begleitet von Umwelt- und Verhaltensfaktoren, maßgeblich die orale Gesundheit bestimmt. Zusätzlich wird diese durch genetische und epigenetische Faktoren beeinflusst (Meyle und Chapple, 2015).

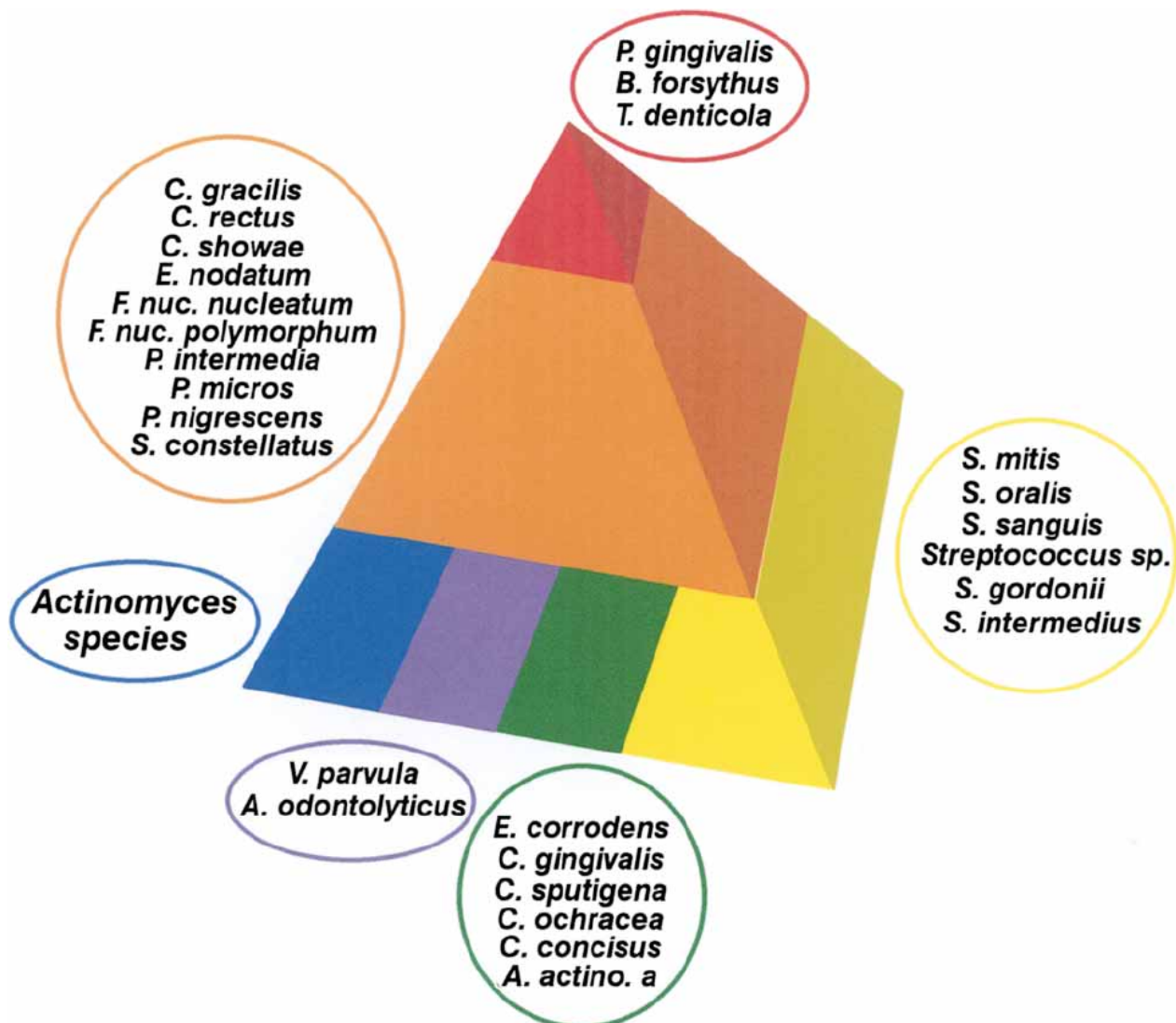


Abb. 2: Graphik oraler mikrobiologischer Komplexe mit ökologischer und zeitlicher Abfolge der Biofilmbildung von Frühbesiedlern (blau, violett, grün gelb), darunter auch die potentiell pathogene *Actinomyces*-Spezies, bilden die Basis, während späte Kolonisierer (orange, rot) zunehmend mit parodontaler Erkrankung assoziiert sind. Jede Farbe unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Bakterienarten, Funktionen und Relevanz für die Biofilmbildung. (Socransky und Haffajee, 2002)

Risikofaktoren wie das Rauchen oder ein schlecht eingestellter Diabetes Mellitus können die Immunantwort ebenso negativ modulieren wie das überproportionale Vorhandensein von Biofilm (Demmer et al., 2012; Nociti et al., 2015). Zusätzlich spielen genetische Faktoren ebenfalls eine direkte Rolle bei der Komposition der Mikroflora. Als eine Erkrankung, die das Parodont indirekt potentiell negativ beeinflusst, gilt der genetisch bedingte Diabetes Mellitus (Nibali et al., 2017). Durch die Oberflächenkonstitution der Zähne und das nährstoffreiche Milieu, in dem sie sich befinden, sind den Bakterien sehr günstige

Bedingungen gegeben, in denen sie sich bei ausbleibender Mundhygienemaßnahmen langfristig anlagern und organisieren können (Kilian et al., 2016). Zeigt sich das Parodont klinisch gesund, ist dennoch histologisch ein begrenztes Maß an Entzündungsinfiltrat nachweisbar. Nimmt die Bakterienkolonisation überhand, so kann dies eine auf die Gingiva begrenzte Entzündungsreaktion hervorrufen. Das symbiotische Zusammenspiel ist gestört, was sich klinisch als Gingivitis äußert. Wird dieses Stadium nicht revidiert, kann dies den Bindegewebs- und Knochenstoffwechsel, insbesondere bei anfälligen Wirten, langfristig zu einem Abbau zwingen. Es herrschen chronisch dysbiotische und entzündliche Verhältnisse, welche als Parodontitis bezeichnet werden. Abbildung 3 veranschaulicht die parodontal beeinflussenden Faktoren und was diese im Parodont auslösen können. (Meyle und Chapple, 2015).

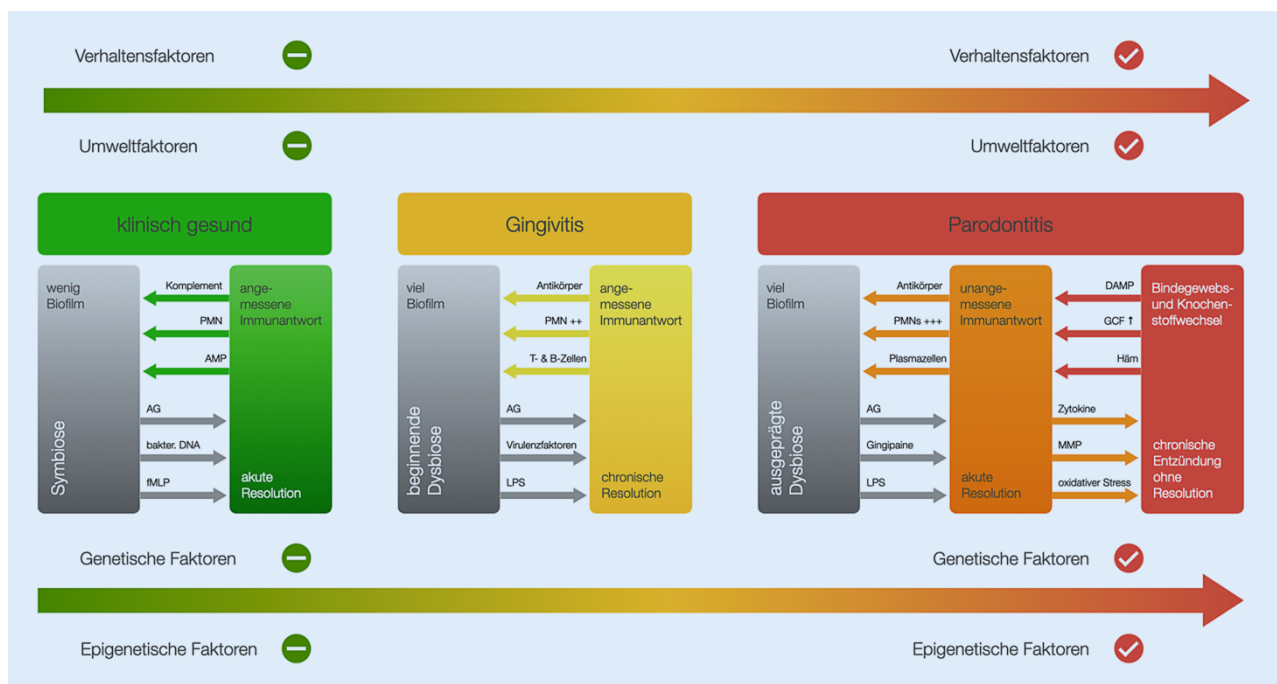


Abb. 3: Schematische Darstellung des Zusammenspiels zwischen den Mikroorganismen und deren Wirt von symbiotischen zu dysbiotischen Verhältnissen (Bild aus (Dannewitz et al., 2021; Meyle und Chapple, 2015))

1.4. Nicht-chirurgische Therapiemaßnahmen bei Parodontitis-Erkrankten

Essenzieller Bestandteil der Parodontitistherapie ist die Kontrolle des Biofilms, um die Parodontalpathogene zu entfernen und damit die Etablierung einer gesunden Mundflora zu begünstigen. Daher wird initial die Hygienefähigkeit des supragingivalen Bereichs hergestellt und professionell gereinigt. Der Patient wird zu guter Mundhygiene instruiert und motiviert und die individuellen Risikofaktoren werden kontrolliert. Sind die Voraussetzungen der ersten Therapiestufe geschaffen, werden in der zweiten Therapiestufe entsprechend der S3-Leitlinie die subgingivalen Beläge aus Bereichen parodontaler Taschen entfernt (Sanz et al., 2020a). Dazu bietet sich die mechanische subgingivale Instrumentierung (SI) an. Diese kann beispielsweise mit Handinstrumenten, Ultraschallinstrumenten oder Laserinstrumenten ähnlich effizient durchgeführt werden (Jepsen et al., 2011a). Allerdings kann die Ökologie der Zahnfleischtasche nicht immer durch mechanische Maßnahmen so verändert werden, dass sich die klinischen Parameter nachhaltig verbessern (Socransky und Haffajee, 2002). Gründe dafür können der residuale subgingivale Biofilm tiefer Taschen sein oder die anatomischen Variationen der Wurzeln (Jepsen et al., 2011a). Der Einsatz von Antibiotika könnte in solchen Fällen nach strenger Indikationsstellung einen positiven Einfluss auf die Therapie haben. Unterschreiten die klinischen Ergebnisse nach der Heilungsphase des zweiten Therapieschritts die Anforderungen einer klinisch stabilen parodontalen Lage, sind neben der Wiederholung der SI parodontalchirurgische Maßnahmen möglich. Anschließend wird der Patient entsprechend der aktuellen S3 Leitlinie in der unterstützenden Parodontitistherapie betreut, um so die stabile parodontale Situation zu bewahren (Sanz et al., 2020a).

1.5. Systemische Antibiotika in der Parodontaltherapie

Antibiotika sind grundsätzlich Mittel mit antibakterieller Wirksamkeit, die lokal oder systemisch angewendet werden können (Sweet et al., 2018). Antibiotika lassen sich nach diversen Gesichtspunkten klassifizieren. Beispielsweise werden bakterizide von bakterio-statischen Antibiotika unterschieden (Calhoun et al., 2021). Sie unterscheiden sich außerdem in ihrem Wirkmechanismus. Bakterizide Antibiotika wie Penicilline oder Cephalosporine hemmen die Zellwandsynthese des Bakteriums, wohingegen Nitroimidazol-Derivate

oder Chinolone den Bakterienuntergang durch Abbrüche des DNA-Stranges hervorrufen (Dingsdag und Hunter, 2018; Giesbrecht et al., 1998; Lobmann et al., 2004). Eine bakteriostatische Wirkung haben unter anderem Tetrazykline oder Lincosamide, indem sie die bakterielle Proteinbiosynthese unterbinden (Bonnetblanc, 2002; Spížek und Řezanka, 2017).

Vergleicht man ihre Applikationsmöglichkeiten, so hat die systemische Antibiotikawirkung den Vorteil, dass sie Pathogene in der gesamten Mundhöhle und dem Körper über einen längeren Zeitraum erreicht. Dies trägt allerdings das Risiko systemischer Nebenwirkungen oder Resistenzbildungen der Bakterien gegen Antibiotika und erfordert die Mitarbeit des Patienten. Lokal applizierte Antibiotika können nur in den detektierten Zahnfleischtaschen über einen verkürzten Zeitraum wirken und bergen so die Gefahr einer rezidivierenden Infektion durch unerkannte Taschen (Jepsen und Jepsen, 2016).

Im Bereich der Parodontologie hat die Kombination aus Amoxicillin und Metronidazol die besten Resultate gezeigt (Teughels et al., 2020). Amoxicillin ist ein Aminopenicillin, das neben dem penicillinüblichen primär grampositiven Wirkspektrum auch gegen gramnegative Bakterien wirken kann. Ein essenzieller Baustein des Antibiotikums ist der β -Laktam-Ring. Dieser kann an Penicillin-bindende-Proteine eines Bakteriums, wie die Transpeptidase, binden und so die Zellwandstabilität beeinträchtigen. Aus osmotischen Gründen fließt unaufhaltsam Wasser in das Bakterium, bis es lysiert (Akhavan et al., 2021). Gleichzeitig sind diese Penicillin-bindenden-Proteine auch ein Ort der Mutation, sodass Antibiotika mit dem β -Laktam-Ring deutlich weniger bindungsaffin sind und man von einer Resistenzentwicklung sprechen kann (Holzgrabe, 2007). Eine weitere Möglichkeit der Resistenzentwicklung sind β -Laktamasen, die von Bakterien gebildet werden und durch das Spalten des β -Laktam-Ringes eine Antibiotikaunwirksamkeit hervorrufen (Bush und Bradford, 2019). Die Anzahl der β -Laktamasen hat sich in einem Zeitraum von 20 Jahren bereits verzehnfacht (Davies und Davies, 2010).

Metronidazol entfaltet eine gute Wirksamkeit gegen gramnegative Anaerobier (Freeman et al., 1997; Jepsen und Jepsen, 2016). Als Wirkstoff aus der Gruppe der Nitroimidazole wirkt es bakterizid indem die DNA-Synthese eines Bakteriums gestört wird. Als Prodrug metabolisiert es in der Zelle unter anaeroben Bedingungen zu Nitroso-Radikalen. Diese verursachen Strangbrüche und eine gehemmte DNA-Synthese, die schließlich zum Untergang der Zelle führt (Löfmark et al., 2010). Gegen Aerobier kann Metronidazol nicht

wirken, da unter Sauerstoffeinfluss eine Reoxidation der Nitroso-Radikale stattfinden kann und in aeroben Zellen kein ausreichend negatives Redoxpotential vorhanden ist (Reysset, 1996). Beobachtete Resistenzmechanismen sind auf eine verminderte Aufnahme des Medikaments einerseits und reduzierte Redoxmechanismen andererseits zurückzuführen (Land und Johnson, 1999). Es wurden bereits Resistenzgene detektiert, die für eine alternative, Metronidazol unschädlich machende Reduktase kodiert sind (Leiros et al., 2004; Reysset, 1996).

Um abzuwägen, ob eine adjuvante Antibiose in Frage kommen könnte, ist die korrekte Befunderhebung und daraus resultierende Diagnose sowie die Anamnese des Patienten von großer Bedeutung. In der S3 Leitlinie aus dem Jahr 2020 „Die Behandlung von Parodontitis Stadium I – III“ wird die Gabe von Antibiotika für junge Erwachsene, die den schnell fortschreitenden Parodontitisstadien III oder IV zuzuordnen sind, in Betracht gezogen (Sanz et al., 2020a). Der Beginn der Antibiose soll simultan zu der mechanischen Biofilmentfernung sein, da der intakte Biofilm deutlich höhere Antibiotikateranzen aufweist und diese Toleranz bereits 24 Stunden nach Biofilmzerstörung wiederaufflammt (Sedlacek und Walker, 2007). Es ist eine zusätzliche Reduktion der TST von 40 % bis 50 % gegenüber alleiniger SI zu erwarten (Sanz et al., 2020a). Als Mittel der Wahl wird die Kombination aus Amoxicillin und Metronidazol befürwortet. Falls eine Penicillinallergie vorliegt, wird die alleinige Gabe von Metronidazol empfohlen (Garcia Canas et al., 2015; Rabelo et al., 2015; Teughels et al., 2020; Zandbergen et al., 2016).

Obwohl noch nicht alle Bakteriengruppen der Mundhöhle, die mit Parodontitis in Verbindung gebracht werden könnten, als solche detektiert wurden, war bereits früh klar, dass die Parodontitis eine Mischinfektion darstellt (Heitz-Mayfield, 2009; Socransky et al., 1998). Somit sollte das Antibiotikum der Wahl ein breites Wirkspektrum haben (Heitz-Mayfield, 2009). Den klinisch positivsten Effekt im Hinblick auf TST- und BOP-Reduktion sowie CAL-Gewinn ergibt die Kombination aus Amoxicillin und Metronidazol (Teughels et al., 2020). Die Wirksamkeit des Metronidazols deckt die gramnegativen, anaeroben Bakterien des roten und orangen Komplexes ab, während die fakultativ oder rein aeroben grampositiven Pathogene eher durch Amoxicillin eliminiert werden sollen (Heitz-Mayfield, 2009; Socransky et al., 1998).

1.5.1. Auswirkungen der Antibiotikatherapie

Die Einnahme von Antibiotika kann stets mit Nebenwirkungen in Verbindung gebracht werden. Zu den üblichsten Nebenwirkungen während der Einnahme der Kombination aus Amoxicillin und Metronidazol zählen das Vorkommen von gastrointestinalen Beschwerden wie Übelkeit und Diarrhö. Zudem ist Amoxicillin ein häufiger Auslöser einer Pseudoallergie in Form des Arzneimittalexanthems. Auf Alkoholkonsum sollte während der Einnahme von Metronidazol verzichtet werden, da in Kombination mit Alkohol Antabus-Effekte ausgelöst werden könnten.

Da Antibiotika unselektiv wirken, werden nicht nur Pathogene eliminiert. Folglich werden nachhaltige Veränderungen der Mikrobiota beobachtet (Costello et al., 2012; Jernberg et al., 2010). Werden Antibiotika bei Kindern angewendet, kann es die natürliche Entwicklung des Mikrobioms stören, was sich als dauerhafter Verlust bestimmter Bakterienarten äußert. Die verlorengegangene Biodiversität kann zu metabolischer Dysfunktion führen, welche beispielsweise negativen Einfluss auf das Knochenwachstum oder die immunologische Entwicklung hat (Cox et al., 2014). Eine Erklärung für diese Reaktion könnte die in jungen Individuen geringe Anzahl an Taxa sein, welche dieser metabolischen Funktion nachkommen sollten und durch die Antibiotikagabe irreversibel eliminiert werden (Blaser, 2016). Die B- und T-Zelldifferenzierung beruht zu einem großen Teil auf Komponenten, die das Magenmikrobiom involviert. Wird dieses durch Antibiose gestört und in Folge dessen die B- und T-Zelldifferenzierung, kann dies atopische Reaktionen fördern (Fujimura und Lynch, 2015). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch die Antibiotika langanhaltende Stoffwechselveränderungen aufgrund des veränderten Darmmikrobioms hervorgerufen wurden, die sich klinisch in Fettleibigkeit äußerten. In der Zeit nach der Antibiose kommt es zu einer gewissen Erholung des Mikrobioms. Allerdings erholen sich einige Taxa deutlich schneller andere, was einerseits die Biodiversität des Mikrobioms mindern kann und andererseits potentiellen Pathogenen günstigere Vermehrungsmöglichkeiten bietet, da diese durch die Dysbiose einem gegebenenfalls geringeren Selektionsdruck ausgesetzt sind. Dieses Phänomen begünstigt potentielle Infektionen nach einer Antibiotikatherapie (Vangay et al., 2015).

Neben den unter 1.5 beschriebenen Resistenzentwicklungen für Amoxicillin und Metronidazol gibt es unzählige weitere Antibiotikaresistenzen, die in der unachtsamen Gabe

von Antibiotika begründet sind und Bakterien die Chance geben, sich gegen diese zu schützen (Ogawara, 2019). Da Biofilme eine sehr heterogene Bakterienkultur sind, können diese dementsprechend verschiedene Schutzmechanismen ausbilden, welche auch gegenseitigen protektiven Charakter haben. Der matrixbildende, negativ geladene Biofilm verzögert die Penetration von positiv geladenen Antibiotika, sobald diese an die Matrix docken (Jolivet-Gougeon und Bonnaure-Mallet, 2014). Die hohe Bakteriendichte begünstigt horizontalen Gentransfer, erhöht so das Mutationsvorkommen und wirkt sich letztendlich positiv auf die Selektion resistenter Bakterien aus (de Beer et al., 1997). Die 3 Hauptmechanismen des Gentransfers beruhen auf Transformation, Transduktion und Konjugation (Olsen et al., 2013). Bei der Konjugation formen Fimbrien einen Kanal zwischen den Bakterien, über den der Genaustausch stattfindet. Die Transformation beschreibt einen Prozess, bei dem freie DNA in kompetente Bakterien übertragen wird. Über Phagen wird die DNA bei der Transduktion zwischen den Bakterien transportiert (Lin et al., 2021). Die dabei übertragene DNA kann entweder neu kombiniert, in das Empfängerchromosom integriert oder extrachromosomal verweilen und so den Biofilm zu einer Quelle von Resistenzgenen machen (Roberts und Mullany, 2010). Der Biofilm ist in seinen außenliegenden Strukturen metabolisch aktiver als im Inneren. Viele Antibiotika, wie beispielsweise das Metronidazol, greifen in metabolische Prozesse der Bakterien (Replikation, Transkription, Translation, Zellwandsynthese) ein. Ist der Metabolismus verlangsamt, wird die Toleranz gegen auf diese Weise wirksame Antibiotika erhöht. Der Biofilm unterliegt einem natürlichen Stress durch zum Beispiel Nährstoffmangel, Hypoxie oder antimikrobiellen Substanzen (Olsen, 2015). In den äußeren Bereichen des Biofilms werden hypoxieinduzierte Stressgene stärker exprimiert als in dem metabolisch inaktiveren Inneren, wo längerfristig Anoxie herrscht. Dieser Stress erhöht die Mutabilität. Konkret ließ sich beispielsweise eine erhöhte Penicillinresistenz durch die RpoS (Initiatorprotein der Transkription) vermittelten Stressreaktionen nachweisen (Driffield et al., 2008; Williamson et al., 2012). Dies sind nur einige Beispiele für Mechanismen, welche zu einer Antibiotikaresistenz führen können und lassen vermuten, wie vielseitig die Resistenzentwicklung ist. Infolgedessen wird es immer schwieriger, wirksame Antibiotika zu finden, wie man am Beispiel des *Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus* sieht, der bei einer Patienteninfektion durch die Entwicklung zahlreicher Resistenzmechanismen immer aufwändiger zu therapieren ist (Vestergaard et al., 2019). Die sich aus der zunehmenden Resistenzlage ergebenden

Behandlungsschwierigkeiten bei bakteriellen Infektionen könnte in Zukunft neben der massiven Erhöhung der finanziellen Belastung des Gesundheitssystems auch die resistenzassoziierten Todeszahlen in die Höhe treiben und die Geburtenraten drastisch reduzieren (Bartlett et al., 2013; Gould und Bal, 2013). Die erhöhte finanzielle Belastung ergibt sich beispielsweise aus den potentiell verlängerten Krankenhausaufenthalten der bakteriell infizierten Patienten (Ventola, 2015). Ein weiterer Gesichtspunkt, der zu Resistenzentwicklung sowie zu steigenden Kosten beiträgt, ist die Antibiotikaaanwendung in der Landwirtschaft. Diese Anwendung ist vor allem in Entwicklungsländern präsent und führt einerseits zu Resistenzmechanismen und somit zu Behandlungsschwierigkeiten bei Nutztieren sowie bei den Konsumenten. Dies erhöht die Antibiotikagabe sowohl aktiv in der Landwirtschaft als auch passiv im Gesundheitssystem. Folglich beschränkt sich die erhöhte finanzielle Belastung und verminderte Behandlungseffizienz nicht nur auf das Gesundheitssystem, sondern ebenfalls auf den landwirtschaftlichen Sektor (Economou und Gousia, 2015; Maron et al., 2013).

1.6. Mikrobiomanalyse durch Sequenziertechnologien der nächsten Generation (Next-Generation-Sequencing; NGS)

Die DNA setzt sich aus den vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin zusammen, welche sich in einer Doppelhelix anordnen. Die individuelle Reihenfolge der Anordnung dieser Basen ergibt einen genetischen Code, der die Erbinformationen enthält (Horn, 2021). Dieser genetische Code lässt sich durch die Sequenzierungen decodieren und kann im Anschluss nach bioinformatischer Auswertung interpretiert werden (Heather und Chain, 2016).

NGS umfasst Methoden, bei der Millionen von DNA-Fragmenten simultan sequenziert werden (Behjati und Tarpey, 2013). Möchte man langkettige DNA sequenzieren, wird die DNA initial in kürzere, circa 500 Basenpaar lange Segmente, fragmentiert. Daran schließt sich die Amplifikation der DNA-Sequenzen von Interesse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an. Nach der Denaturierung der Doppelhelices werden die Einzelstränge in eine mikrofluidische Durchflusszelle (Flow Cell) appliziert. Auf deren Oberfläche befinden sich komplementäre, befestigte Adapter an die die Einzelstränge binden können. Eine DNA-Polymerase synthetisiert einen weiteren DNA-Strang während einer PCR,

beginnend am als Primer dienenden fixierten Adapter. Die beiden Stränge werden separiert und der am fixierten Adapter synthetisierte Strang verbleibt auf der Oberfläche der Flow Cell. Der am freien Ende befindliche Adapter des neu sequenzierten Stranges bindet an einen weiteren unbelegten Adapter, der auf der Oberfläche fixiert ist. Eine weitere PCR und eine erneute Separierung der nun fixierten Stränge findet statt.

Dieser Vorgang wird so häufig wiederholt, bis sich eine Region (Cluster) auf der Oberfläche der Flow Cell gebildet hat, auf welcher die ursprünglichen DNA-Stränge in zahlreichen Kopien vorliegen. Nun befinden sich 2 komplementäre DNA-Sequenzen in häufiger Ausführung auf kleinem Raum. Eine Ausführung der komplementären Stränge wird nun von den fixierten Adapter abgeschnitten und nur ein Typ der ursprünglich 2 DNA-Stränge bleibt in seiner zahlreichen Ausführung auf der Oberfläche fixiert.

Ein zu den Adapter komplementärer Primer wird nun auf die Oberfläche gegeben. An diesen können fluoreszierende Nukleotide binden. Jedem Nukleotid sind spezifische Farben zugeordnet. Nachdem ein dem Originalstrang komplementäres Nukleotid gebunden hat, verhindert es zunächst das Binden weiterer Nukleotide. Die freien Nukleotide werden entfernt und das fluoreszierende Nukleotid wird nach Laseranregung detektiert. Danach lässt das blockierende Nukleotid die Bindung eines weiteren dem Originalstrang komplementären Nukleotids zu und der Prozess wird wiederholt.

Auf der MiSeq Plattform von Illumina können so 2 mal 300 Basenpaare hinzugefügt werden (Slatko et al., 2018). Die Floreszenzen der eingebauten Nukleotide werden visualisiert und die Basenabfolge bioinformatisch identifiziert. Einen genaueren Überblick über die Methode bietet Matthieu Leray in seinem Artikel (Leray et al., 2016).

1.6.1. Mikrobiomanalyse mittels 16S ribosomale RNA Metagenom-Sequenzierung

Die Analyse von Mikrobiota kann grundsätzlich in molekulare und kulturbasierte Vorgehensweisen unterteilt werden. Die 16S-rRNA-Gensequenzierung gehört zu den molekularbiologischen Verfahren und hat das Potential, die gesamte bakterielle Zusammensetzung und Diversität einer Probe zu beleuchten, was besonders im Hinblick auf die hohe Komplexität des oralen Mikrobioms attraktiv ist (Clavel et al., 2016).

Die Basenabfolge des 16S rRNA Gens dient danach der phylogenetischen Untersuchung der Proben (Hwang et al., 2018; Lee und Tang, 2012). Das prokaryotische 16S ribosomale RNA Gen besteht aus circa 1500 Nukleotiden. Die 16S ribosomale RNA besteht aus 9 variablen Regionen, die durch konservierte Regionen unterbrochen werden. Die dritte und vierte variable Region des Gens werden in dieser Studie als Kontext zur phylogenetischen Klassifizierung des Genus- oder des Speziesniveaus verwendet. Diese Region wird mittels PCR vervielfacht und dient als Grundlage der unter 1.6 beschriebenen Mikrobiomanalyse (Shahi et al., 2019).

1.6.2. Gesamt-Genom-Schrotschussesequenzierung mit Oxford Nanopore Technologies

Bei der Gesamt-Genom-Sequenzierung (Whole-Genome-Sequencing; WGS) wird die gesamte genomische DNA einer Probe zum Zeitpunkt der Probenentnahme untersucht und nicht nur ein bestimmter Bereich eines Genoms (Khodakova et al., 2014). Das eröffnet zum Beispiel die Möglichkeit, Pathogene genau zu charakterisieren und hinsichtlich resistenzkodierender Genomabschnitte zu analysieren (Rossen et al., 2018). Die Methode von Oxford Nanopore Technologies verfügt über die Fähigkeit, sehr lange native DNA-Stränge zu sequenzieren. Dabei handelt es sich um eine Sequenzieretechnologie der dritten Generation, bei der ein Strom über eine elektrisch resistente Membran angelegt wird, in die biologische Nanoporen eingebettet sind. Während die DNA mit Hilfe des Motorproteins entwunden und durch die Poren geschleust wird, kommt es in Abhängigkeit zum sequenzierten Nukleotid zu charakteristischen Unterbrechungen des Stroms innerhalb der Pore, welche genutzt werden, um die Basenabfolge des passierenden DNA-Strangs zu bestimmen.

Konkret bestehen die Poren aus einem Motorprotein, das die während der Vorbereitung von DNA-Library an die DNA angefügten Adapter erkennt und den Passiervorgang durch die Pore kontrolliert. Die Spannungsveränderungen werden bioinformatisch in Basen übersetzt (Basecalling). Das Basecalling kann während und / oder nach dem Sequenziervorgang erfolgen und bildet die Grundlage für die bioinformatische Auswertung (Lu et al., 2016).

1.6.3. Gesamt-Genom-Amplifikation

Eine Voraussetzung für die Gesamt-Genom-Sequenzierung ist in der Regel eine deutlich höhere DNA-Menge als bei anderen Sequenziermethoden (Rykalina et al., 2014; Zhu et al., 2015). Wenn aufgrund von Probenbeschaffenheit oder -qualität nicht ausreichend DNA isoliert werden konnte, ist eine Gesamt-Genom-Amplifikation (Whole-Genome-Amplification (WGA)) vor der genomischen Analyse erforderlich. Dabei gibt es verschiedene Varianten, die auf PCR oder isothermaler Amplifikation der gesamten in der Probe enthaltenen DNA basieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die isothermale Amplifikation mittels Phi29 Polymerase verwendet. Dabei werden sehr kurze, sequenzunspezifische Oligonukleotide (Random-Hexamer-Primer) verwendet, die unspezifisch an den genomischen DNA-Strang binden und als Andockpunkt für die Phi29 Polymerase fungieren. Die Polymerase ist in der Lage während einer isothermalen Reaktion im Durchschnitt 70.000 Nukleotide zu synthetisieren. Die neu synthetisierte DNA fungiert als Vorlage für weitere DNA-Synthese. Wie in Abb. 4 zu sehen, entwickeln sich daher im Verlauf der WGA hyperververzte DNA-Strukturen (Binga et al., 2008).

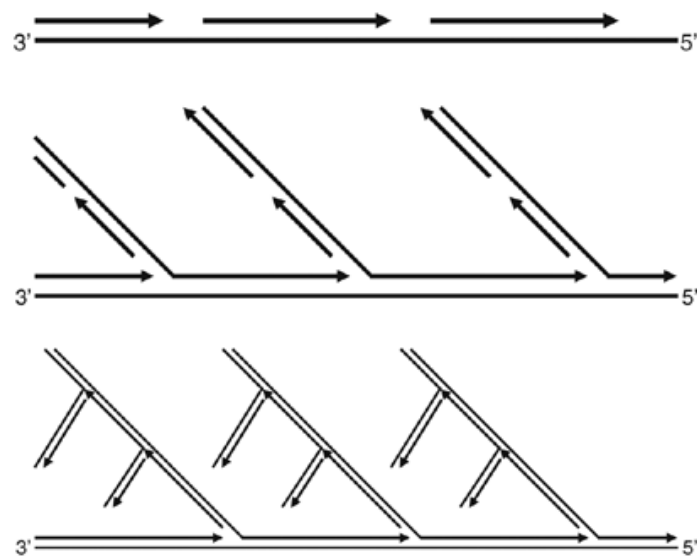


Abb. 4: Syntheseprinzip der „Multiple-Displacement-Amplifikation“ mit der Pfeilspitze als Polymerase (Binga et al., 2008)

1.7. Hypothesen und Fragestellung

Diese Studie untersucht die Effizienz und den Einfluss unterschiedlicher adjuvanter Antibiotikaprotokolle auf die nicht-chirurgischen Parodontitistherapie bei aggressiver Parodontitis (Stadium III - IV, Grad C), insbesondere im Hinblick auf die Veränderung des subgingivalen Mikrobioms und Resistoms.

Die Forschungsarbeit wird durch 2 zentrale Fragestellungen geleitet.

1. Wie verändert sich die Bakterienbesiedlung nach der Anwendung von 2 unterschiedlichen Antibiotikaprotokollen? Hierbei wird eine dreitägige und eine sieben-tägige Einnahme von 500 mg Amoxicillin und 500 mg Metronidazol, jeweils dreimal täglich verabreicht. Angesichts dieser Fragestellung wird die Hypothese formuliert, dass es bei gleichen Krankheitsbildern und identischer Therapie zu keinen statistisch signifikanten Abweichungen in der Mikrobiomzusammensetzung zwischen den Gruppen (T + K) kommt, trotz verschiedener Antibiotikaeinnahmeprotokolle.
2. Ist es möglich, mittels Next-Generation-Sequencing eine valide Methode zu etablieren, die Resistome, die sich durch die Antibiose entwickelt haben, nachzuweisen? Eine ergänzende Hypothese ist, dass ein längeres Antibiotikaeinnahmeprotokoll die Resistenzbildung begünstigen könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv und durchgeführte Therapie

Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki (1964, Revision 2008) durchgeführt und stellt eine Sekundäranalyse dar (Cosgarea et al., 2022). Die Genehmigung der Hauptanalyse fand durch die Ethikkommission der Fakultät für Medizin und Pharmazie von Cluj-Napoca statt (Antrag #398/02.07.2015, Amendment #346/16.11.2020).

Alle in Frage kommenden Probanden wurden über die Risiken, Vorteile und den Zweck der Studie aufgeklärt und es wurde eine schriftliche Zustimmung eingeholt. Für die Studie wurden Patienten im Alter zwischen 18 und 38 Jahren ausgewählt, die klinische Zeichen einer generalisierten aggressiven Parodontitis (Parodontitis Stadium III / IV Grad C) aufwiesen. Die Patienten zeigten eine familiäre Häufung eines schnellen Attachmentverlusts und Knochenabbaus bei ansonsten gesundem klinischen Erscheinungsbild und / oder generalisiertem approximalen Attachmentverlust, der mindestens 3 bleibende Zähne abseits der ersten Molaren und Schneidezähne betraf (Armitage, 1999). Der Full-Mouth-Plaque-Score (FMPS) hatte einen Wert von 25 % vor der Therapie nicht überschritten (O'Leary et al., 1972). Patienten mit höheren Plaquewerten wurden instruiert und motiviert, bis sie eine verbesserte Mundhygiene (FMPS 25 %) aufwiesen. Systemische Erkrankungen, welche die parodontale Gesundheit beeinflussen, Bestrahlung im Kopf- und Halsbereich, Lebererkrankungen sowie Herzleiden, die eine prophylaktische Antibiotikagabe vor zahnärztlicher Behandlung begründen, waren Ausschlusskriterien (Helenius-Hietala et al., 2019; Khaw et al., 2014; Sanz et al., 2020b).

2.2. Klinisches Protokoll

An die Erhebung eines allgemein Zahnärztlichen Befundes schloss sich die parodontologische Befunderhebung an, welche sich bei jeder Kontrolluntersuchung nach der Behandlung wiederholte. Der Mundhygienestatus sowie der Entzündungsstatus wurden durch FMPS und gingivalen Blutungsindex an 4 Stellen pro Zahn bestimmt (Ainamo und Bay, 1975; O'Leary et al., 1972). Der klinische Attachmentverlust und die TST wurden an 6 Stellen pro Zahn mit der parodontalen Sonde gemessen. Die Schmelz-Zementgrenze diente als Referenzpunkt. Wurde dieser durch Restaurationen unsichtbar, so wurde der

apikalste Rand der Restauration als Referenz verwendet. BOP wurde als Prozentsatz der Stellen bewertet, die 30 Sekunden nach Sondierung bluteten. Probanden, die täglich mindestens 10 Zigaretten über die letzten 5 Jahre konsumierten, wurden als Raucher deklariert. Nach Feststellung des parodontologischen Behandlungsbedarfs und Erfüllung der Einschlusskriterien wurde das Patientenkollektiv randomisiert in eine gleich große Test- und Kontrollgruppe unterteilt. Beide Gruppen wurden nichtchirurgisch behandelt. Alle Stellen mit einer TST von mindestens 4 mm wurden zu Behandlungsbeginn innerhalb von 24 Stunden mittels subgingivaler Instrumentierung therapiert und die Patienten wurden angewiesen, zweimal täglich 2 Minuten lang mit der Chlorhexidindigluconat-Mundspüllösung für 2 Wochen zu spülen. Weiterhin sollten die Patienten beider Gruppen, beginnend am Tag der subgingivalen Instrumentierung, weitere 14 Tage lang chlorhexidindigluconathaltige Zahnpasta verwenden. Zudem nahmen die Patienten der Kontrollgruppe dreimal täglich 500 mg Amoxicillin und 500 mg Metronidazol für je 7 Tage lang in einem Abstand von 8 Stunden ein. In der Testgruppe wurden die Antibiotika lediglich 3 Tage eingenommen und für die weiteren 4 Tage durch ein gleich aussehendes Placebo-Präparat ersetzt. Falls residuale parodontale Taschen an den Kontrollterminen festgestellt worden sind (3, 6 und 12 Monate nach Therapie), so wurden diese nicht reinstrumentiert.

2.3. Probenentnahme

Vor der Therapie sowie 3, 6 und 12 Monate nach der Therapie wurden Proben subgingivaler Plaque entnommen. Dafür wurde in jedem Quadranten die Stelle mit der höchsten TST zur Probenentnahme gewählt. Nach dem Entfernen supragingivalen Biofilms mit Wattepellets und unter relativer Trockenlegung mit Watterollen, wurde eine sterile Papierspitze bis zur Wahrnehmung eines Widerstands in den Sulkus eingeführt und für 20 Sekunden dort belassen. Anschließend wurden die während eines Zeitpunkts gewonnenen Proben eines Patienten in einem sterilen Reagenzgefäß gepoolt und bei - 20 °C gelagert.

2.4. Extraktion verwendeter DNA-Proben

Alle aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter Sicherheitsarbeitsbänken durchgeführt. Es wurden ausschließlich Filterspitzen verwendet, welche nach jedem Pipettierschritt gewechselt wurden. Die DNA-Isolate wurden bei - 20 °C bis - 25 °C gelagert und beim Verwenden, wie alle anderen gekühlten Substanzen, langsam auf Eis aufgetaut. Enzyme wurden erst zum Zeitpunkt der Verwendung aus der Kühlung genommen. Außerdem kamen lediglich Low-Binding-Reagenzgefäße sowie DNA- und nuklease-freies Wasser zum Einsatz. Die DNA-Extraktion wurde nach Herstellerangaben mit Chelex 100 durchgeführt (Instruction Manual, Chelex 100).

2.4.1. Bestimmung der Probenreinheit und des DNA-Gehalts

Zu Beginn wurden vier Dropout-Proben exemplarisch mit Hilfe eines Mikrovolumen-Spektralphotometers (NanoDrop One C, Thermo Scientific) hinsichtlich ihres DNA-Gehalts und Reinheitsgrades bewertet. Das NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometer erlaubt durch die Bestimmung eines Verhältnisses von Absorptionen bestimmter Wellenlängen Aussagen über Reinheit von Nukleinsäure-Proben (Desjardins und Conklin, 2010). Das Messvolumen belief sich auf 1 µl pro Probe und nukleasefreies Wasser diente als Kalibrationsreferenz.

2.5. Amplifikation des prokaryotischen ribosomalen RNA-Gens mittels Polymerasekettenreaktion für Metagenom-Sequenzierung mit dem Illumina Miseq Sequenzierer

Die direkte Amplifikation und Sequenzierung des 16S ribosomalen RNA-Gens aus Abstrichen der parodontalen Taschen stellt eine präzise Methode dar, um das dort vorkommende Mikrobiom zu charakterisieren. Durch die speziesspezifischen hypervariablen Regionen der 16S-rRNA, eignet sich dieser Genomabschnitt zur Identifikation der Gattung der vorhandenen Bakterien durch den Abgleich der enthaltenen generierten Sequenzen mit Genomdatenbanken (Kroes et al., 1999).

Die DNA-Library wurden unter einer PCR-Arbeitsbank nach Vorgaben des Herstellers Illumina präpariert (Version: 16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b). Zunächst wurden die hypervariablen Regionen V3 - V4 des 16S rRNA-Gens mittels PCR unter Verwendung von Primern, die in konservierten Regionen binden, amplifiziert (Klindworth et al., 2013). Dazu wurden in PCR-Reagenzgefäßen die in Tabelle 1 angegebenen und vorher sorgfältig durchmischten Substanzen pipettiert:

Tab. 1: PCR-Ansatz

Substanz	Volumen
DNA	2,5 µl
Vorwärts-Primer	5 µl
Rückwärts-Primer	5 µl
2x KAPA HiFi HotStart (Polymerase) ReadyMix	12,5 µl
Total	25 µl

Nach erneutem Durchmischen durchliefen die PCR-Reaktionen im Thermocycler (ProFlex™ PCR System) folgendes Programm:

Tab. 2: Erstes PCR-Programm des Thermocyclers

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
1x	95	3 Minuten
25/30x	95	30 Sekunden
	55	30 Sekunden
	72	30 Sekunden
1x	72	5 Minuten
Ende	4	∞

2.5.1. Nachweis des Amplifikats durch gelelektrophoretische Auftrennung

Das PCR-Produkt wurde mittels des Agilent TapeStation Elektrophoreseautomaten (Agilent, Santa Clara, USA) nach Herstellerhandbuch (Agilent D1000 ScreenTape Quick Guide for TapeStation Systems) analysiert, um die Länge des generierten Amplifikats zu bestimmen. Zur kapillarelektrophoretischen Auftrennung wurden die sogenannten D1000 ScreenTapes verwendet, die für eine Darstellung bis zu 1000 Basenpaare langer Fragmente ausgelegt sind. Die bei 4 °C gelagerten D1000 Reagenzien und ScreenTapes sind 30 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert worden. Es wurden jeweils 3 µL D1000 Sample Buffer und 1 µL des PCR-Produkts in ein PCR-Reagenzgefäß pipettiert und mit Hilfe des Vortexers (IKA MS3 Vortexer, Staufen, Deutschland) bei 2000 U/min für 1 Minute vermischt. Die Proben wurden in der TapeStation positioniert, die Elektrophorese gestartet und nach deren Abschluss das Elektropherogramm analysiert. Dabei wurde die Größe der elektrophoretischen Peaks mit Hilfe eines Standards bestimmt. Zur Vermeidung unspezifischer Amplikons wurden jedoch nicht über 30 Amplifikationszyklen angewendet. Bis zur Durchführung der nächsten Schritte sind die Proben bei - 20 °C gelagert worden.

2.5.2. Aufreinigung des PCR-Produkts

Zur Aufreinigung der Amplikons wurden AMPure XP beads (Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um paramagnetische Kügelchen (Beads) in einer Puffersuspension, welche in der Lage sind, die DNA-Amplifikate zu binden. Diese Aufreinigungstechnik ist der Goldstandard für NGS Applikationen und basiert auf der reversiblen Festphasenimmobilisierung (Solid Phase Reversible Immobilization, SPRI), bei der Nukleinsäuren selektiv nach Art und Größe gebunden werden können. Somit ist die Möglichkeit gegeben, die Proben von überschüssigen Primern, Nukleotiden und Enzymen zu reinigen, da sich die an die Beads gebundenen Amplifikate durch einen Magneten von dem Überstand mit den Kontaminationen trennen lassen (Krinitsina et al., 2015). Die AMPure XP beads wurden auf Raumtemperatur gebracht und jegliche PCR-Produkte aus ihren Reagenzgefäßen auf eine DeepWell-Platte pipettiert. Auf die Proben wurden jeweils 20 µL resuspendierter AMPure XP beads pipettiert und

anschließend auf dem CRP-18X Plate Shaker bei 1400 U/min für 2 Minuten geschüttelt. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur ist die Platte auf dem DynaMag™-96 Side Skirted Magnet (Thermo Fisher Scientific) platziert worden, bis sich die DNA-gebundenen Magnetkugeln nach circa 2 Minuten an der dem Magneten zugewandten Seite zu einem Pellet akkumulierten. Das Pellet wurde mit 200 µL 80 % Ethanol 2 mal gewaschen. Im Anschluss wurden die Beads für 4 Minuten zur Evaporation letzter Reste des Ethanols luftgetrocknet. Anschließend wurde den Pellets jeweils 52,5 µL 10 mM Tris pH 8.5 zur Elution zugegeben. Die Platte ist auf dem CRP-18X Plate Shaker bei 1400 U/min für 2 Minuten geschüttelt, für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf dem DynaMag™-96 Side Skirted Magnet platziert worden, bis die Proben nach circa 2 Minuten aufgeklart waren. Jeweils 50 µL der eluierten DNA wurde mit einer Multi-kanalpipette von der DeepWell-Platte in eine neue 96-well Mikrotiterplatte pipettiert.

2.5.3. Index PCR

Zur parallelen Sequenzierung einer Vielzahl von Proben wird jede Probe mit einer kurzen spezifischen Kennungssequenz, dem sogenannten Barcode oder Index, versehen. Damit lassen sich nach der Vereinigung der DNA-Libraries die generierten Sequenzen den ursprünglichen DNA Proben wieder zuordnen. Da das Verwenden von standardmäßigen, kombinatorischen Indices zu einer höheren Anzahl von Fehlzuordnungen der generierten Sequenzen zu den einzelnen Proben führt, wurden unzusammenhängende duale Indices verwendet (MacConaill et al., 2018). Das Anbringen der Indices an die zu sequenzierende DNA-Library fand nach Herstellerangaben statt (16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b). Von den aufgereinigten und in 50 µL 10 mM Tris pH 8.5 gelösten 16S rRNA PCR-Produkten wurden jeweils 5 µL in eine neue 96-well Platte pipettiert. Den Proben wurde jeweils 10 µL nukleasefreies Wasser hinzugefügt. Anschließend wurden mit der Mehrkanalpipette jeweils 5 µL des vorher festgelegten Nextera XT Index Primer 1 (N7xx) sowie 5 µL des vorher bestimmten Nextera XT Index Primer 2 (S5xx) zugegeben. Zuletzt wurde zu den Proben mit einer Einkanalpipette jeweils 25 µL des 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix pipettiert und 10 mal gemischt. Nach Abdecken der Platte mit einer Microseal-A-Folie und 1-minütigem Zentrifugieren bei 1000 U/min wurde die PCR nach folgendem

Schema im Thermocycler (C1000 Touch Thermal Cycler CFX96, Feldkirchen, Deutschland) durchgeführt:

Tab. 3: Zweites PCR-Programm des Thermocyclers

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
1x	95	3 Minuten
8x	95	30 Sekunden
	55	30 Sekunden
	72	30 Sekunden
1x	72	5 Minuten
Ende	4	∞

Die indizierten 16S rRNA Amplikons wurden mit Hilfe von AMPure XP beads (56 µL pro Probe) aufgereinigt und in 27,5 µL 10 mM Tris eluiert. Anschließend wurden die Konzentrationen der DNA-Library fluorometrisch bestimmt.

2.5.4. Fluorometrische Quantifizierung der indexierten Proben

Zur fluorometrischen Quantifizierung der DNA wurde das Quantus Fluorometer von Promega verwendet. Zur Kalibrierung des Geräts wurde Lambda DNA mit bekannter Konzentration oder 1xTE-Puffer (sogenannter Blank) verwendet. Je 199 µL Färbelösung wurde jeweils mit 1 µL der zu bestimmenden DNA-Probe vermischt und nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur gemessen.

2.5.5. Vereinigung der Proben

Mit Hilfe der unter 2.4.1 beschriebenen DNA-Konzentrationsbestimmung wurde das zu pipettierende Volumen der einzelnen Proben bestimmt, um die DNA-Proben im gleichen Mengenverhältnis vereinigen zu können. So sollte einer Über- beziehungsweise Unterrepräsentation einzelner Proben während des Sequenzierprozesses vorgebeugt werden. Dazu wurde in ein Reagenzgefäß jenes Volumen jeder indexierten Probe pipettiert, dass circa 60 ng DNA pro Probe enthielt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde der Probenpool auf Eis gelagert.

2.5.6. Sequenzieren

Die gepoolten Proben wurden nun nach dem Herstellerprotokoll (Version: Illumina 16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b) denaturiert und mit der Sequenzierplattform MiSeq analysiert. Bis zu 44 Proben wurden so für 56 Stunden sequenziert.

2.5.7. Bioinformatische Auswertung

Die Auswertung der durch die Sequenzierung generierten Daten fand mit Hilfe der Mikrobiom Bioinformatik-Plattform QIIME 2 statt. Diese Plattform ermöglicht die Aufbereitung und Analyse von Rohdaten einer Metagenom-Sequenzierung, bis hin zu publizierbaren Darstellungen der Daten durch verschiedenste Plugins (Bolyen et al., 2019; Estaki et al., 2020). Nach dem Import der Sequenz-Rohdaten in QIIME 2, wurden während des Demultiplexings die einzelnen bei der Sequenzierung entstandenen Sequence Reads anhand ihrer Barcodes den Proben der Patienten zugeordnet und im Anschluss die Adapter / Barcode-Entfernung vorgenommen. Während des „Denoising“-Schritts wurden mit Hilfe des DADA2 Plugins fehlerhafte Sequenzen herausgefiltert oder korrigiert und die paired-end-reads zusammengeführt. Außerdem wurden chimäre Sequenzen und Singletons (Reads, die in allen Proben nur einmal vorkommen) eliminiert (Callahan et al., 2016). Die Ergebnisse der Qualitätsfilter und des Denoisings wurden in einer Feature Table

zusammengefasst und dienten als Grundlage für die taxonomische Analyse. Die taxonomische Klassifizierung wurde durch einen naiven Bayes-Klassifikator zugewiesen, der auf der SILVA Datenbank Rel. 132 trainiert wurde (Quast et al., 2013). Daran schloss sich der Vergleich der Zusammensetzung der Mikrobiota in 2 oder mehr Populationen (sogenannte Alpha- und Betadiversität), sowie die differenzielle Abundanzanalyse der identifizierten Taxa an (Mandal et al., 2015).

Die Alphadiversität misst die Diversität oder Vielfalt innerhalb einer einzelnen Probe oder Gemeinschaft, wobei der Shannon-Index, der Pielou-Diversitätsindex und der Faith's Phylogenetic Diversity (PD)-Index als Maßstäbe verwendet wurden. Diese Indizes berücksichtigen sowohl die Anzahl der unterschiedlichen Taxa (Artenreichtum) als auch ihre relative Häufigkeit (Artenausgeglichenheit) (Davies und Buckley, 2011; Olejniczak-Staruch et al., 2021). Der Shannonindex ist ein gängiges Maß, das sowohl den Artenreichtum als auch die Artenausgeglichenheit in der Gemeinschaft berücksichtigt. Faith's PD-Index berücksichtigt zusätzlich die phylogenetischen Differenzen zwischen den Arten. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von 0,05 oder kleiner gewertet (Davies und Buckley, 2011; Pielou, 1966; Shannon, 1948).

Die Betadiversität misst die Unterschiede in der Artenzusammensetzung zwischen verschiedenen Proben oder Gemeinschaften. Um die Betadiversität in dieser Studie zu quantifizieren, wurden die gewichtete UniFrac-Distanzanalyse und der Jaccard-Koeffizient verwendet. Ersteres berücksichtigt sowohl die phylogenetische Verwandtschaft als auch die relative Häufigkeit. Der Jaccard-Koeffizient bezieht sich lediglich auf das Vorhandensein und Fehlen von Arten (Jaccard, 1912; Wong et al., 2016)

Das Signifikanzniveau zwischen den Kohorten wurde unter der Anwendung des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests sowie PERMANOVA mit 999 Permutationen bewertet (Yue und Hu, 2022).

2.6. Kultivierung des *Porphyromonas gingivalis*

Vor dem Hintergrund, dass die Patientenproben eine begrenzte Ressource sind, wurde die Etablierung der Methoden zur Resistenzbestimmung mit dem oralen Keim *P. gingivalis* (ATCC® BAA 308™) durchgeführt. Das empfohlene Nährmedium war ATCC Medium: 2722 Supplemented Tryptic Soy Broth, welches sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzt:

Tab. 4: Zusammensetzung des Nährmediums für *P. gingivalis*

Bestandteil des Nährmediums	Menge
Tryptische Sojabrühre	30 g
Hefeextrakt	5 g
L-Cystein Hydrochlorid	0,5 g
Häminlösung	1 ml
Menadion 1 µg/ml	0,2 ml
Demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Häminlösung bestand aus 0,5 g Hämin, 1,74 g Dikaliumhydrogenphosphat und 100 ml demineralisiertem Wasser und wurde nach Aufkochen in Dunkelheit gelagert. *P. gingivalis* wurde anaerob bei 37 °C im New Brunswick™ Innova® 44 Inkubationsschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 4 Tage inkubiert.

2.6.1. Isolation der genomischen *Porphyromonas gingivalis* DNA

Unter Verwendung des „Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit“, wurde nach Angaben des Herstellers die genomische DNA aus den Zellen isoliert. Dazu wurden 10 bis 20 mg der Bakterien, welche in 200 µL nukleasefreiem Wasser resuspendiert wurden, in ein ZR BashingBead™ Lysis Röhrchen überführt und die Bakterienzellen mittels mechanischer Lyse durch den MPBio™ Fast Prep 24 5G Homogenisierer (2x 40 s bei 6,5 m/s mit 1min auf Eis dazwischen) aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren der Lysismatrix wurden 400 µL des Überstandes auf den Zymo-Spin III-Filter gegeben, um verbleibende Partikel zu beseitigen. Abschließend wurde die gDNA des *P. gingivalis* in 15 µL Volumen eluiert und hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität mit dem NanoDrop One und dem Quantus Fluorometer, wie unter den Punkten 2.4.1 und 2.5.4 beschrieben, untersucht.

2.6.2. Durchführung der Gesamtgenomamplifikation (WGA)

Die DNA-Konzentration der Patientenproben war allgemein sehr gering und für eine direkte NGS-Library-Herstellung nicht ausreichend. Daher wurde isolierte DNA unspezifisch durch eine WGA vervielfältigt. Die WGA wurde durch isotherme Inkubation von kurzen Zufallsprimern und EquiPhi29 DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Diese Polymerase zeichnet sich dadurch aus, dass sie synthetisierte DNA-Stränge verdrängen kann, um weitere DNA zu synthetisieren („strand displacement activity“). Das begründet die hohe Syntheserate sowie mögliche lange Fragmente von bis zu 70 Kilobasen, die von Vorteil sind, um ein komplettes Genom durch Sequenzierung korrekt wiedergeben zu können (Blanco et al., 1989; Povilaitis et al., 2016). Um den niedrigen DNA-Gehalt der Patientenproben zu simulieren, wurde die gDNA des *P. gingivalis* in einer Verdünnungsreihe, mit Hilfe von DNA-freiem Wasser, auf 10 ng/μL, 1 ng/μL und 0,1 ng/μL verdünnt. Anschließend wurde ein 5 μL Denaturierungsansatz in einem PCR-Reagenzgefäß nach Herstellerangaben angesetzt:

Tab. 5: Ansatz zur Denaturierung der verdünnten gDNA des *P. gingivalis*

Substanz	Volumen
EquiPhi29 Reaction Buffer	0,5 μL
Exo-resistant random primers	1 μL
DNA-free water	2,5 μL
gDNA <i>P. gingivalis</i>	1 μL

Als Negativkontrolle wurde eine Probe mit DNA-freiem Wasser verwendet. Nach dem Durchmischen wurden die Proben bei 95 °C für 3 Minuten im Thermocycler (ProFlex™ PCR System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) denaturiert und anschließend sofort für mindestens 3 weitere Minuten auf Eis platziert. Als Nächstes wurde ein Mastermix angesetzt, bei dem pro Probe folgende Mengen verwendet wurden:

Tab. 6: Ansatz zur Gesamtgenomamplifikation

Substanz	Konzentration	Volumen in μL
Reaction Buffer for EquiPhi29	1 X	1,5
DTT	1 mM	0,2
dNTP Mix	1 mM	2
DNA-freies Wasser		10,3
EquiPhi29 DNA Polymerase	10 Units	1

15 μL des Mastermixes wurde zu jeder DNA-Probe pipettiert. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler (ProFlex™ PCR System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 3 Stunden bei 45 °C und darauffolgend bei 65 °C für 10 Minuten inkubiert.

2.6.3. Fluorometrische Quantifizierung und Fragmentanalyse des Genomamplikats

Um abschätzen zu können, wie hoch die Prozessivität der Reaktionen war, wurden die Proben, wie unter Punkt 2.5.1 und 2.5.4 beschrieben, hinsichtlich ihrer Fragmentgröße und Quantität analysiert. Wegen der zu erwartenden langen Fragmente wurde für die Agilent TapeStation ein Genomic Screen Tape und die dazugehörigen Genomic DNA Reagents nach Herstellerangaben verwendet.

2.6.4. Erste Aufreinigung des Gesamtgenomamplikats

Um die Proben von Rückständen der Amplifikation zu befreien, wurde die amplifizierte DNA mit den zuvor auf Raumtemperatur gebrachten AMPure XP beads 34,2 μL versetzt. Während die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rotor gemischt wurden, wurden pro Probe 500 μL 70 % Ethanol frisch angesetzt. Nach dem Herunterzentrifugieren sind die Proben auf dem DynaMag™-2 Magneten platziert worden, bis sich die AMPure XP Beads zu einem Pellet akkumulierten und der Überstand heraus pipettiert wurde. Nach zweimaligem Waschen der AMPure XP Beads mit jeweils 200 μL 70 % Ethanol, sind die Proben herunterzentrifugiert und erneut auf dem Magneten platziert worden. Das restliche Ethanol wurde sorgfältig aus dem Reagenzgefäß entfernt und die AMPure XP

Beads für maximal 20 bis 30 Sekunden getrocknet. Zur Elution der DNA wurden pro Probe 31 µL DNA-freies Wasser hinzu pipettiert. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf dem New Brunswick™ Innova® 44 Inkubationsschüttler bei 23 °C, wurden die Proben erneut auf dem Magneten platziert. Nach Elution wurde die aufgereinigte Probe in ein neues 1,5 ml Reagenzgefäß überführt und wie unter Punkt 2.5.4 quantifiziert.

2.7. Transposase-basierte Erstellung einer DNA-Library eines *P. gingivalis*-Gesamtgenom-Amplifikats sowie einer Negativkontrolle für die Nanoporen-Sequenzierung

Eine *P. gingivalis*-DNA Probe sowie eine aufgereinigte Negativkontrolle nach Gesamtgenomamplifikation wurden für die Sequenzierung mit dem Oxford Nanopore Technologies MinION Sequenzierer (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Großbritannien) vorbereitet. Zur Erstellung der DNA-Library wurde das Transposase-basierte „Rapid Barcoding Kit“ nach Herstellerprotokoll (RBK_v2_revP_14Aug2019) verwendet. Dazu wurden 400 ng der aufgereinigten WGA Proben in 7,5 µL mit DNA-freiem Wasser aufgenommen. Jeder Probe wurde 2,5 µL des „Fragmentation Mixes“ hinzugefügt. Dieser enthält die Transposase und einen von 12 individuellen Barcodes. In einer anschließenden Inkubation bei 30 °C für 1 Minute und 80 °C für 1 Minute im Thermocycler (ProFlex™ PCR System) soll die hochverzweigte Struktur der DNA, die bei der Gesamtgenomamplifikation entsteht, durch die DNA spaltende Transposase verringert und individuelle Barcodes angefügt werden. Um bei der Sequenzierung eine gleichmäßige Repräsentation der Proben zu gewährleisten, wurde ein Pool beider Proben gebildet, bei dem die fmol-Menge der Proben ähnlich ist. Diese hängt von den Nanogramm einerseits und von den Fragmentgrößen andererseits ab. Da die Fragmentgrößen und Nanogrammmengen in diesem Fall identisch waren, wurden sie in gleichen Mengen von jeweils 5 µL in einem 1,5 ml Reagenzgefäß vereint. Der Probe wurde 1 µL des Rapid Adapters hinzugegeben und bei 23 °C im New Brunswick™ Innova® 44 Inkubationsschüttler für 5 Minuten inkubiert.

2.7.1. Vorbereitung und Beladung der Flow Cell für die Nanoporen-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde nach Herstellerhandbuch (RBK_v2_revP_14Aug2019) vorgegangen und das „Rapid Barcoding Kit“ in Kombination mit dem „Flow Cell Priming Kit“ verwendet. Vor der Sequenzierung wurde die Flow Cell in das Minlon-Gerät eingelegt und der Status der Flow Cell per Qualitätscheck im MinKNOW Betriebssystem geprüft. Nachdem der Check erfolgreich abgeschlossen war, wurde die Flow Cell vorbereitet. Dazu wurden 30 µL des „Flush Tether“ in einen Behälter „Flush Buffer“ pipettiert und vermischt. Um den Eintritt von Luftblasen in die Flow Cell zu vermeiden, wurde mit einer Pipette am „Priming Port“ ein Vakuum erzeugt, bis der in der Flow Cell befindliche Puffer die Pipettenspitze berührte. Nun wurden 800 µL des Mix durch den Priming Port in die Flow Cell pipettiert und 5 Minuten ruhen gelassen. In einem 1,5 ml Reagenzgefäß wurden die 11 µL DNA-Library mit 34 µL des „Sequencing Buffer“, 25,5 µL der „Loading Beads“ und 4,5 µL DNA-freiem Wasser vermischt. Die Abdeckung des SpotON Sample Port wurde entfernt und weitere 200 µL des Gemisches aus „Flush Tether“ und „Flush Buffer“ in den Priming Port pipettiert. Nach erneutem Mischen durch sanftes Auf- und Abpipettieren der DNA-Library wurde diese tropfenweise auf den SpotON Sample Port pipettiert. Beide Ports sowie das Minlon-Gerät wurden verschlossen und die Sequenzierung im Programm gestartet.

2.7.2. Gesamtgenomamplifikation, Amplifikatkontrolle und Aufreinigung von Probanden-DNA

Die Gesamtgenomamplifikation der DNA-Proben eines Probanden wurde nach gleichem Vorgehen wie unter dem Punkt 2.6.2 mit einer initialen DNA-Menge von 0,5 ng pro Probe durchgeführt. Anschließend wurde das Ergebnis der Gesamtgenomamplifikation nach gleichem Vorgehen wie unter den Punkten 2.6.3 und 2.6.4 kontrolliert und aufgereinigt. Die Proben wurden vor der unter 2.5.4 beschriebenen Quantifizierung in 26 µL DNA-freiem Wasser resuspendiert.

2.7.3. Ligationsbasiertes erstellen der DNA-Library des Gesamtgenomamplikats einer Probandenprobe für die Nanoporen-Sequenzierung

Um die Qualität und Quantität der Sequenzierdaten zu erhöhen, wurde auf das „Ligation Sequencing Kit“ umgestiegen. Zusätzlich kam eine T7 Endonuklease I zum Einsatz, um die Verzweigungen der DNA effektiver aufzulösen als die Transposase. Die aufgereinigte DNA (Patientenprobe Baseline) nach WGA wurde mit einem modifizierten Protokoll in Anlehnung an das „Premium Whole Genome Amplification Protocol“ (WAL_9070_v109_revO_14Aug2019) bearbeitet.

In einem PCR-Reagenzgefäß wurden folgende Reagenzien vermischt:

Tab. 7: Ansatz zum Endonukleaseverdau

Substanz	Volumen in µL
1500 Ng aufgereinigter DNA-Probe	X
NEBuffer 2	3
T7 Endonuclease I	1,5
DNA-freies Wasser	25,5 - X

Das PCR-Reagenzgefäß wurde für 15 Minuten bei 37 °C im Thermocycler (ProFlex™ PCR System) inkubiert. Der Probe wurden 20 µL nukleasefreies Wasser hinzugegeben. Das DNA-Gemisch wurde mit 35 µL der durchmischten AMPure XP beads versetzt und für 20 Minuten mit dem Rotationsmischer vermischt. Es schloss sich der wie unter Punkt 2.6.4 beschriebene Aufreinigungsvorgang an, ohne die unter 2.6.4 beschriebenen initialen 500 µL Ethanol. Die AMPure XP beads mit der gebundenen DNA wurden in 49 µL DNA-freiem Wasser resuspendiert und in dem New Brunswick™ Innova® 44 Inkubationsschüttler für 1 Minute bei 50 °C und 5 Minuten bei 23 °C inkubiert. Nun wurde die Probe erneut auf dem Magneten positioniert. Die aufgereinigte DNA wurde wie unter Punkt 2.5.4 quantifiziert. Die Enden der DNA wurden im Anschluss für die Adapterligation vorbereitet.

Tab. 8: DNA repair and end-prep mix

Substanz	Volumen in μL
DNA	48
DNA Repair Buffer	3,5
Ultra II End-prep reaction Buffer	3,5
Ultra II End-prep Enzyme Mix	3
FFPE DNA Repair Mix	2

Der Ansatz wurde bei 20 °C für 5 Minuten und bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Bindung und Reinigung der DNA mit 60 μL AMPure XP beads. Nach bereits beschriebener Vorgehensweise wurde die Elution in 61 μL DNA-freiem Wasser für 2 Minuten bei 23 °C in dem New Brunswick™ Innova® 44 Inkubationsschüttler inkubiert. Nach Separation des Eluats von den AMPure XP beads wurde die DNA wie unter Punkt 2.5.4 quantifiziert.

Im letzten Schritt der Erstellung der Sequenzierlibrary wurde diese mit Sequenzieradapter versehen und erneut aufgereinigt. Dazu wurde folgende Ligase Reaktion angesetzt, vermischt und für 10 Minuten in dem New Brunswick™ Innova® 44 Inkubationsschüttler bei 23 °C inkubiert:

Tab. 9: Ansatz zur Adapterligation

Substanz	Volumen in μL
DNA	60
Ligation Buffer	25
NEBNext Quick T4 DNA Ligase	10
Adapter Mix	5

Nach Ligation der Sequenzieradapter wurden 40 μL AMPure XP beads hinzu pipettiert und für 5 Minuten auf dem Tube-Rotator rotiert. Die Probe wurde herunterzentrifugiert und auf dem DynaMag™-2 Magnet platziert. Nach Akkumulation der AMPure XP beads wurde

die Flüssigkeit heraus pipettiert und das Pellet zweimalig in 250 µL „Long Fragment Buffer“ resuspendiert, herunterzentrifugiert, erneut auf dem Magneten platziert und der Überstand heraus pipettiert. Abschließend wurden die DNA enthaltenden AMPure XP beads in 15 µL „Elution Buffer“ gelöst und für 10 Minuten bei 37 °C im New Brunswick™ Innova® 44 Inkubationsschüttler inkubiert und der nun die DNA enthaltende „Elution Buffer“ mit Hilfe des DynaMag™-2 Magneten von den AMPure XP beads separiert und in ein 1,5 ml Reagenzgefäß pipettiert. Die Probe wurde wie unter Punkt 2.5.4 quantifiziert.

2.7.4. Vorbereitung und Beladung der Flow Cell für die Nanoporen-Sequenzierung der Probandenprobe

Die Sequenzierung wurde nach Angaben des „Premium whole genome amplification protocol“ (WAL_9070_v109_revO_14Aug2019) durchgeführt, was in der Vorgehensweise jener der unter 2.7.1 beschriebenen Vorgehensweise entspricht. Es unterscheidet sich lediglich die Zusammensetzung der DNA-Library, die sich aus 37,5 µL „Sequencing Buffer“, 25,5 µL „Loading Beads“ und 12 µL DNA-Probe besteht.

2.7.5. Bioinformatische Auswertung der Nanoporen-Sequenzierung

Das Programm „Kraken 2“ sowie die Datenbank „PFPLUS“ wurde zur Zuordnung zwischen metagenomischer DNA-Sequenzen und taxonomischer Labels verwendet. Alle identifizierten Gene sind im Anschluss mit den Resistenzgen-Datenbanken „ResFinder“, „ARG-ANNOT“ und „CARD“ abgeglichen worden, um Resistenzgene identifizieren zu können.

2.8. Laborgeräte und Software

Tab. 10: Laborgeräte und Software

Hersteller	Produkt	Produktnummer
Agilent Technologies	4150-TapeStation System	G2992AA
Agilent Technologies	TapeStation Software 3.2	G2964-60411
Applied Biosystems™	ProFlex™ PCR System	4484073
Bio-Rad Laboratories	C1000 Touch Thermal Cycler CFX96	1855196
Biozym	Sprout Plus Minizentrifuge	552032
CappRondo	CRP-18X Plate Shaker	B015XWVH3S
EP Research® plus G	Centrifuge 5810 R	EP5811000015
EP Research® plus G	Einkanalpipette 0,1 – 2,5 µL	EP3120000011
EP Research® plus G	Einkanalpipette 1-10 µL	EP3121000015
EP Research® plus G	Einkanalpipette 20 - 200 µl	EP3120000054
EP Research® plus G	Einkanalpipette 100 – 1000 µL	EP3120000062
Eppendorf®	Thermomixer comfort	5355000.001
Eppendorf®	New Brunswick™ Innova® 44 Inkubationsschüttler	M1282-0002
IKA	IKA MS 3 Vortexer	VWR-MS3
Illumina	TruSeq Index Plate Fixture Kit (reusable)	FC-130-1005
INTEGRA (BIOSCIENCES)	Pipettierhelfer, PIPETBOY acu 2	612-0928
Invitrogen™	DynaMag™-2 Magnet	12321D
Invitrogen™	Invitrogen™ DynaMag™-96 Side Skirted Magnet	12027
Oxford Nanopore Technologies	MinION	MIN-101B
Promega	Quantus™ Software 2.0.1.0	E6150
Promega	Quantus™ Fluorometer	E6150

Roche Applied Science	LightCycler® 480 Software, Version 1.5	04994884001
Roche Applied Science	LightCycler® 480 Instrument II	05015278001
Snijders	Tube-Rotator	34528E
Sunlab®	Sunlab® Mini Vortex Mixer (SU1900), 3000 UpM D-8900	D-8900
ThermoFisher scientific	Thermo Scientific Safe S 2020 1.8 Sicherheitswerkbank Safety	42027659
ThermoFisher scientific	NanoDrop™ One/OneC Mikrovolumen- UV/VIS-Spektralphotometer	840-329700
VWR Peqlab	PCR Workstation Pro	732-2840DE
Oxford Nanopore Technologies	Minlon Mk1b	Min-101B

2.9. Verbrauchsmaterialien

Tab. 11: Verbrauchsmaterialien

Hersteller	Produkt	Produktnummer
Agilent Technologies	D1000 ScreenTape. For the analysis of DNA from 35 to 1000 bp	5067-5582
Agilent Technologies	Optical tube strips (8x Strip)	401428
Agilent Technologies	Tube Strip Caps	401425
Agilent Technologies	Genomic ScreenTape analysis; DNA samples up to greater than 60,000 bp.	5067-5365
Agilent Technologies	Genomic DNA Reagents For the analysis of genomic DNA from 200 to 60000bp	5067-5366
Agilent Technologies	Loading Tip	5067-5598
Beckman Coulter Genomics	Agencourt AMPure XP Beads	A63881
Bio-Rad	Microseal 'A' adhesive seals	MSA-5001
Bio-Rad	96-well 0.2 ml skirtless PCR plates	MSP-9601

Bio-Rad	Microseal 'B' adhesive seals	MSB-1001
CELLSTAR [®]	10 ml Pipette, 1/10 Graduierung, Kunststoff/Kunststoff Verpackung, steril	607 160
EP Research [®] plus G	ep Dualfilter T.I.P.S. [®] , PCR clean und steril, 0,1 - 10 µL	EP0030077555
ThermoFisher Scientific	96-well storage plates, round well, 0.8 ml ("MIDI" plate)	AB-0859
Illumina	MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)	MS-102-3003
Illumina	Nextera XT Index Kit	FC-131-1002
Invitrogen	Ambion Nuclease-Free Water	AM9930
KAPA Biosystems	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)*	KK2602 07958935001
KimtechScience	Einmal-Wischtücher KIMTECH [®] Science Präzisionstücher	0036000055115
Molzym GmbH & Co. KG	DNA-free water PCR grade	P-020-0003
Oxford Nanopore Technologies	Ligation Sequencing Kit	SQK-LSK109
Oxford Nanopore Technologies	Flongle	FLO-FLG001
Promega	QuantiFluor [®] ONE dsDNA Dye	E489A
Promega	QuantiFluor [®] ONE Lambda DNA	E490B
Promega	TE Buffer (pH 7.5)	E497B

Sarstedt AG & Co.	Multiply [®] -µStrip Pro 4er Kette	72.990.002
Sarstedt AG & Co.	0,5ml DNA LowBind Reagenzgefäß	72.704.700
Sarstedt AG & Co.	Biosphere [®] Filter Tip 100	70.760.217
Sarstedt AG & Co.	Biosphere [®] Tip 1250ul, lang	70.1186.210
Sarstedt AG & Co.	Biosphere [®] Tip 0.5-10ul	70.1114.210
Sarstedt AG & Co.	Biosphere [®] Tip 300 ul	70.765. 215

Sarstedt AG & Co.	1,5ml DNA LowBind Reagenzgefäß	72.706.400
VWR Chemicals	Ethanol absolut	437433T
VWR International Inc.	Reagent reservoirs 100ml	89094-658
Zymo	Quick-DNA Fungal / Bacterial Microprep Kit	D6007
ThermoFisher Scientific	dNTP Set, molecular biology grade	R0181
ThermoFisher Scientific	Exo-Resistant Random Primer	SO181
ThermoFisher Scientific	EquiPhi29 DNA Polymerase	A39391
Oxford Nanopore Technologies	Rapid Barcoding Kit	SQK-RBK004
Oxford Nanopore Technologies	Flow Cell Priming Kit	EXP-FLP002
Oxford Nanopore Technologies	Flow Cell 9.4.1	FLO-MIN106D
NewEngland BioLabs Inc.	T7 Endonuclease I	M0302S
NewEngland BioLabs Inc.	Ultra II End-prep reaction Buffer	10008028
NewEngland BioLabs Inc.	DNA Repair Buffer	10012744
NewEngland BioLabs Inc.	FFPE DNA Repair Mix	10013285
NewEngland BioLabs Inc.	Ultra II End-prep Enzyme Mix	10008027
NewEngland BioLabs Inc.	NEBNext Quick T4 DNA Ligase	E6057a
GalaxoSmithKline	Corsodyl	44673/0059
Bio-Rad	Chelex 100 Molecular Biology Grade Resin	1421253
Pierre Fabre Oral Care	Elugel Bukkalgel 40 ml	357705602272 2

2.10. Benutzerhandbücher und Protokolle

Tab. 12: Benutzerhandbücher und Protokolle

Hersteller	Produkt	Produktnummer
Illumina	16s-metagenomic-library-prep-guide	15044223
Promega	Quantus™ Fluorometer Operating Manual	TM396
ThermoFisher scientific	NanoDrop One User Guide	269-309102
Agilent Technologies	Agilent D1000 ScreenTape Quick Guide for TapeStation Systems	G2991-90031
Zymo	Instruction Manual Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit	D6007
Beckman Coulter Genomics	Agencourt AMPure XP Beads Instructions for use	B37419AB
Oxford Nanopore Technologies	Rapid Barcoding Sequencing	RBK_v2_revP_14 Aug2019
Oxford Nanopore Technologies	Premium whole genome amplification protocol	WAL_9070_v109_revO_14Aug2019
ThermoFisher Scientific	EquiPhi29 DNA Polymerase User Guide	A39391

2.11. Verwendete Primer

Tab. 13: Verwendete Primer

16SFP_ill	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNG-GCWGCAG
16SRP_ill	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGG-TATCTAATCC
Exo-Resistant Random Primer (Thermo)	5'-NpNpNpNpNp ^S Np ^S N-3'

3. Ergebnisse

3.1. Aufstellung des Patientenkollektivs

Insgesamt konnten für die klinische Studie initial 50 Patienten mit aggressiver Parodontitis (Stadium III oder IV Grad C) gewonnen werden, von denen Proben von 44 Patienten zu den jeweils 4 verschiedenen Behandlungszeitpunkten (vor Behandlung (0), 3, 6, 12 Monate nach Behandlungsbeginn) sequenziert werden konnten.

Der Wegfall einiger Patienten ist durch eine zusätzliche Antibiotikaeinnahme oder den Nichtantritt während der Verlaufsuntersuchungen zu begründen. Darunter befanden sich 18 männliche und 26 weibliche Individuen, wovon 9 Personen mindestens 10 Zigaretten täglich konsumierten. Es konnten 23 Probanden der Testgruppe und 21 Probanden der Kontrollgruppe sequenziert werden.

3.2. Ergebnisse der Illumina-Sequenzierung

Die auf der Illumina Sequenzierplattform generierten Daten lassen sich mit Hilfe des QIIME 2 Programms statistisch auswerten und illustrieren. Die *p*-Werte wurden bei $\leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

In dem Säulendiagramm (vgl. Abb. 5) sind die jeweiligen Proben auf der X-Achse durch ihren Entnahmezeitpunkt (A, B, C, D) sowie ihrer Randomisierung (T, K) kenntlich gemacht (vgl. Anhang 1).

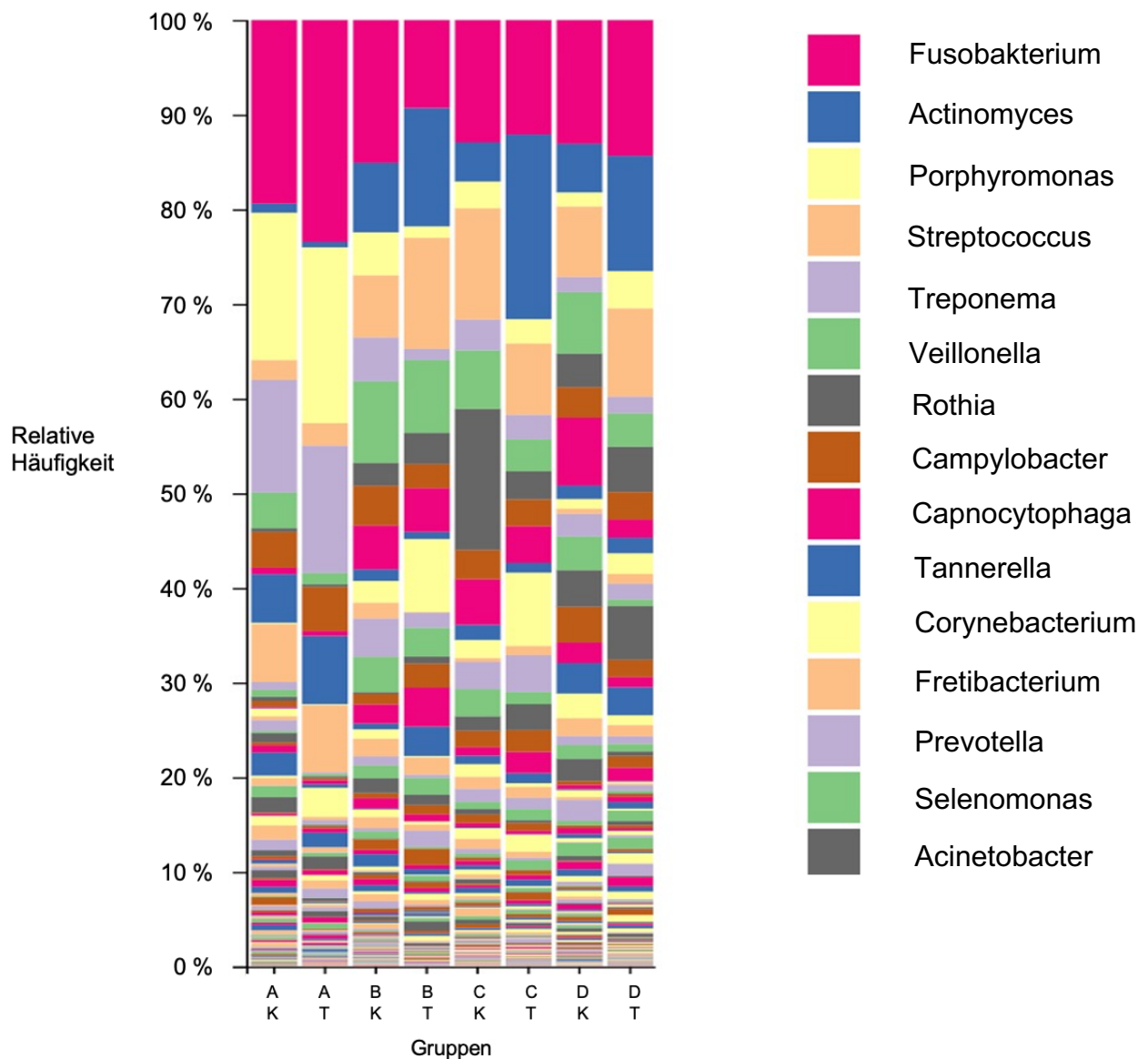


Abb. 5: Relative Taxa Frequenz der Mikrobiota der Test- (T) und Kontrollgruppe (K) vor subgingivaler Instrumentierung und Einnahme von AMX+MET (A) und 3 Monate (B), 6 Monate (C), 12 Monate (D) nach Therapiebeginn auf Genus Level

Auf der Y-Achse sieht man die relative Frequenz der vorkommenden Taxonomien des Genuslevels. Grundsätzlich ist zu sehen, dass die Diversität vor Beginn der Therapie (Zeitpunkt A), sowohl bei der Test- als auch bei der Kontrollgruppe, geringer ausgeprägt ist als nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B, C, D) (vgl. Abb.5).

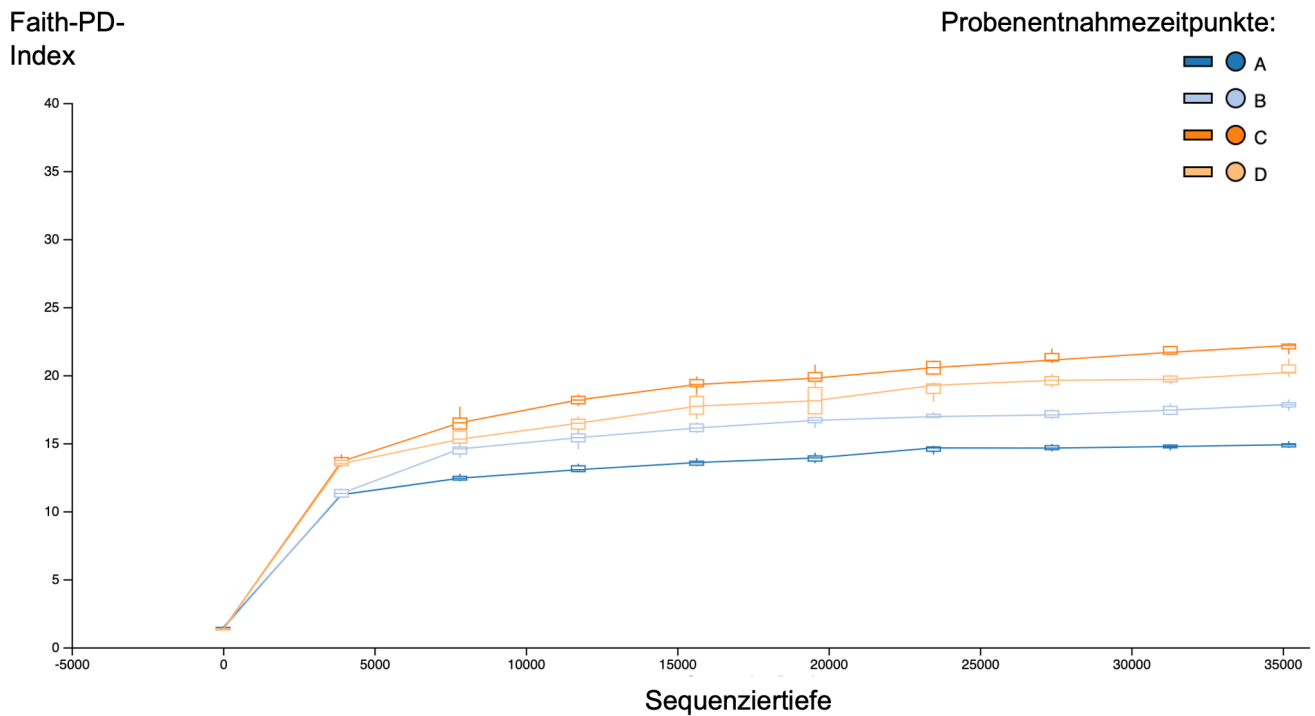


Abb. 6: Refraktionsdiagramm, das die gesamte Zweiglänge unter Verwendung des Faith-PD-Index zeigt zu den Probenentnahmezeitpunkten A bis D ohne statistische Signifikanz ($p\text{-Wert} > 0,05$)

Dieser Trend lässt sich auch in Abb. 6 veranschaulichen, bei der auf der Grundlage des Faith-PD-Index berechnete Refraktionskurven für die Probenentnahmezeitpunkte A bis D abgebildet werden. Der Trend ist jedoch nicht statistisch signifikant ($p\text{-Wert} > 0,05$).

Vergleicht man die Anwesenheit einzelner Bakteriengattungen beider Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten, so lässt sich erkennen, dass die *Actinomyces*-Gattung zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme (Zeitpunkt A) grundsätzlich deutlich seltener vertreten ist, als zu jedem späteren Zeitpunkt nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B, C, D). Gegenteiliges fällt bei der Gattung des *Treponemas*, *Tannerellas* und vor allem des *Porphyromonas* auf. Diese Gattungen beinhalten bekannte Spezies des sogenannten roten Komplexes, der aggressive Parodontopathogene umfasst (vgl. Abb. 7).

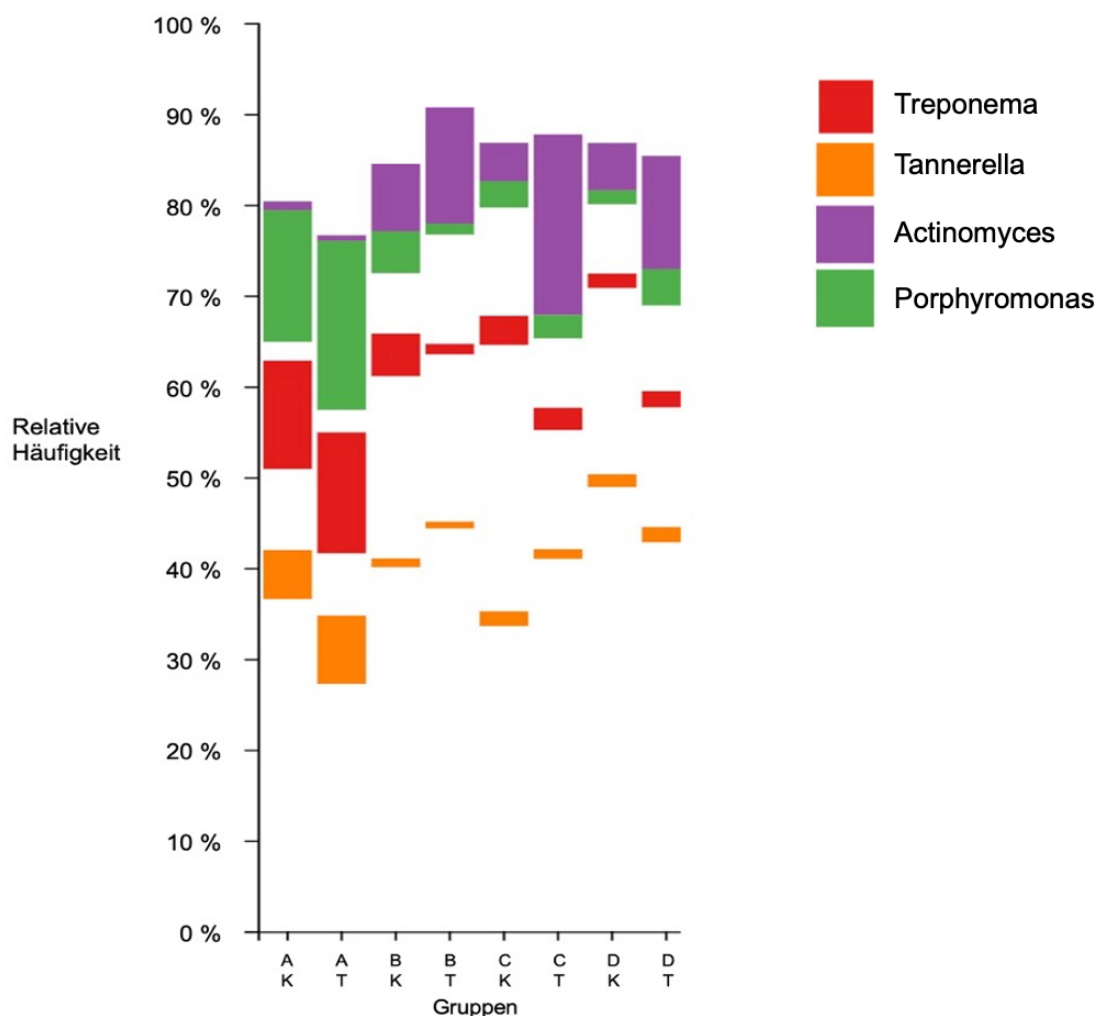


Abb. 7: Säulendiagramm der relativen Häufigkeit einzelner Bakteriengattungen von den Probenentnahmezeitpunkten A bis D der Kontroll (K)- und Testgruppe (T)

Vergleicht man die Test (T) - und Kontrollgruppe (K) in ihrer Gesamtheit miteinander, lässt der Faith-PD-Index sowie der Shannon-Index (Alphadiversität) zu keinem Probenentnahmezeitpunkt nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B, C, D) einen signifikanten Unterschied in der Alphadiversität erkennen ($p\text{-Wert} > 0,05$) (vgl. Abb. 8 und Abb.9).

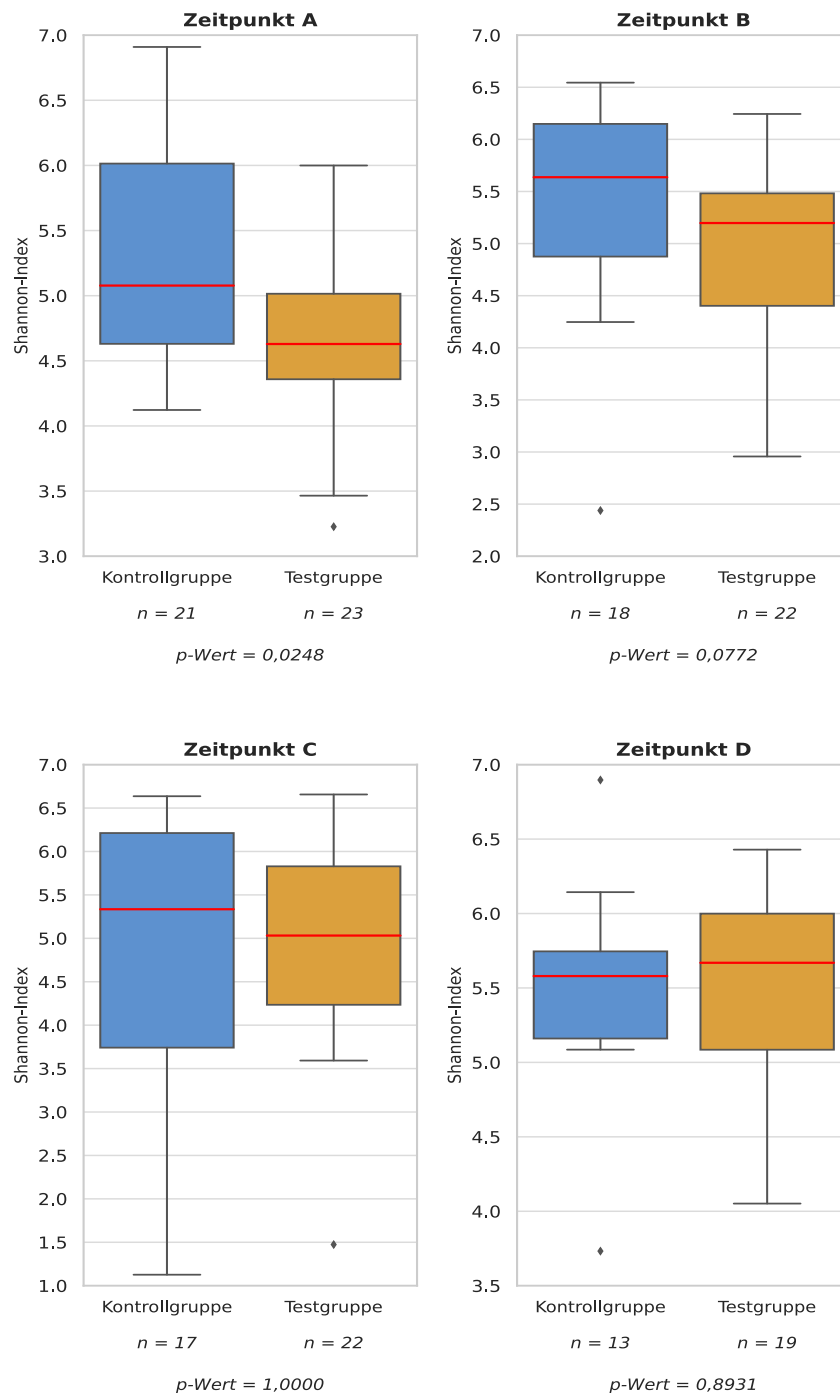


Abb. 8 Boxplots und p-Werte des Shannon-Diversitätsindex (Alphadiversität) der Test- (T) und Kontrollgruppe (K) zu den verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten A bis D

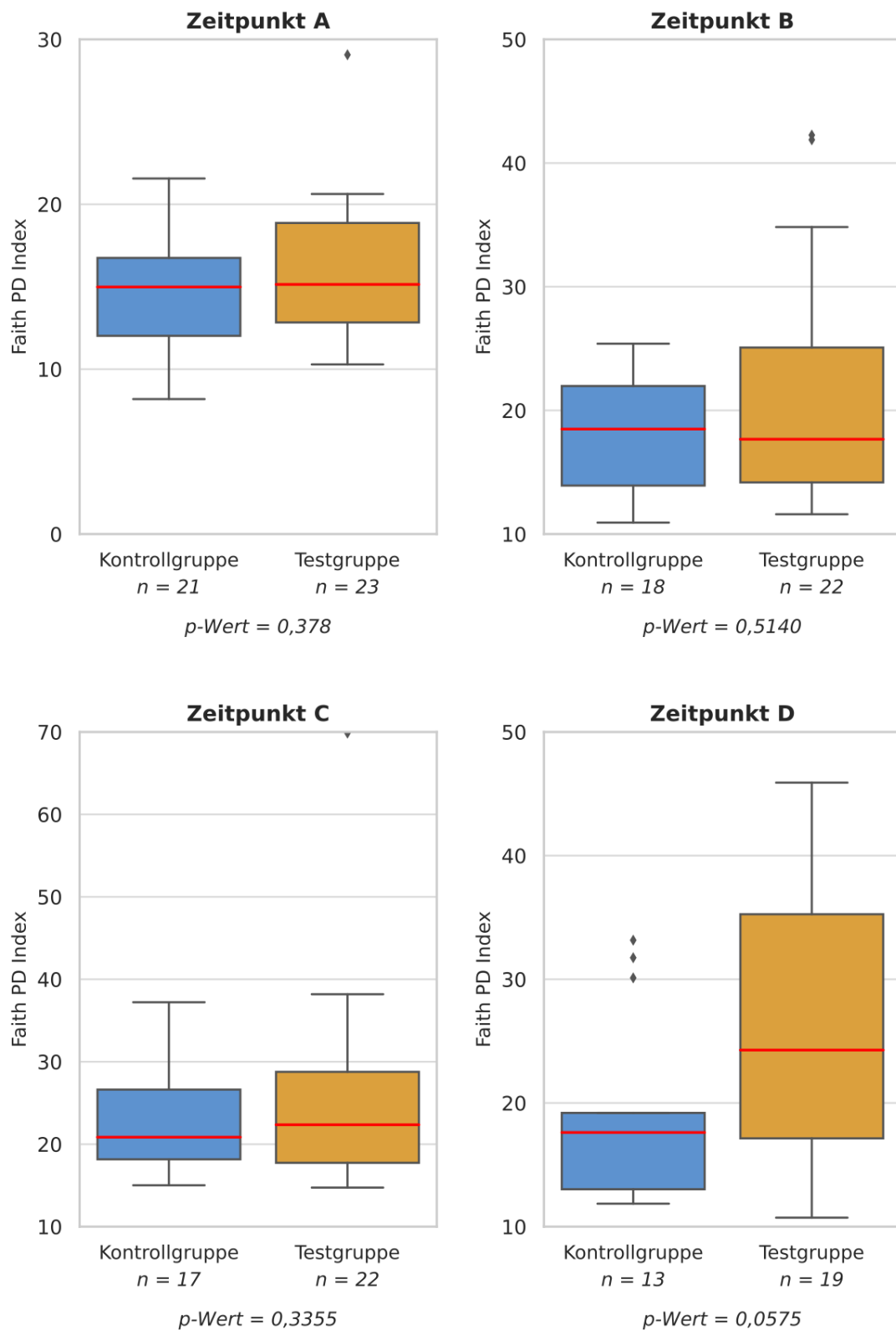


Abb. 9 Boxplots und p-Werte des Faith-PD-Index (Alphadiversität) der Test- (T) und Kontrollgruppe (K) zu den verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten A bis D

Bei der Beurteilung der Gleichmäßigkeit der Taxaverteilung des Mikrobioms der jeweiligen Patientengruppen (T, K) anhand des Pielou-Index (Alphadiversität) erkennt man vor der Behandlung (Zeitpunkt A) und 3 Monate nach der Therapie (SI+AMX+MET) (Zeitpunkt B) eine statistisch signifikante Reduzierung der Gleichmäßigkeit beziehungsweise eine statistisch signifikante Reduktion der numerischen Biodiversität (genetische Vielfalt der Bakterien) in der Testgruppe (T) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K) (Zeitpunkt A *p*-Wert: 0,0160; Zeitpunkt B *p*-Wert: 0,0193) (vgl. Abb. 10 Zeitpunkt A+B). Zu den Zeitpunkten C und D gleicht sich die numerische Biodiversität der Test- und Kontrollgruppe wieder an (vgl. Abb. 10 Zeitpunkt C+D).

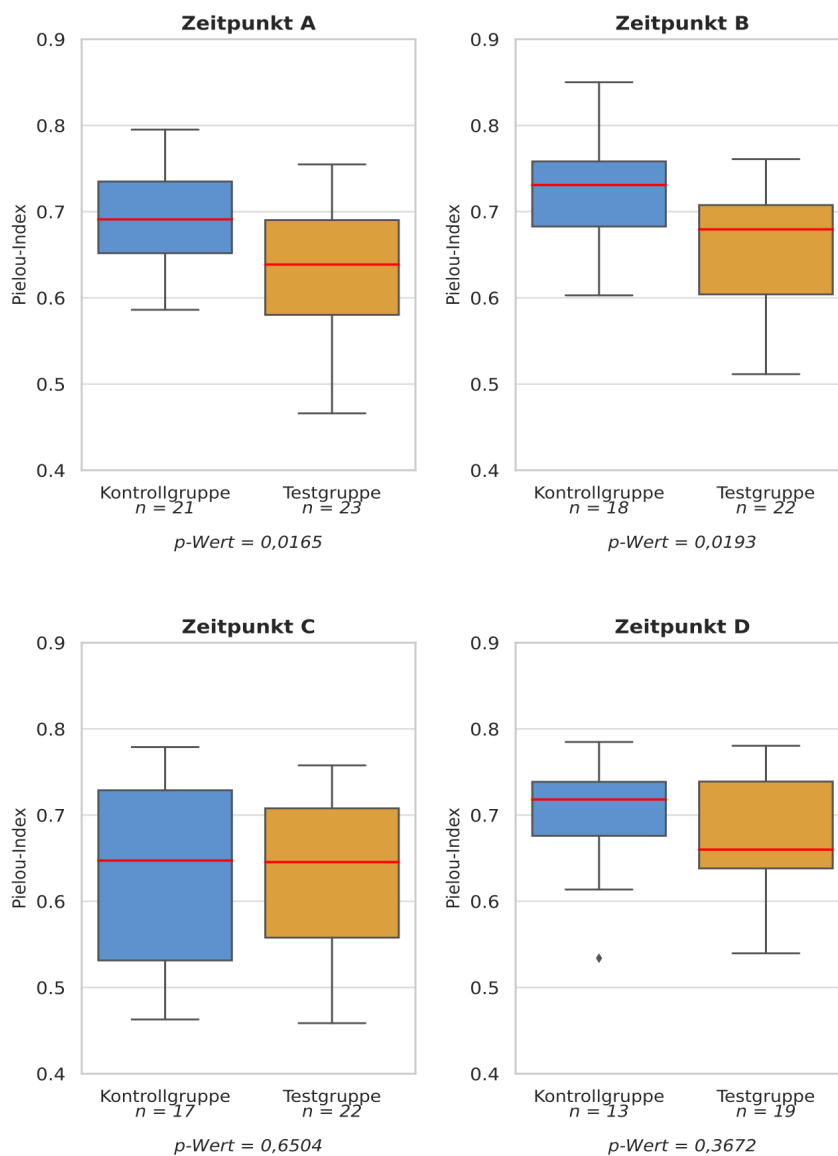


Abb. 10: Boxplots und p-Werte des Pielou-Diversitätsindex (Alphadiversität) der Test- (T) und Kontrollgruppe (K) zu den verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten A bis D

Die Betadiversität wurde mit der gewichteten UniFrac-Distanzanalyse berechnet. Dabei zeigen die Vergleiche aller Probenentnahmezeitpunkte (Zeitpunkte A bis D) der Test- (T) und der Kontrollgruppe (K) keine statistisch signifikanten Unterschiede in der relativen Häufigkeit der einzelnen Taxa innerhalb des Mikrobioms ($p\text{-Wert} > 0,05$) (vgl. Abb. 11). Dies wurde durch die Berechnung des Jaccard-Koeffizienten bestätigt, der ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Mikrobiota ergab (vgl. **Tab 14**).

Tab 14: Berechnung des Jaccard-Koeffizient (Betadiversität) zwischen Test- (T) und Kontrollgruppe (K) zu den verschiedenen Zeitpunkten (A, B, C, D)

Zeitpunkt	Probenumfang	$p\text{-Wert}$
A	44	0.434
B	40	0.315
C	39	0.755
D	32	0.479

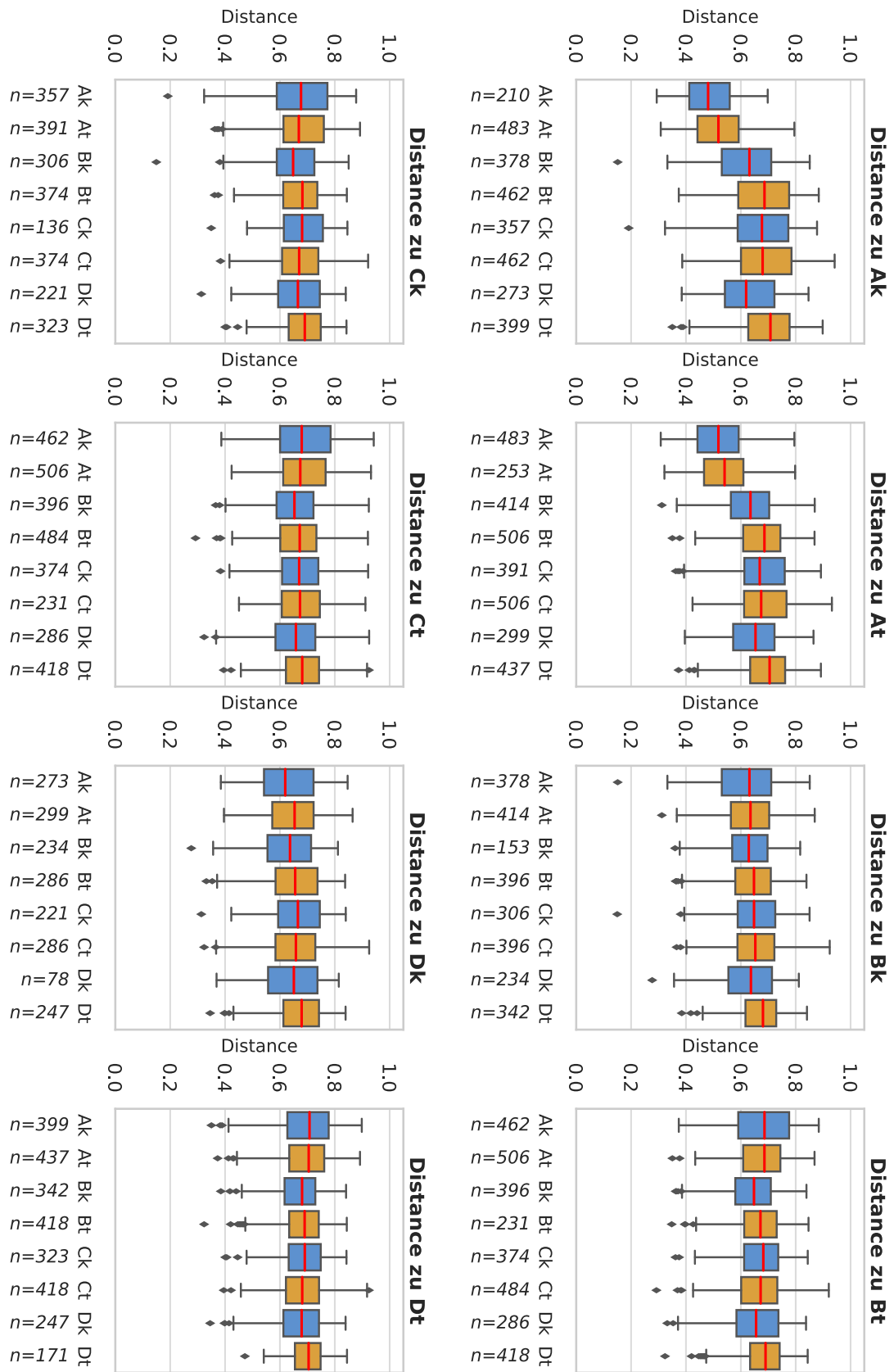


Abb. 11: Gewichtete UniFrac-Distanzanalyse aller Probenentnahmezeitpunkte (A bis D) der Test- (T) und Kontrollgruppe (K) zur Bestimmung der Betadiversität

Werden die Probenzusammensetzungen der Frauen im Hinblick auf die Alphadiversität betrachtet, so fällt unter Zuhilfenahme des Faith-PD-Index (Alphadiversität) auf, dass sich das Mikrobiom zum Probenentnahmezeitpunkt D (12 Monate nach Therapie durch SI + AMX + MET) bei den in der Testgruppe (T) befindlichen Frauen signifikant von dem der Kontrollgruppe (K) unterscheidet (p -Wert: 0,0436), im Sinne einer höheren phylogenetischen Diversität in der Testgruppe. Alle weiteren Indizes zeigen keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 12).

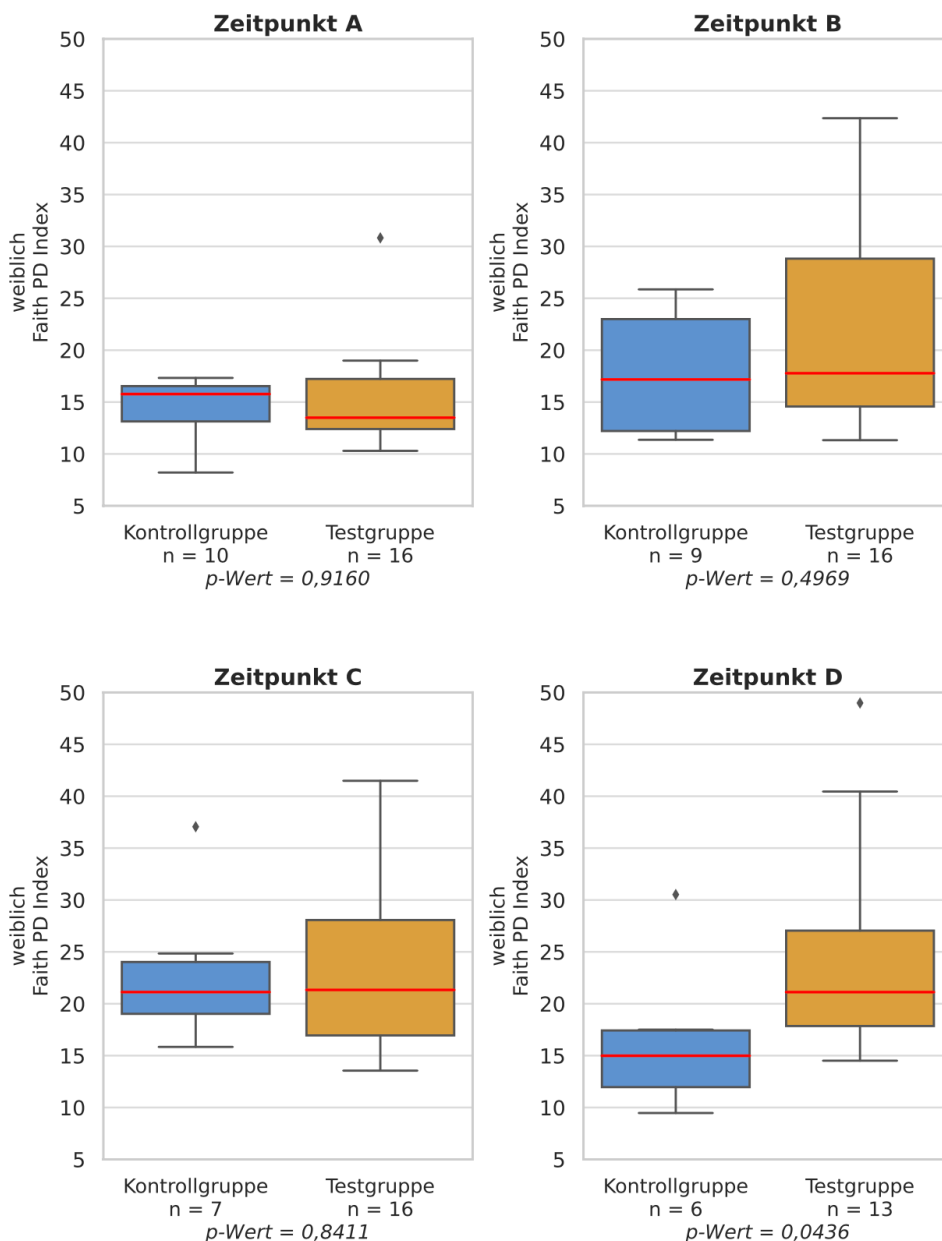


Abb. 12: Boxplots und p -Werte des Faith-PD-Index (Alphadiversität) der Frauen der Test- (T) und Kontrollgruppen (K) zu den verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten A bis D

Bei dem Vergleich der Test- und Kontrollgruppe der Männer (vgl. Abb. 13) zeigt der -Diversitätsindex (Alphadiversität) zu Zeitpunkt B (3 Monate nach SI + AMX + MET) eine Verschiedenheit, die statistisch signifikant ist (p -Wert: 0,0046). Der näher an 1 liegende Pielou-Diversitätsindex der Kontrollgruppe deutet auf eine zu dem Zeitpunkt gleichmäßigere Taxaverteilung hin als bei der Testgruppe. Dieser Unterschied relativiert sich jedoch zu späteren Entnahmezeitpunkten der Proben (p -Wert > 0,05).

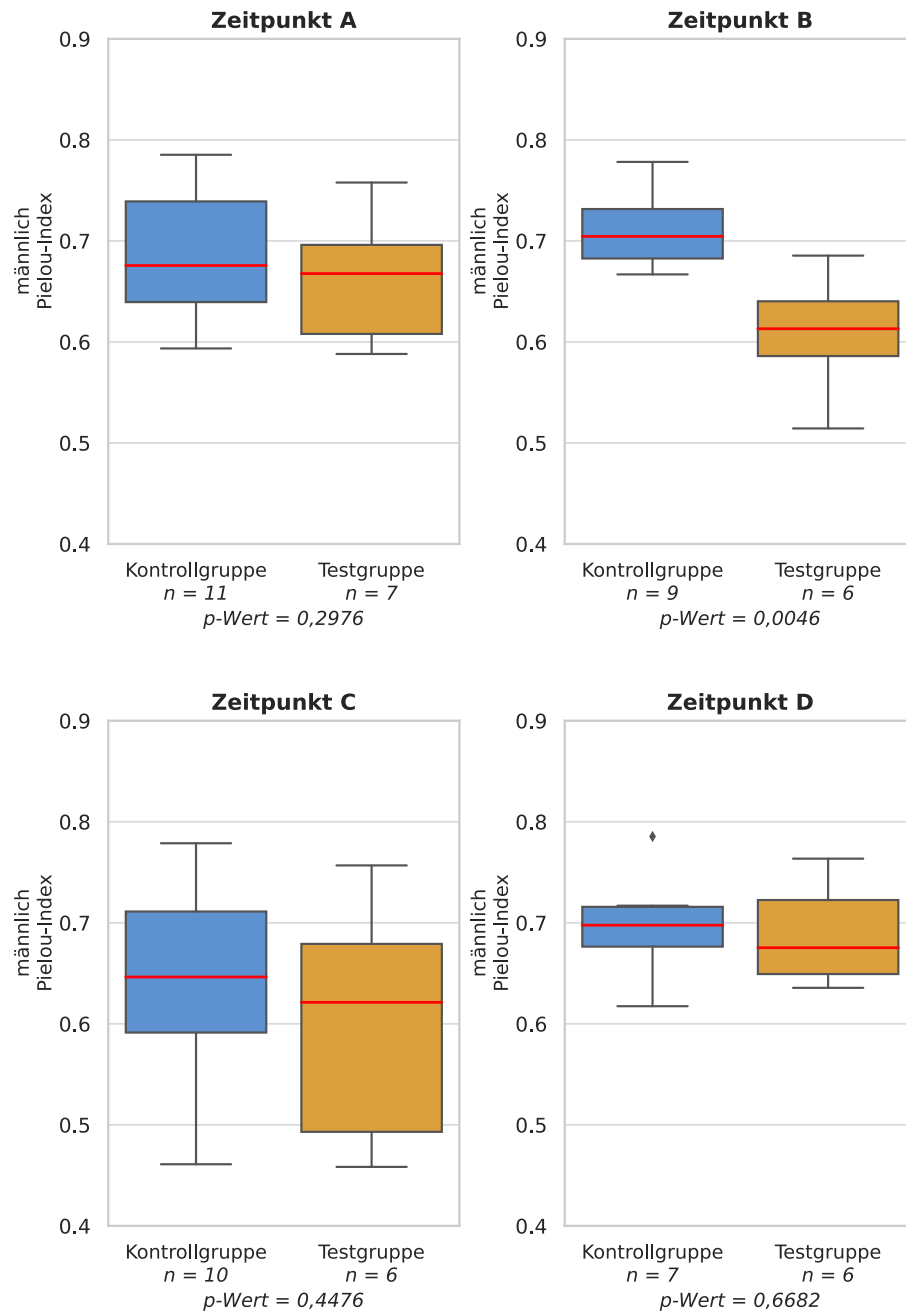


Abb. 13: Boxplots und p -Werte des -Diversitätsindex (Alphadiversität) der Männer aus Test- (T) und Kontrollgruppen (K) zu den Probenentnahmezeitpunkten A bis D

Vergleicht man die Testgruppen beider Geschlechter, zeigen der Shannon-Index und der Pielou-Index (Alphadiversität) die statistische Signifikanzgrenze überschreitende Unterschiede nach Therapie zu Zeitpunkt B (3 Monate nach SI + AMX + MET) (p -Wert: 0,0149) (p -Wert: 0,0223) (vgl. Abb. 14 und Abb. 15). Es ist eine geringere Gleichmäßigkeit der Taxaverteilung zu beobachten.

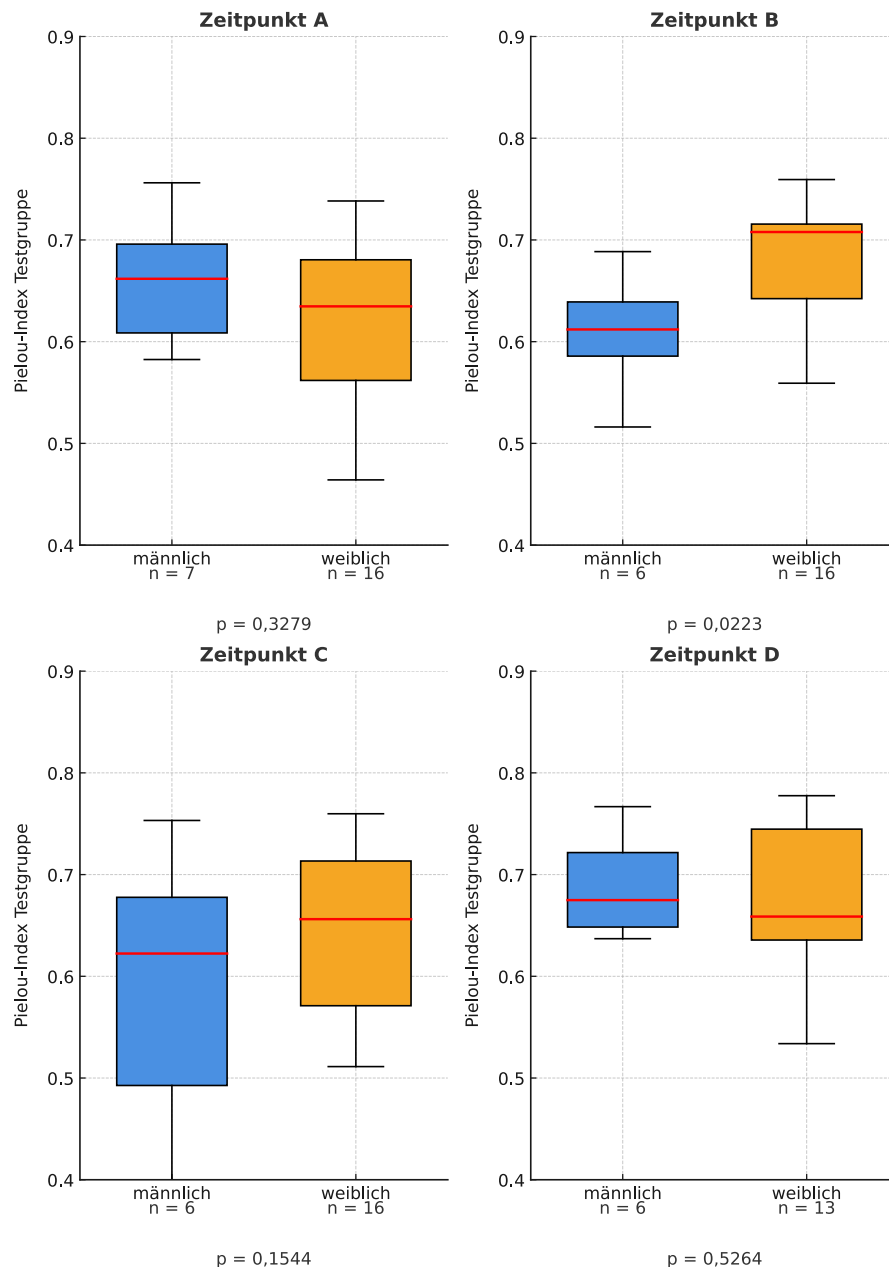


Abb. 14 Pielou-Index (Alphadiversität) sowie der dazugehörige p -Wert der Testgruppen (T) beider Geschlechter zu Probenentnahmezeitpunkten A bis D

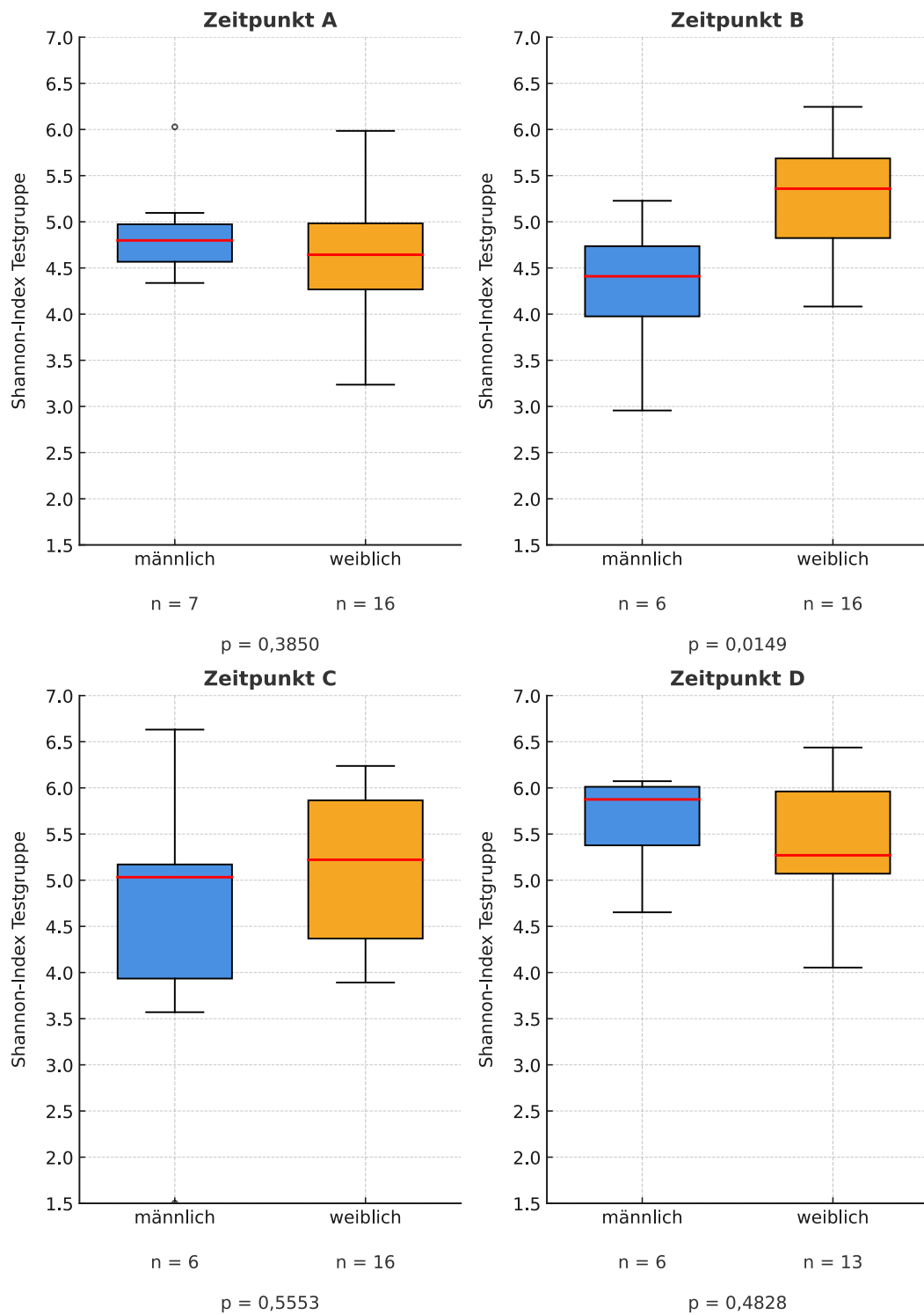


Abb. 15: Shannon-Index (Alphadiversität) sowie der dazugehörige p -Wert der Testgruppen (T) beider Geschlechter zu Probenentnahmezeitpunkten A bis D

Werden die verschiedenen Boxplots zur Alphadiversität (Faith-PD-Index, Pielou-Diversitätsindex, Shannon-Index) der in der Kontroll- (K) beziehungsweise Testgruppe (T) befindlichen Raucher betrachtet, finden sich keine signifikanten Unterschiede ($p\text{-Wert} > 0,05$) (vgl. Abb. 16).

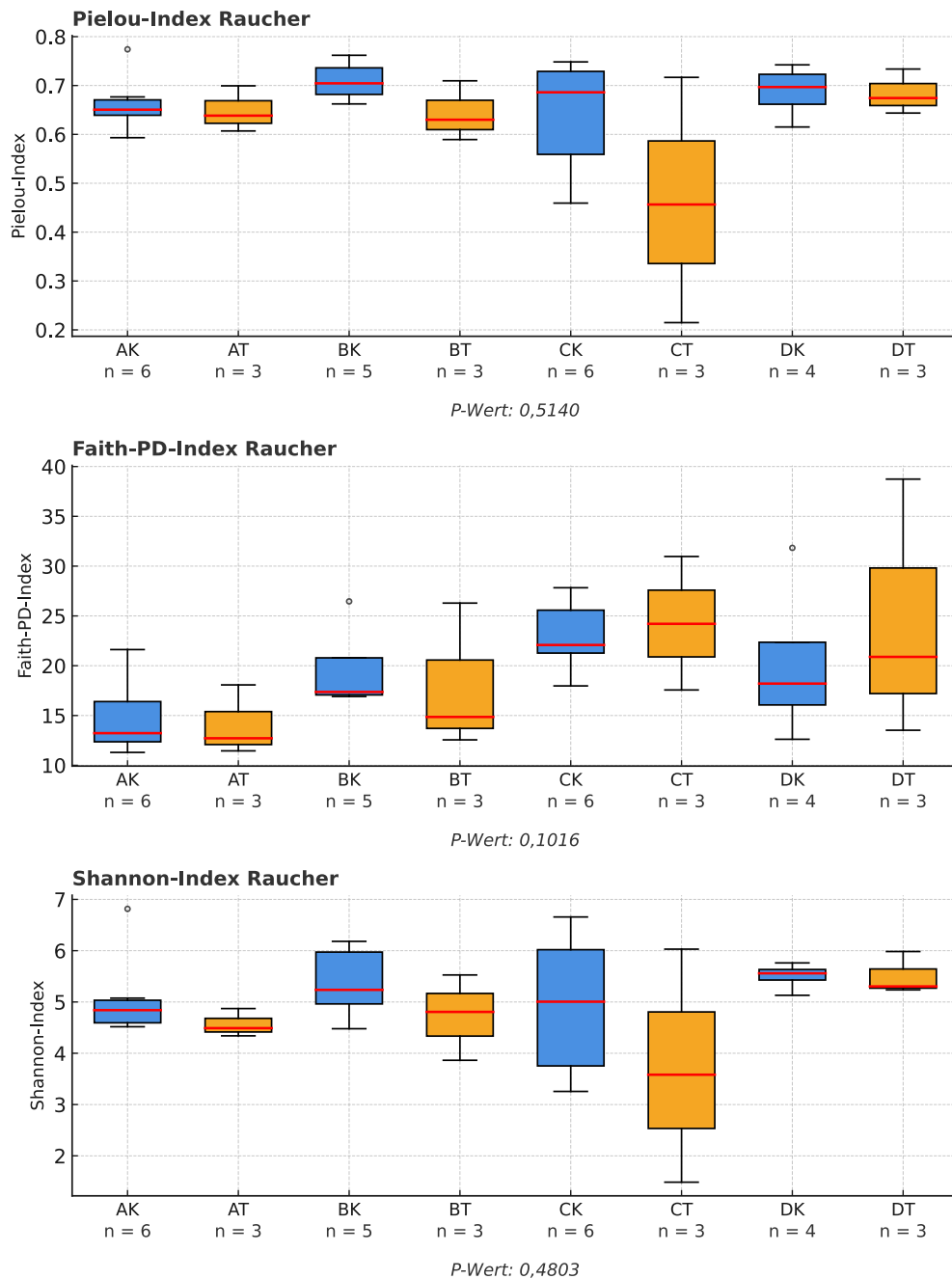


Abb. 16: Darstellung der Alphadiversität der Raucher von Kontroll- (K) und Testgruppe (T) durch den Shannon-Index, den Pielou-Diversitätsindex sowie den Faith-PD-Index (Alphadiversität)

3.3. Ergebnisse der Oxford Nanoporen Sequenzierung

Von insgesamt 1.428.202 Reads waren 92,6 % (1.322.074 Reads / 3.873.757.811 Basenpaare) nach der Qualitätskontrolle verwertbar. Nach der taxonomischen Klassifizierung waren 5,8 % der Reads nicht klassifizierbar. Weiterhin stammten 80,26 % der Reads aus humanen Quellen und waren somit für das Studienziel irrelevant. Die übrigen 13,45 % der Sequenz-Reads konnten Bakterien zugeordnet werden. Die taxonomische Klassifizierung ergab insgesamt 6 verschiedenen Bakterienspezies (siehe Tab. 15).

Tab. 15: Relative Abundanz der verschiedenen Spezies und Anzahl der zugehörigen Reads der beispielhaften Gesamtgenom-Sequenzierung einer Baseline-Patientenprobe

Organismus	Anzahl Reads	Anteil an gesamten Reads
Mensch	1061132	80,26 %
Bakterien insgesamt	177769	13,45 %
<i>Tannerella forsythia</i>	52840	4,00 %
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	24155	1,83 %
<i>Campylobacter rectus</i>	12020	0,91 %
<i>Desulfobulbus oralis</i>	4318	0,33 %
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	6855	0,52 %
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5935	0,45 %

Wie in Tabelle 16 zu erkennen ist, können 99,99 % der gesamten Reads keiner Resistenzensequenz zugeordnet werden. Von dem restlichen Prozentsatz (0,01 %) konnte die Mehrheit der Sequenzen dem *pgpB*-Gen zugeordnet werden und lediglich 1 Read dem *pmrA*-Gen, die jeweils *P. gingivalis* und *S. oralis* zuzuordnen sind.

Tab. 16 Resistomzuordnung zu identifizierbaren Genen

Resistomzuordnung	Anzahl Reads	Anteil an Gesamt - Reads
Number of Unmapped Sequences:	1321962	99,99 %
Number of Mapped Sequences (incl. secondary mappings):	112	0,01 %
Matches to:		
*groot-db_CARD__gb AP009380.1 - 573191-573902 ARO:3003920 pgpB	101	
*groot-db_CARD__gb NC_003098.1 + 866210-867410 ARO:3000822 pmrA	1	

4. Diskussion

In dieser Studie wurde das Ziel verfolgt, die Veränderungen des subgingivalen Mikrobioms bei Patienten mit aggressiver Parodontitis (Parodontitis Stadium III oder IV, Grad C) zu untersuchen und abzuleiten, ob diese Analyse geeignet ist, den Therapieerfolg zu messen. Die Patienten wurden randomisiert und entweder mit subgingivaler Instrumentierung (SI) und einer Kombination von Amoxicillin (AMX) und Metronidazol (MET) (jeweils 500 mg, dreimal täglich) für 3 Tage (Testgruppe; T) oder für 7 Tage (Kontrollgruppe; K) behandelt. Subgingivale Biofilmproben wurden mithilfe der 16S rRNA-Metagenom-Sequenzierung auf Veränderungen des subgingivalen Mikrobioms in beiden Gruppen vor der Therapie und 3, 6 und 12 Monate nach Therapie analysiert. Die Abstriche der Patienten standen lediglich zur Sekundäranalyse für diese Studie zur Verfügung (Cosgarea et al., 2022).

Die Hypothese, dass unterschiedliche Antibiotikaeinnahmeprotokolle bei gleichen Krankheitsbildern und identischer mechanischer Therapie zu keinen statistisch signifikanten Abweichungen in der Mikrobiomzusammensetzung zwischen beiden Therapiegruppen kommt, konnte bestätigt werden. Es zeigte sich eine Zunahme der mikrobiellen Diversität in der Test- als auch in der Kontrollgruppe, die als Therapieerfolg gedeutet werden könnte. Andere Studien deuten darauf hin, dass eine Normalisierung des Mikrobioms mit mehr Diversität einhergeht (Shen et al., 2024; Yang et al., 2024). Daneben wurde mittels der Oxford-Nanoporen-Sequenzierung eine Methode entwickelt um das subgingivale Resistom näher zu untersuchen. Die Hypothese, dass eine verlängerte Antibiose zu vermehrter Resistenzbildung führt, konnte verfahrensbedingt nicht vervollständigt werden. Es sollte jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass es sich bei der 3- oder 7-tägigen Antibiotikaeinnahme nicht um eine langfristige Antibiotikatherapie handelt, wie es beispielsweise bei einer periprotektischen Gelenkinfektion der Fall ist. Die Betroffenen werden dabei unter Umständen mehrere Wochen mit Antibiotika therapiert und so einem größerem Risiko der Resistenzentwicklung ausgesetzt (Lora-Tamayo et al., 2024)

Die Reduktion der TST und der Gewinn an Attachment sind bei einer adjuvanten Antibiotikagabe, vor allem bei jüngeren Patienten mit schnell progredienten und fortgeschrittenen Parodontitisformen, statistisch signifikant höher als bei einer rein mechanischen Plaquekontrolle. Daher empfiehlt die S3-Leitlinie „Behandlung der Parodontitis Stadium I bis III“ den gezielten Einsatz einer adjuvanten Antibiose in speziellen Fällen (Pretzl et al., 2019; Sanz et al., 2020a).

Um die mit dem Antibiotikaeinsatz assoziierten Probleme, wie nachhaltige Mikrobiomveränderungen, erhöhte Infektionsanfälligkeit, allergische Reaktionen oder Resistenzentwicklung - um nur einige der zahlreichen Nebenwirkungen zu nennen - zu minimieren, könnte ein Ansatz die verkürzte Antibiotikagabe sein, ohne auf die positiven Effekte des Antibiotikums verzichten zu müssen (Costello et al., 2012; Fujimura und Lynch, 2015; Jernberg et al., 2010; Ogawara, 2019; Vangay et al., 2015).

Sowohl in der Test- als auch in der Kontrollgruppe wurden nach Beginn der Therapie Veränderungen im mikrobiellen Profil beobachtet. Es war eine Zunahme der Diversität zu den Zeitpunkten B, C und D im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt A festzustellen, die jedoch nicht statistisch signifikant ist und sich im Verlauf weiter der Ausgangsdiversität nähert (vgl. Abb. 5 und Abb. 7). Für ein signifikantes Ergebnis wäre eine höhere

Probandenanzahl von Nutzen gewesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die therapeutischen Maßnahmen in beiden Gruppen Auswirkungen auf die Vielfalt bzw. Zusammensetzung der oralen Mikrobiota hatten. Da sich der Zeitraum der Probenentnahme auf 12 Monate nach der Therapie beschränkt, können über längerfristig anhaltende Veränderungen keine Aussagen getroffen werden. Obwohl ebenfalls postuliert wurde, dass die Zunahme der Biodiversität einen negativen Einfluss auf das symbiotische Zusammenspiel von Mikroorganismen haben könnte (Costalonga und Herzberg, 2014), ist die Studienlage insgesamt kontrovers. Zum heutigen Zeitpunkt kann nicht bewertet werden, in welchem Maße die Veränderungen der Diversität langfristigen Einfluss auf das orale Mikrobiom und die klinische Situation haben, da in den veröffentlichten Studien sowohl signifikante Zu- bzw. Abnahmen der Diversität beobachtet wurden oder auch keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden konnten (Di Stefano et al., 2022). In den Studien mit ähnlichen Ergebnissen wie in dieser, wurde ebenfalls eine Patientengruppe mit der Kombination aus Amoxicillin und Metronidazol als Zusatz zur mechanischen Plaquereduktion therapiert und im Anschluss daran Plaqueproben analysiert. Die Antibiotikatherapie wurde jedoch in jedem Fall länger als 3 Tage (zum Beispiel 7 Tage) durchgeführt (Ehmke et al., 2005; Hagenfeld et al., 2023; López et al., 2006). Bei Betrachtung einzelner Bakterienspezies wird in dieser Studie, ähnlich wie in der Studie von Hagenfeld et al., die Zunahme des *A. actinomycetemcomitans* unter Antibiose mit Amoxicillin und Metronidazol beobachtet (vgl. Abb. 7) (Hagenfeld et al., 2023). Gründe dafür könnten die beschriebene Überlebensfähigkeit im aeroben Milieu des Bakteriums sein und die damit verbundene Aggregationsfähigkeit sich als Erstbesiedler zu reetablieren. Die häufig beobachtete Resistenz gegen Metronidazol könnte ebenfalls ein Konkurrenzvorteil sein (Könönen und Wade, 2015; Nobbs et al., 2009; Zambon, 1985). Die relative Häufigkeit der dem „roten Komplex“ zuzuordnenden Bakterien ist sowohl in der Test- als auch der Kontrollgruppe zu allen Folgezeitpunkten vergleichbar geringer ausgeprägt, was für einen vergleichbaren mikrobiologischen Therapieerfolg in der Test- und der Kontrollgruppe spricht (vgl. Abb. 6). Dennoch sollte angemerkt werden, dass die zur Probenentnahme angewendeten Papierspitzen nicht die effektivste Methode darstellt um Bakterien des gesamten Mikrobioms zu erfassen, da die Integrität des Biofilms und des anaeroben Milieus nicht gewährleistet werden kann. Trotzdem ist es eine indizierte Methode für den Nachweis parodontopathogener Keime, welche in tiefen parodontalen Taschen zu finden sind, die auch nach initialer

Parodontitistherapie schwierig zu kontrollieren sind. Daher bietet sich die in dieser Studie angewandte Methode in Kombination mit dem Poolen der Patientenproben an, um einen repräsentativen mikrobiologischen Querschnitt im Therapieverlauf darzustellen (Loomer, 2004).

Beim Vergleich der Test- und der Kontrollgruppe mithilfe des Shannon-Index und des Faith-PD-Index (Alphadiversität) wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt ($p\text{-Wert} > 0,05$) (vgl. Abb. 8 und Abb. 9). Lediglich der Pielou-Diversitätsindex (Alphadiversität) zeigt nach Therapie zu Probenentnahmezeitpunkt B (3 Monate nach Therapie) einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Test und Kontrollgruppe (Zeitpunkt B: $p\text{-Wert}$: 0,0193) (vgl. Abb. 10). Dieser Unterschied könnte als vorübergehende Veränderung der Bakterienzusammensetzung interpretiert werden (geringere Alphadiversität zu Zeitpunkt B in der Testgruppe), die durch die verschiedenen Antibiotikaeinnahmeschemata induziert werden könnten. Allerdings gleichen sich diese Veränderungen im Verlauf (6 und 12 Monate nach Therapie) wieder an, sodass sich keine weiteren signifikanten Unterschiede in den Indizes feststellen lassen. Vergleicht man die Testgruppen beider Geschlechter, zeigt der Shannonindex und der Pielou-Index (Alphadiversität) die Signifikanzgrenze überschreitende Unterschiede zu Zeitpunkt B ($p\text{-Wert}$ Shannon-Index: 0,0149, $p\text{-Wert}$ Pielou-Index: 0,0222) (vgl. Abb. 14 und Abb. 15). Männer wiesen zu diesem Zeitpunkt eine deutlich niedrigere Alphadiversität des Mikrobioms als die Frauen auf. Der Trend der geringer ausgeprägten Alphadiversität der in der Testgruppe befindlichen Männer zu Zeitpunkt B (3 Monate nach Therapie) zeigt sich beim Vergleich der Test- und Kontrollgruppe der Männer im Pielou-Diversitätsindex (Alphadiversität) ($p\text{-Wert}$: 0,0046) (vgl. Abb. 13). In der Testgruppe der Frauen waren jedoch mit 16 Probanden deutlich mehr vorhanden als in der Gruppe der männlichen Probanden (6). Dies könnte die Repräsentativität des Vergleichs relativieren, da beim Poolen von nur 6 Proben eine einzelne auffällige Probe einen größeren Einfluss auf den Pool hat als bei einer höheren Anzahl gepoolter Proben. Es konnte lediglich eine Studie gefunden werden, in der die Alphadiversität des oralen Mikrobioms bei Parodontitis-Erkrankten im Hinblick auf deren Geschlecht verglichen wurde. Bei dieser wiesen die männlichen Probanden eine deutlich höhere Alphadiversität auf als die weiblichen Probanden. Hierbei wurden allerdings betagtere (50-68 Jahre alte) Patienten mit Parodontitisstadium I untersucht (Zhao et al., 2021).

Vergleicht man die Raucher der Test- und Kontrollgruppe mit Nichtrauchern beider Therapiegruppen war zu keinem der verschiedenen Probenentnahmezeitpunkte A bis D ein statistisch signifikanter Unterschied erkennbar. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Studie bei der parodontal gesunde Raucher mit parodontal gesunden Nichtrauchern verglichen wurden (Suzuki et al., 2022). Eine weitere Studie beschreibt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Alphadiversität zwischen Rauchern und Nichtrauchern nach Parodontistherapie (Hagenfeld et al., 2023).

Eine längere Antibiotikaeinnahme erhöht das Risiko der Resistenzentwicklung der Mikrobiota sowie die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Nebenwirkungen (Buonavoglia et al., 2021; Ventola, 2015). Das verkürzte Einnahmeprotokoll könnte somit ein richtiger Schritt in Richtung der optimierten Antibiotikaaanwendung sein.

Um das Risiko der Resistenzentstehung in Zukunft besser abschätzen zu können, zielte die Studie auch darauf ab, eine molekularbiologische Methode zu etablieren, die das Potenzial zur Resistenzentwicklung anhand von Patientenproben bestimmt. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zur Resistenzentwicklung basieren überwiegend auf in-vitro durchgeführte Studien. Diese berücksichtigen aufgrund ihrer Methodik nicht die Pharmakokinetik und die Einflüsse des Wirtes und können daher nur limitierte Rückschlüsse auf die in-vivo-Situation zulassen (Stratton, 2006).

Bevor die tatsächlichen Patientenproben verwendet wurden, wurde der orale Keim *P. gingivalis* kultiviert, um den Arbeitsablauf nachzustellen. Dies spart zum einen die begrenzte Ressource der Patientenproben, reflektiert jedoch nicht vollständig die in-vivo-Bedingungen.

Um die aus den Patientenproben extrahierte, sehr geringe DNA-Menge nutzen zu können, war eine Vermehrung durch Multiple Displacement Amplification notwendig. Eine Herausforderung bei der DNA-Vermehrung ist die Template-unabhängige Amplifikation, bei der neben der gewünschten Proben-DNA auch unerwünscht DNA aus der Umgebung vermehrt wird (Wang et al., 2017). Nach der Voramplifikation wurde die Menge der DNA überprüft. Dabei wurde auch in den Negativkontrollansätzen DNA festgestellt. Um dieses Problem zu adressieren, wurden zahlreiche Versuche mit verschiedenen Reagenzien durchgeführt und ein striktes Reinigungsverfahren eingehalten. Dies führte schließlich zu einer akzeptablen DNA-Amplifikation. Durch die Reduktion der Fremd-DNA sollte die Wahrscheinlichkeit der Fehlinterpretation von Keimen bei der bioinformatischen

Auswertung verringert werden. Nach erfolgreicher Kontrolle der template-unabhängigen Amplifikation bei Tests mit Proben des *P. gingivalis*. - mittels modifizierten Hexamer-Primern und UV-Licht Reinigungsmaßnahmen - wurde die Methode erfolgreich auf eine Patientenprobe angewendet. Ein Großteil der Gesamt-DNA (> 80 %) bestand aufgrund des Verfahrens (Probenentnahme durch Papierspitzen in einer parodontalen Tasche mit Epithelzellen) aus menschlicher DNA, weshalb für die Resistomanalyse eine sehr hohe Sequenziertiefe erforderlich war. Zudem ließ die geringe Anzahl bakterieller Reads keine Gesamtgenomanalyse der erfassten Bakterien zu. Somit ist die zuverlässige Identifikation von Resistenzgenen, basierend auf den Proben und der verfügbaren Technik, nicht uneingeschränkt möglich. Dennoch gelang es eine Patientenprobe (Zeitpunkt A vor Therapie) hinsichtlich der darin enthaltenen Resistenzgene zu analysieren. Der Abgleich der enthaltenen Sequenzen mit den Resistomdatenbanken ergab Gene, die mit der Polymyxin B Resistenz von *P. gingivalis* und einer Fluoroquinolon-Resistenz von *S. oralis* in Verbindung stehen (lipid A Phosphatase *pgpB* und der Effluxpumpe *pmrA* (Coats et al., 2009; Gill et al., 1999). Ob die detektierten geringen Mengen an Resistenzgenen tatsächlich klinisch relevant sind, ist ebenso fraglich wie die Vollständigkeit der zur Detektion verwendeten Datenbanken. Für jede Probenanalyse mit dieser Methode entstanden hohe Kosten. Zudem erforderte sie mehrere Arbeitsstunden für die Probenvorbereitung und eine ebenso lange Sequenzierungszeit. Dies macht die Methode eher ungeeignet für den Einsatz zur Resistombestimmung im klinischen Alltag oder für umfangreiche Studien. Dennoch konnten wir so den Grundstein für das „Whole Genome Sequencing“ im Zusammenhang mit Resistenzgenen des subgingivalen oralen Mikrobioms legen. Uns ist zum jetzigen Zeitpunkt lediglich eine Studie bekannt, in der versucht wurde mit Speichelproben und einem ähnlichen Vorgehen das gesamte orale Mikrobiom zu bestimmen (Baker, 2022).

5. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde das orale Mikrobiom von Parodontitispatienten mit aggressiver Parodontitis (Stadium III oder IV Grad C) nach Therapie durch subgingivale Instrumentierung (SI) und einer adjuvanten Antibiotikagabe (500 mg Amoxicillin (AMX) und 500 mg Metronidazol (MET)) jeweils 3 (Testgruppe (T)) oder 7 (Kontrollgruppe (K)) Tage im Rahmen einer Sekundäranalyse untersucht. Hierbei setzt sich das Patientenkollektiv aus 50 systemisch gesunden Personen im Alter von durchschnittlich 32,7 Jahren, bestehend aus 31 Frauen und 19 Männern, von denen 11 Raucher waren, zusammen.

Dem Patientenkollektiv wurden zu den Zeitpunkten Baseline (vor der Therapie) sowie 3, 6 und 12 Monate (Probenentnahmezeitpunkte A, B, C und D) nach nicht-chirurgischer Parodontitistherapie mikrobiologische Proben entnommen. Nach der DNA-Extraktion der Proben wurde eine molekulare mikrobiologische Analyse durchgeführt, die Aufschluss über die Veränderungen des oralen Mikrobioms durch unterschiedliche Antibiotikaeinnahmeprotokolle geben sollte. Ein weiterer Fokus lag auf der Entwicklung einer Methode, die mittels Whole-Genome-Sequencing das Vorhandensein von Resistenzgenen durch Antibiotikatherapie detektieren sollte.

Die Analyse der Proben mittels 16S rRNA-Metagenom-Sequenzierung auf der Illumina Plattform zeigten ähnliche Entwicklungen der Bakterienflora bei dem Vergleich der Testgruppe (T) mit der Kontrollgruppe (K) sowohl in der Alphadiversität als auch in der Beta-diversität. Im Vergleich zu den Ausgangsproben (A) nahmen die Mikrobiota zu den Probenentnahmezeitpunkten B, C und D an Diversität zu (vgl. Abb. 5 und 6). Die relative Häufigkeit der dem „roten Komplex“ zuzuordnenden Bakterien ist sowohl in der Test- als auch der Kontrollgruppe nach Therapiebeginn (Zeitpunkte B, C, D) geringer ausgeprägt als vor der Therapie (Zeitpunkt A). Gegensätzliches ist in Bezug auf den *A. actinomycescomitans* zu beobachten. Bei der Betrachtung der anamnestischen Raucher beider Gruppen (T und K) zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (p -Wert > 0,05). Vergleicht man die Testgruppen beider Geschlechter, zeigt der Shannonindex und der Pielou-Index (Alphadiversität) die Signifikanzgrenze überschreitende Unterschiede zu Zeitpunkt B (p -Wert Shannon-Index: 0,0149, p -Wert Pielou-Index: 0,0222) (vgl. Abb. 14

und Abb. 15). Männer wiesen zu diesem Zeitpunkt eine deutlich niedrigere Alphadiversität des Mikrobioms als Frauen auf. Der Trend der geringer ausgeprägten Alphadiversität der in der Testgruppe befindlichen Männer zu Zeitpunkt B (3 Monate nach Therapie) zeigt sich beim Vergleich der Test- und Kontrollgruppe der Männer im Pielou-Diversitätsindex (Alphadiversität) (p -Wert: 0,0046) (vgl. Abb. 13).

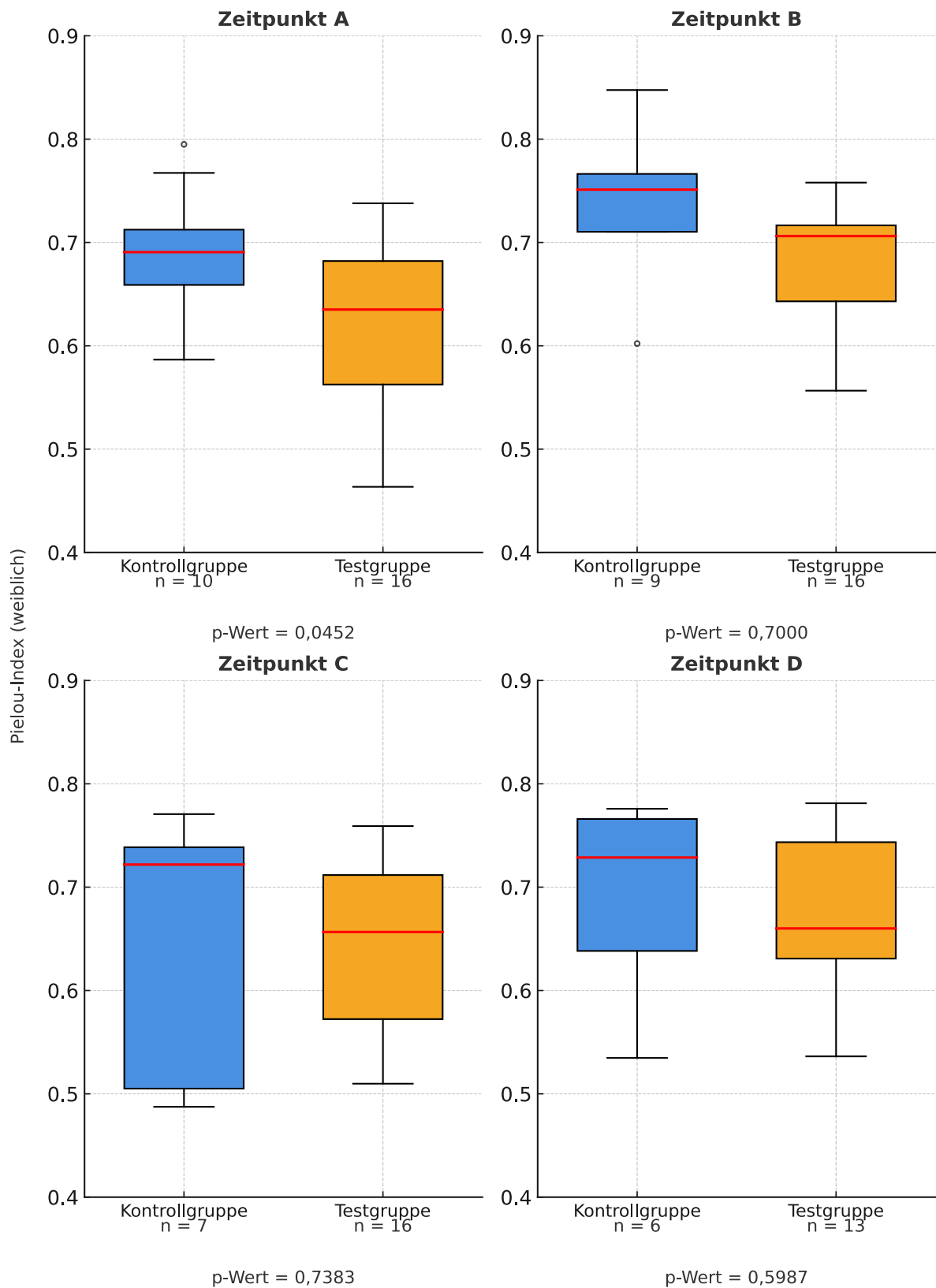
Die Ergebnisse stützen die These, dass die mikrobiellen Veränderungen beim dreitägigen Antibiotikaeinnahmeprotokoll und dem siebentägigen Protokoll sehr ähnlich sind. Dies könnte sich neben dem zeitlich verkürzten Nebenwirkungsprofil und den Kosteneinsparungen positiv auf die Eindämmung der Neubildung von Antibiotikaresistenzen auswirken. Weiterhin wurde das Ziel verfolgt, eine Methode zu etablieren, mit der antibiotikaassoziierte Resistenzgene von Patientenproben durch Sequenzierung identifiziert werden können. Die geringe bakterielle DNA-Menge in den Proben erforderte eine vorherige Multiple Displacement Amplifikation (MDA), um eine Grundlage für die Resistenzgenbestimmung zu schaffen. Der bei den ersten Versuchen hohe Anteil der nach der Amplifikation vorhandenen Kontamination durch humane DNA, begründet durch die Template-unabhängige Amplifikation, konnte durch aufwendige Reinigungsmaßnahmen und den Einsatz geeigneter Primer eingedämmt werden. Dennoch konnte nur durch eine sehr hohe Sequenzierungstiefe eine Resistomanalyse durchgeführt werden. Dies machte die Verwendung einer zeitintensiven Singleplex Sequenzierung notwendig. Schließlich gelang es eine Patientenprobe (Zeitpunkt A) hinsichtlich der darin enthaltenen Resistenzgene zu analysieren. Der Abgleich der enthaltenen Sequenzen mit den Resistomdatenbanken ergab Gene, die mit der Polymyxin B-Resistenz von *P. gingivalis* und einer Fluoroquinolon-Resistenz von *S. oralis* in Verbindung stehen (lipid A Phosphatase *pgpB* und der Effluxpumpe *pmrA*) (Coats et al., 2009; Gill et al., 1999). Ob die detektierten geringen Mengen an Resistenzgenen tatsächlich klinisch relevant sind, ist ebenso fraglich wie die Vollständigkeit der zur Detektion verwendeten Datenbanken. Aus Sicht der klinischen Routine ist anzumerken, dass aufgrund der hohen Kosten und des Zeitbedarfs für Arbeit und Sequenzierung die Methode aktuell eher ungeeignet für den Einsatz zur Resistombestimmung erscheint. Dennoch bilden die vorgelegten Daten die Grundlage für eine zukünftige kombinierte molekulare Resistombestimmung im subgingivalen oralen Mikrobiom.

6. Anhang

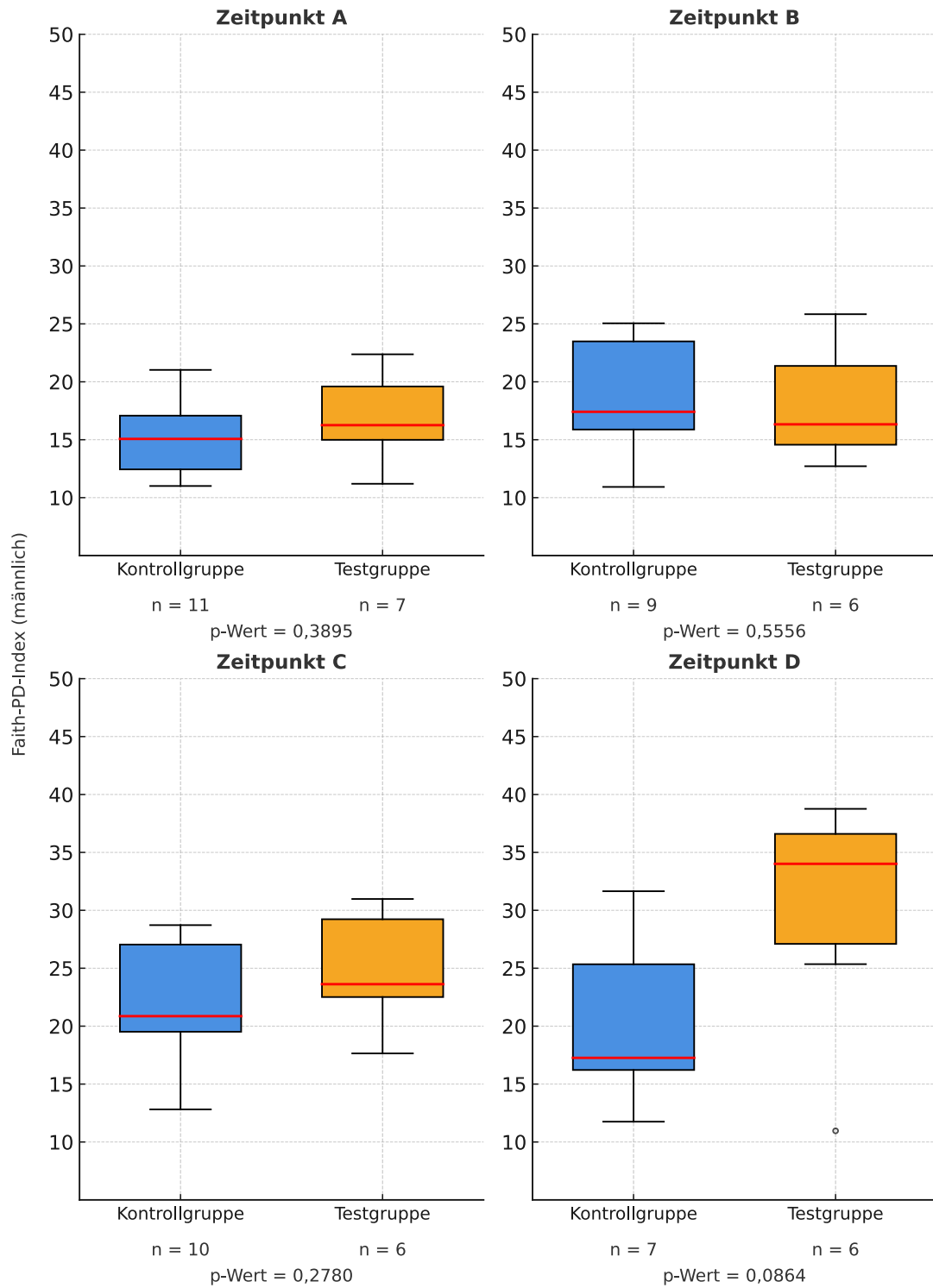
Anhang 1: Legende verwendeter Kürzel

Zeitpunkte	Habit	Gruppenzugehörigkeit
A = Baseline	S = Raucher	K = Kontrollgruppe
B = 3 Monate nach Baseline	NS = Nichtraucher	T = Testgruppe
C = 6 Monate nach Baseline		
D = 12 Monate nach Baseline		

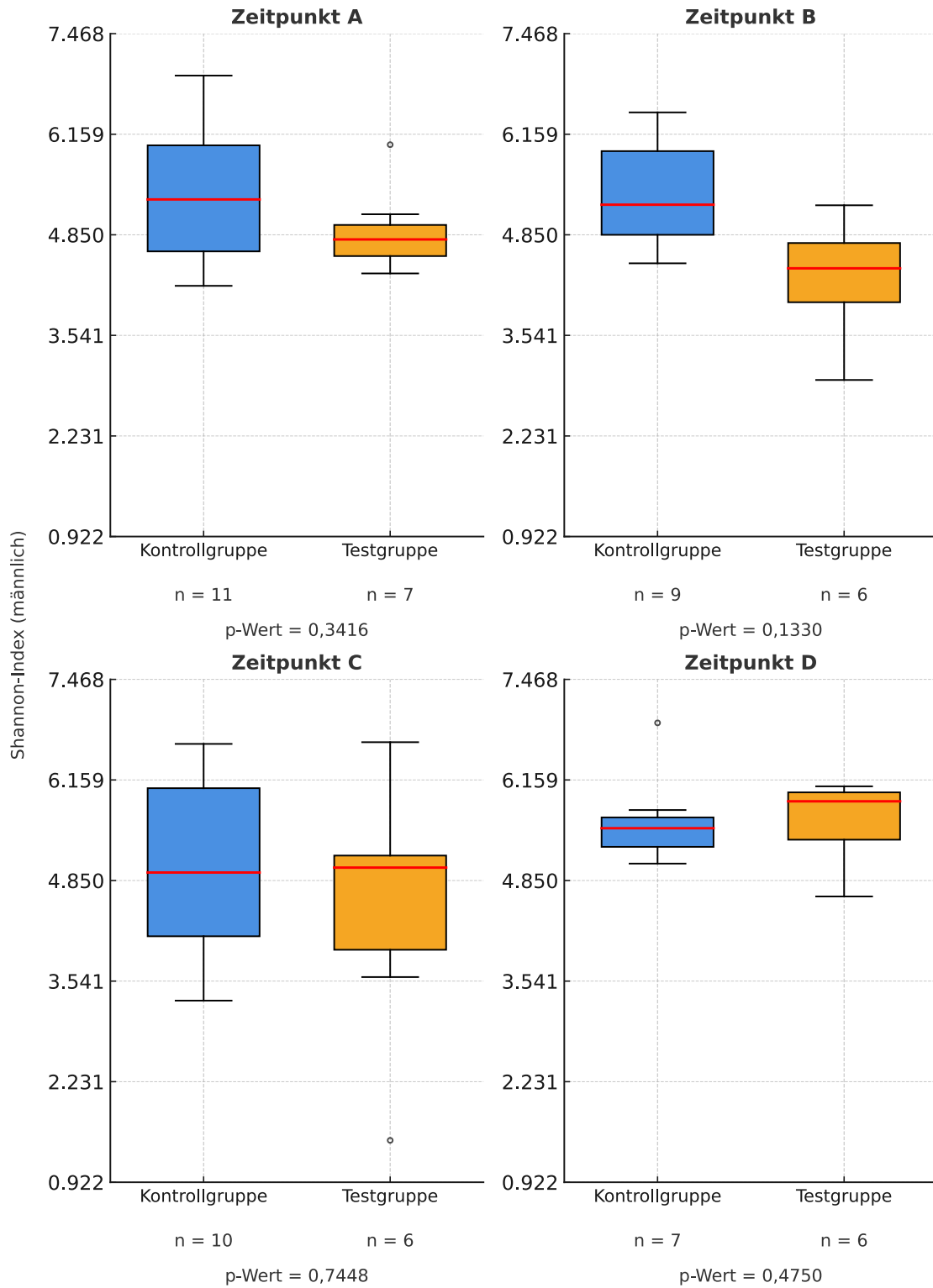
Anhang 2: Boxplots der Test- und Kontrollgruppe der Frauen des Pielou-Index



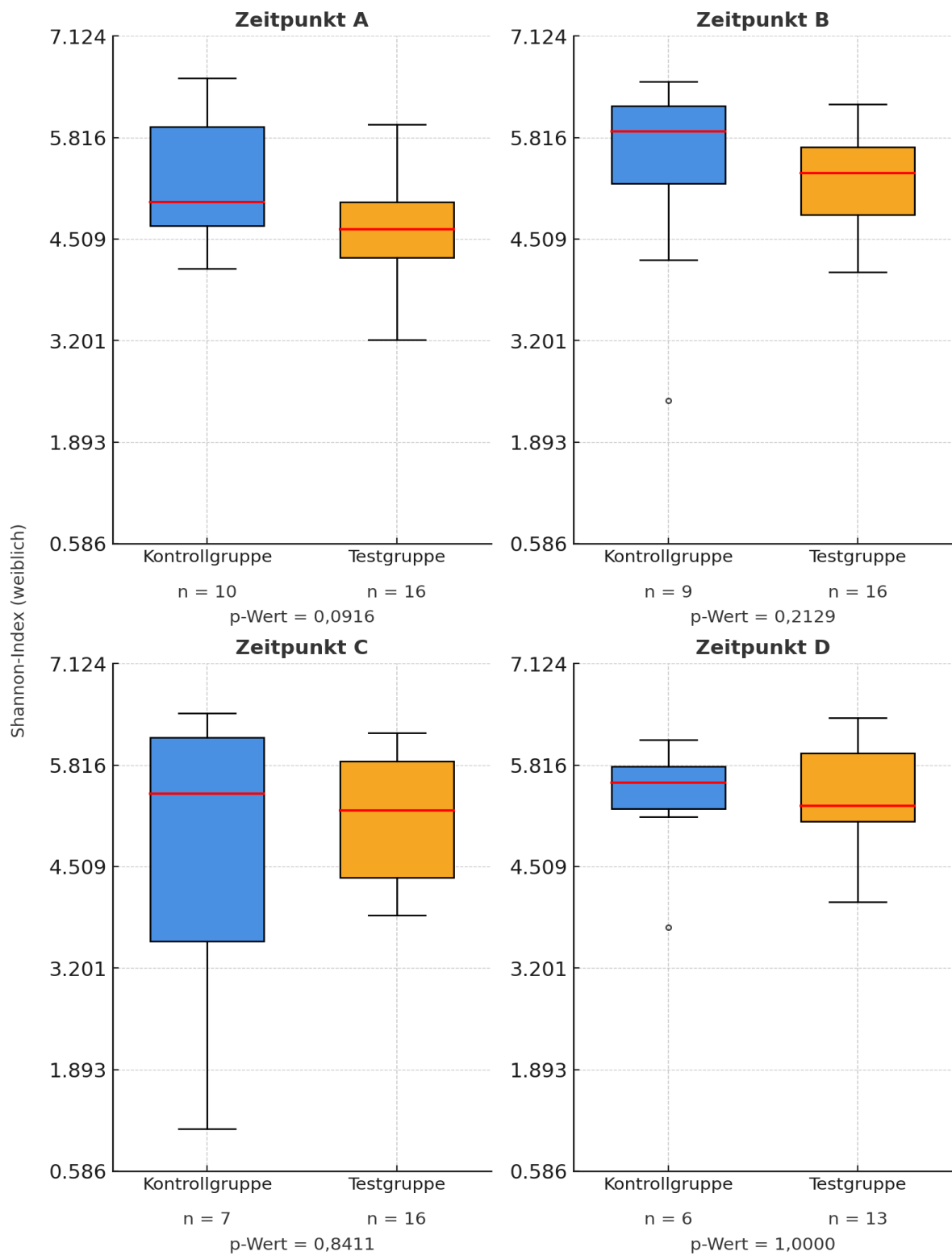
Anhang 3: Faith Pd-Index der männlichen Probanden von Test- und Kontrollgruppe zu Probenentnahmezeitpunkten A bis D



Anhang 4: Shannon-Index der männlichen Probanden von Test- und Kontrollgruppe zu Probenentnahmezeitpunkten A bis D



Anhang 5: Shannon-Index der weiblichen Probanden von Test- und Kontrollgruppe zu Probenentnahmezeitpunkten A bis D



Anhang 6: Unifrac-Analyse (Betadiversität) der Raucher zu den Probenentnahmezeitpunkten A bis D

Gruppe 1	Gruppe 2	Probenumfang	p-Wert
ASK	AST	9	0.35
BSK	BST	8	0.7
CSK	CST	9	0.768
DSK	DST	7	0.85

Anhang 7: Jaccard-Analyse zwischen den männlichen Probanden der Test und Kontrollgruppen untereinander zu den Probenentnahmezeitpunkten A bis D

Gruppe 1	Gruppe 2	Probenumfang	p-Wert
AMK	AMT	18	0.366
BMK	BMT	15	0.145
CMK	CMT	16	0.486
DMK	DMT	13	0.7

Anhang 8: Jaccard-Analyse zwischen den weiblichen Probanden der Test und Kontrollgruppen untereinander zu den Probenentnahmezeitpunkten A bis D

Gruppe 1	Gruppe 2	Probenumfang	p-Wert
AFK	AFT	26	0.504
BFK	BFT	25	0.315
CFK	CFT	23	0.739
DFK	DFT	19	0.156

7. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Staging- und Gradingssystem der Parodontitis (Inhalt aus: (Dannewitz et al., 2021)) 10
- Abb. 2:** Graphik oraler mikrobiologischer Komplexe mit ökologischer und zeitlicher Abfolge der Biofilmbildung von Frühbesiedlern (blau, violett, grün gelb), darunter auch die potentiell pathogene *Actinomyces*-Spezies, bilden die Basis, während späte Kolonisierer (orange, rot) zunehmend mit parodontaler Erkrankung assoziiert sind. Jede Farbe unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Bakterienarten, Funktionen und Relevanz für die Biofilmbildung. (Socransky und Haffajee, 2002) 15
- Abb. 3:** Schematische Darstellung des Zusammenspiels zwischen den Mikroorganismen und deren Wirt von symbiotischen zu dysbiotischen Verhältnissen (Bild aus (Dannewitz et al., 2021; Meyle und Chapple, 2015)) 16
- Abb. 4:** Syntheseprinzip der „Multiple-Displacement-Amplification“ mit der Pfeilspitze als Polymerase (Binga et al., 2008) 26
- Abb. 5:** Relative Taxa Frequenz der Mikrobiota der Test- (T) und Kontrollgruppe (K) vor subgingivaler Instrumentierung und Einnahme von AMX+MET (A) und 3 Monate (B), 6 Monate (C), 12 Monate (D) nach Therapiebeginn auf Genus Level 52
- Abb. 6:** Refraktionsdiagramm, das die gesamte Zweiglänge unter Verwendung des Faith-PD-Index zeigt zu den Probenentnahmezeitpunkten A bis D ohne statistische Signifikanz ($p\text{-Wert} > 0,05$) 53
- Abb. 7:** Säulendiagramm der relativen Häufigkeit einzelner Bakteriengattungen von den Probenentnahmezeitpunkten A bis D der Kontroll (K)- und Testgruppe (T) 54
- Abb. 8** Boxplots und p-Werte des Shannon-Diversitätsindex (Alphadiversität) der Test- (T) und Kontrollgruppe (K) zu den verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten A bis D 55

- Abb. 9** Boxplots und p -Werte des Faith-PD-Index (Alphadiversität) der Test- (T) und Kontrollgruppe (K) zu den verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten A bis D 56
- Abb. 10:** Boxplots und p -Werte des Pielou-Diversitätsindex (Alphadiversität) der Test- (T) und Kontrollgruppe (K) zu den verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten A bis D 57
- Abb. 11:** Gewichtete UniFrac-Distanzanalyse aller Probenentnahmezeitpunkte (A bis D) der Test- (T) und Kontrollgruppe (K) zur Bestimmung der Betadiversität 59
- Abb. 12:** Boxplots und p -Werte des Faith-PD-Index (Alphadiversität) der Frauen der Test- (T) und Kontrollgruppen (K) zu den verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten A bis D 60
- Abb. 13:** Boxplots und p -Werte des -Diversitätsindex (Alphadiversität) der Männer aus Test- (T) und Kontrollgruppen (K) zu den Probenentnahmezeitpunkten A bis D 61
- Abb. 14** Pielou-Index (Alphadiversität) sowie der dazugehörige p -Wert der Testgruppen (T) beider Geschlechter zu Probenentnahmezeitpunkten A bis D 62
- Abb. 15:** Shannon-Index (Alphadiversität) sowie der dazugehörige p -Wert der Testgruppen (T) beider Geschlechter zu Probenentnahmezeitpunkten A bis D 63
- Abb. 16:** Darstellung der Alphadiversität der Raucher von Kontroll- (K) und Testgruppe (T) durch den Shannon-Index, den Pielou-Diversitätsindex sowie den Faith-PD-Index (Alphadiversität) 64

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: PCR-Ansatz	30
Tab. 2: Erstes PCR-Programm des Thermocyclers	30
Tab. 3: Zweites PCR-Programm des Thermocyclers.....	33
Tab. 4: Zusammensetzung des Nährmediums für <i>P. gingivalis</i>	36
Tab. 5: Ansatz zur Denaturierung der verdünnten gDNA des <i>P. gingivalis</i>	38
Tab. 6: Ansatz zur Gesamtgenomamplifikation.....	39
Tab. 7: Ansatz zum Endonukleaseverdau.....	42
Tab. 8: DNA repair and end-prep mix	43
Tab. 9: Ansatz zur Adapterligation	43
Tab. 10: Laborgeräte und Software.....	45
Tab. 11: Verbrauchsmaterialien	46
Tab. 12: Benutzerhandbücher und Protokolle.....	49
Tab. 13: Verwendete Primer	50
Tab 14: Berechnung des Jaccard-Koeffizient (Betadiversität) zwischen Test- (T) und Kontrollgruppe (K) zu den verschiedenen Zeitpunkten (A, B, C, D)	58
Tab. 15: Relative Abundanz der verschiedenen Spezies und Anzahl der zugehörigen Reads der beispielhaften Gesamtgenom-Sequenzierung einer Baseline- Patientenprobe.....	65
Tab. 16 Resistomzuordnung zu identifizierbaren Genen	66

9. Literaturverzeichnis

Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, Gamonal J, Diaz PI. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *Isme j.* 2013; 7: 1016-1025

Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, Bradshaw CJ, Townsend G, Sołtysiak A, Alt KW, Parkhill J, Cooper A. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet.* 2013; 45: 450-455, 455e451

Ainamo J, Barmes D, Beagrie G, Cutress T, Martin J, Sardo-Infirri J. Development of the World Health Organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN). *Int Dent J.* 1982; 32: 281-291

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25: 229-235

Akhavan BJ, Khanna NR, Vijhani P. Amoxicillin. Hrsg. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC., 2021

Almeida A, Fagundes NCF, Maia LC, Lima RR. Is there an Association Between Periodontitis and Atherosclerosis in Adults? A Systematic Review. *Curr Vasc Pharmacol.* 2018; 16: 569-582

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-6

Baker JL. Using Nanopore Sequencing to Obtain Complete Bacterial Genomes from Saliva Samples. *mSystems.* 2022; 7: e0049122

Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis.* 2013; 56: 1445-1450

Bascones-Martínez A, Figuero-Ruiz E. Periodontal diseases as bacterial infection. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004; 9 Suppl: 101-107; 192-100

Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013; 98: 236-238

Belibasakis GN, Maula T, Bao K, Lindholm M, Bostanci N, Oscarsson J, Ihalin R, Johansson A. Virulence and Pathogenicity Properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens*. 2019; 8:

Binga EK, Lasken RS, Neufeld JD. Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. *Isme j*. 2008; 2: 233-241

Blanco L, Bernad A, Lázaro JM, Martín G, Garmendia C, Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*. 1989; 264: 8935-8940

Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science*. 2016; 352: 544-545

Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciulek T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Priesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, 2nd, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019; 37: 852-857

Bonnetblanc JM. [Doxycycline]. *Ann Dermatol Venereol*. 2002; 129: 874-882

Buonavoglia A, Leone P, Solimando AG, Fasano R, Malerba E, Prete M, Corrente M, Prati C, Vacca A, Racanelli V. Antibiotics or No Antibiotics, That Is the Question: An Update on Efficient and Effective Use of Antibiotics in Dental Practice. *Antibiotics*. 2021; 10: 550

Bush K, Bradford PA. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol*. 2019; 17: 295-306

Calhoun C, Wermuth HR, Hall GA. Antibiotics. Hrsg. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC., 2021

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016; 13: 581-583

Chigasaki O, Aoyama N, Sasaki Y, Takeuchi Y, Mizutani K, Ikeda Y, Gokyu M, Umeda M, Izumi Y, Iwata T, Aoki A. *Porphyromonas gingivalis*, the most influential pathogen in red-complex bacteria: A cross-sectional study on the relationship between bacterial count and clinical periodontal status in Japan. *J Periodontol*. 2021:

Clavel T, Lagkouvardos I, Hiergeist A. Microbiome sequencing: challenges and opportunities for molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016; 16: 795-805

Coats SR, To TT, Jain S, Braham PH, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* resistance to polymyxin B is determined by the lipid A 4'-phosphatase, PGN_0524. *Int J Oral Sci*. 2009; 1: 126-135

Cosgarea R, Jepsen S, Heumann C, Batori-Andronesco I, Rosu A, Bora R, Arweiler NB, Eick S, Sculean A. Clinical, microbiological, and immunological effects of 3- or 7-day systemic antibiotics adjunctive to subgingival instrumentation in patients with aggressive (Stage III/IV Grade C) periodontitis: A randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2022; 49: 1106-1120

Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett*. 2014; 162: 22-38

Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJ, Relman DA. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science*. 2012; 336: 1255-1262

Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, Kim SG, Li H, Gao Z, Mahana D, Zárate Rodríguez JG, Rogers AB, Robine N, Loke P, Blaser MJ. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*. 2014; 158: 705-721

Dannewitz B, Holtfreter B, Eickholz P. Parodontitis – Therapie einer Volkskrankheit. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2021; 64: 931-940

Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; 74: 417-433

Davies TJ, Buckley LB. Phylogenetic diversity as a window into the evolutionary and biogeographic histories of present-day richness gradients for mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011; 366: 2414-2425

de Beer D, Stoodley P, Lewandowski Z. Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnol Bioeng*. 1997; 53: 151-158

Demmer RT, Holtfreter B, Desvarieux M, Jacobs DR, Jr., Kerner W, Nauck M, Völzke H, Kocher T. The influence of type 1 and type 2 diabetes on periodontal disease progression: prospective results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Diabetes Care*. 2012; 35: 2036-2042

Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*. 2010;

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010; 192: 5002-5017

Di Stefano M, Polizzi A, Santonocito S, Romano A, Lombardi T, Isola G. Impact of Oral Microbiome in Periodontal Health and Periodontitis: A Critical Review on Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2022; 23:

Dingsdag SA, Hunter N. Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73: 265-279

Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61: 1053-1056

Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist*. 2015; 8: 49-61

Ehmke B, Moter A, Beikler T, Milian E, Flemmig TF. Adjunctive antimicrobial therapy of periodontitis: long-term effects on disease progression and oral colonization. *J Periodontol*. 2005; 76: 749-759

Estaki M, Jiang L, Bokulich NA, McDonald D, González A, Kosciolk T, Martino C, Zhu Q, Birmingham A, Vázquez-Baeza Y, Dillon MR, Bolyen E, Caporaso JG, Knight R. QIIME 2 Enables Comprehensive End-to-End Analysis of Diverse Microbiome Data and Comparative Studies with Publicly Available Data. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2020; 70: e100

Fine DH, Patil AG, Velusamy SK. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) Under the Radar: Myths and Misunderstandings of Aa and Its Role in Aggressive Periodontitis. *Front Immunol*. 2019; 10: 728

Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs*. 1997; 54: 679-708

Fujimura KE, Lynch SV. Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2015; 17: 592-602

Garcia Canas P, Khouly I, Sanz J, Loomer PM. Effectiveness of systemic antimicrobial therapy in combination with scaling and root planing in the treatment of periodontitis: a systematic review. *J Am Dent Assoc*. 2015; 146: 150-163

Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62: 1371-1414

Gill MJ, Brenwald NP, Wise R. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 187-189

Gould IM, Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence*. 2013; 4: 185-191

Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000*. 2005; 38: 9-12

Hagenfeld D, Kleine Bardenhorst S, Matern J, Prior K, Harks I, Eickholz P, Lorenz K, Kim TS, Kocher T, Meyle J, Kaner D, Schlagenhauf U, Harmsen D, Ehmke B. Long-term changes in the subgingival microbiota in patients with stage III-IV periodontitis treated by mechanical therapy and adjunctive systemic antibiotics: A secondary analysis of a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol*. 2023; 50: 1101-1112

He Z, Huang Z, Zhou W, Tang Z, Ma R, Liang J. Anti-biofilm Activities from Resveratrol against *Fusobacterium nucleatum*. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1065

Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016; 107: 1-8

Heitz-Mayfield LJ. Systemic antibiotics in periodontal therapy. *Aust Dent J*. 2009; 54 Suppl 1: S96-101

Helenius-Hietala J, Suominen AL, Ruukonen H, Knuuttila M, Puukka P, Jula A, Meurman JH, Åberg F. Periodontitis is associated with incident chronic liver disease-A population-based cohort study. *Liver Int*. 2019; 39: 583-591

Holzgrabe U. Lactivicin – ein Antibiotikum gegen Penicillin-resistente Pneumokokken. *Pharmazie in unserer Zeit*. 2007; 36: 421-422

Horn F. Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium. 8., überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag, 2021

Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med*. 2018; 50: 1-14

Jaccard P. THE DISTRIBUTION OF THE FLORA IN THE ALPINE ZONE.1. *New Phytologist*. 1912; 11: 37-50

Jakubovics NS. Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. *J Mol Biol*. 2015; 427: 3662-3675

Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005; 13: 589-595

Jepsen K, Jepsen S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontol 2000*. 2016; 71: 82-112

- Jepsen S, Deschner J, Braun A, Schwarz F, Eberhard J. Calculus removal and the prevention of its formation. *Periodontol* 2000. 2011a; 55: 167-188
- Jepsen S, Kebschull M, Deschner J. [Relationship between periodontitis and systemic diseases]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2011b; 54: 1089-1096
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology (Reading)*. 2010; 156: 3216-3223
- Jobbins J, Bagg J, Parsons K, Finlay I, Addy M, Newcombe RG. Oral carriage of yeasts, coliforms and staphylococci in patients with advanced malignant disease. *J Oral Pathol Med*. 1992; 21: 305-308
- Jolivet-Gougeon A, Bonnaure-Mallet M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discov Today Technol*. 2014; 11: 49-56
- Jordan RA, Bodechtel C, Hertrampf K, Hoffmann T, Kocher T, Nitschke I, Schiffner U, Stark H, Zimmer S, Micheelis W. The Fifth German Oral Health Study (Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V) - rationale, design, and methods. *BMC Oral Health*. 2014; 14: 161
- Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014; 93: 1045-1053
- Khaw A, Logan R, Keefe D, Bartold M. Radiation-induced oral mucositis and periodontitis - proposal for an inter-relationship. *Oral Dis*. 2014; 20: e7-18
- Khodakova AS, Smith RJ, Burgoyne L, Abarno D, Linacre A. Random whole metagenomic sequencing for forensic discrimination of soils. *PLoS One*. 2014; 9: e104996
- Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*. 2016; 221: 657-666
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: e1
- Könönen E, Wade WG. Actinomyces and related organisms in human infections. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28: 419-442
- Krinitina AA, Sizova TV, Zaika MA, Speranskaya AS, Sukhorukov AP. A Rapid and Cost-Effective Method for DNA Extraction from Archival Herbarium Specimens. *Biochemistry (Mosc)*. 2015; 80: 1478-1484
- Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 14547-14552

- Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16: 745-759
- Land KM, Johnson PJ. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. *Drug Resist Updat*. 1999; 2: 289-294
- Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol*. 1990; 17: 714-721
- Lee H, Tang H. Next-generation sequencing technologies and fragment assembly algorithms. *Methods Mol Biol*. 2012; 855: 155-174
- Leiros HK, Kozielski-Stuhrmann S, Kapp U, Terradot L, Leonard GA, McSweeney SM. Structural basis of 5-nitroimidazole antibiotic resistance: the crystal structure of NimA from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem*. 2004; 279: 55840-55849
- Leray M, Haenel Q, Bourlat SJ. Preparation of Amplicon Libraries for Metabarcoding of Marine Eukaryotes Using Illumina MiSeq: The Adapter Ligation Method. *Methods Mol Biol*. 2016; 1452: 209-218
- Lin Z, Yuan T, Zhou L, Cheng S, Qu X, Lu P, Feng Q. Impact factors of the accumulation, migration and spread of antibiotic resistance in the environment. *Environ Geochem Health*. 2021; 43: 1741-1758
- Lobmann R, Ambrosch A, Seewald M, Dietlein M, Zink K, Kullmann KH, Lehnert H. Antibiotic therapy for diabetic foot infections: comparison of cephalosporines with chinolones. *Diabetes Nutr Metab*. 2004; 17: 156-162
- Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*. 1986; 13: 431-445
- Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *The Journal of Periodontology*. 1965; 36: 177-187
- Loesche WJ. The continuing search for the cause and prevention of dental caries. *Alumni Bull Univ Mich Sch Dent*. 1973: 107-109
- Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis*. 2010; 50 Suppl 1: S16-23
- Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2004; 34: 49-56
- López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2006; 33: 648-660

Lora-Tamayo J, Mancheño-Losa M, Meléndez-Carmona M, Hernández-Jiménez P, Benito N, Murillo O. Appropriate Duration of Antimicrobial Treatment for Prosthetic Joint Infections: A Narrative Review. *Antibiotics* (Basel). 2024; 13:

Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016; 14: 265-279

MacConaill LE, Burns RT, Nag A, Coleman HA, Slevin MK, Giorda K, Light M, Lai K, Jarosz M, McNeill MS, Ducar MD, Meyerson M, Thorner AR. Unique, dual-indexed sequencing adapters with UMIs effectively eliminate index cross-talk and significantly improve sensitivity of massively parallel sequencing. *BMC Genomics*. 2018; 19: 30

Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 644-654

Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis*. 2015; 26: 27663

Maron DF, Smith TJ, Nachman KE. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global Health*. 2013; 9: 48

Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis*. 2003; 9 Suppl 1: 16-22

Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015; 69: 7-17

Moye ZD, Zeng L, Burne RA. Fueling the caries process: carbohydrate metabolism and gene regulation by *Streptococcus mutans*. *J Oral Microbiol*. 2014; 6:

Nibali L, Di Iorio A, Tu YK, Vieira AR. Host genetics role in the pathogenesis of periodontal disease and caries. *J Clin Periodontol*. 2017; 44 Suppl 18: S52-s78

Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009; 73: 407-450, Table of Contents

Nociti FH, Jr., Casati MZ, Duarte PM. Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015; 67: 187-210

O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol*. 1972; 43: 38

Ogawara H. Comparison of Antibiotic Resistance Mechanisms in Antibiotic-Producing and Pathogenic Bacteria. *Molecules*. 2019; 24:

Olejniczak-Staruch I, Ciężkańska M, Sobolewska-Sztychny D, Narbutt J, Skibińska M, Lesiak A. Alterations of the Skin and Gut Microbiome in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22:

Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34: 877-886

Olsen I, Tribble GD, Fiehn NE, Wang BY. Bacterial sex in dental plaque. *J Oral Microbiol*. 2013; 5:

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001; 183: 3770-3783

Pielou EC. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. *J Theor Biol*. 1966; 10: 370-383

Povilaitis T, Alzbutas G, Sukackaite R, Siurkus J, Skirgaila R. In vitro evolution of phi29 DNA polymerase using isothermal compartmentalized self replication technique. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2016; 29: 617-628

Pretzl B, Sälzer S, Ehmke B, Schlagenhaut U, Dannewitz B, Dommisch H, Eickholz P, Jockel-Schneider Y. Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy-a consensus report. *Clin Oral Investig*. 2019; 23: 3073-3085

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: D590-596

Rabelo CC, Feres M, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Tu YK, Chambrone L. Systemic antibiotics in the treatment of aggressive periodontitis. A systematic review and a Bayesian Network meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2015; 42: 647-657

Reysset G. Genetics of 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* species. *Anaerobe*. 1996; 2: 59-69

Roberts AP, Mullany P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010; 8: 1441-1450

Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol*. 2014; 4: 92

Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24: 355-360

Rykalina VN, Shadrin AA, Amstislavskiy VS, Rogaev EI, Lehrach H, Borodina TA. Exome sequencing from nanogram amounts of starting DNA: comparing three approaches. *PLoS One*. 2014; 9: e101154

Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Beglundh T, Sculean A, Tonetti MS. Treatment of stage I-III periodontitis-The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*. 2020a; 47 Suppl 22: 4-60

Sanz M, Marco Del Castillo A, Jepsen S, Gonzalez-Juanatey JR, D'Aiuto F, Bouchard P, Chapple I, Dietrich T, Gotsman I, Graziani F, Herrera D, Loos B, Madianos P, Michel JB, Perel P, Pieske B, Shapira L, Shechter M, Tonetti M, Vlachopoulos C, Wimmer G. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol*. 2020b; 47: 268-288

Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22: 333-339

Shahi SK, Zarei K, Guseva NV, Mangalam AK. Microbiota Analysis Using Two-step PCR and Next-generation 16S rRNA Gene Sequencing. *J Vis Exp*. 2019:

Shannon CE. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*. 1948; 27: 379-423

Shen J, Chen H, Zhou X, Huang Q, Garay LG, Zhao M, Qian S, Zong G, Yan Y, Wang X, Wang B, Tonetti M, Zheng Y, Yuan C. Oral microbiome diversity and diet quality in relation to mortality. *J Clin Periodontol*. 2024:

Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018; 122: e59

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002; 28: 12-55

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998; 25: 134-144

Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiology and Immunology*. 1988; 3: 1-7

Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 260-268

Spížek J, Řezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochem Pharmacol*. 2017; 133: 20-28

Stratton CW. In vitro susceptibility testing versus in vivo effectiveness. *Med Clin North Am*. 2006; 90: 1077-1088

Suzuki N, Nakano Y, Yoneda M, Hirofuji T, Hanioka T. The effects of cigarette smoking on the salivary and tongue microbiome. *Clin Exp Dent Res*. 2022; 8: 449-456

Sweet FA, Forsthoefel CW, Sweet AR, Dahlberg RK. Local Versus Systemic Antibiotics for Surgical Infection Prophylaxis in a Rat Model. *J Bone Joint Surg Am*. 2018; 100: e120

- Tan KS, Song KP, Ong G. *Bacteroides forsythus* prfH genotype in periodontitis patients: occurrence and association with periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2001; 36: 398-403
- Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol.* 1979; 6: 278-307
- Teughels W, Feres M, Oud V, Martín C, Matesanz P, Herrera D. Adjunctive effect of systemic antimicrobials in periodontitis therapy: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2020; 47 Suppl 22: 257-281
- Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1986; 13: 905-911
- Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Løe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res.* 1966; 1: 1-13
- Tonetti MS, Eickholz P, Loos BG, Papapanou P, van der Velden U, Armitage G, Bouchard P, Deinzer R, Dietrich T, Hughes F, Kocher T, Lang NP, Lopez R, Needleman I, Newton T, Nibali L, Pretzl B, Ramseier C, Sanz-Sanchez I, Schlegelhauf U, Suvan JE. Principles in prevention of periodontal diseases: Consensus report of group 1 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2015; 42 Suppl 16: S5-11
- Tonetti MS, Sanz M. Implementation of the new classification of periodontal diseases: Decision-making algorithms for clinical practice and education. *J Clin Periodontol.* 2019; 46: 398-405
- Vangay P, Ward T, Gerber JS, Knights D. Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. *Cell Host Microbe.* 2015; 17: 553-564
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P t.* 2015; 40: 277-283
- Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiol Spectr.* 2019; 7:
- Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69: 137-143
- Wang W, Ren Y, Lu Y, Xu Y, Crosby SD, Di Bisceglie AM, Fan X. Template-dependent multiple displacement amplification for profiling human circulating RNA. *Biotechniques.* 2017; 63: 21-27
- Williamson KS, Richards LA, Perez-Osorio AC, Pitts B, McInerney K, Stewart PS, Franklin MJ. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *J Bacteriol.* 2012; 194: 2062-2073

Wong RG, Wu JR, Gloor GB. Expanding the UniFrac Toolbox. *PLoS One*. 2016; 11: e0161196

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000; 27: 648-657

Yang Z, He F, Huang H, Xu J, Ruan Y, Cui K, Zhou H, Chen Y, Liu D, Xiao Z, Chen F, Liao Y, Bin J, Chen Y. Association of Oral Microbiome Diversity and All-Cause Mortality in the General US Population and in Individuals With Chronic Diseases: A Prospective Cohort Study. *J Clin Periodontol*. 2024:

Yao ES, Lamont RJ, Leu SP, Weinberg A. Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. *Oral Microbiol Immunol*. 1996; 11: 35-41

Yue Y, Hu YJ. Extension of PERMANOVA to Testing the Mediation Effect of the Microbiome. *Genes (Basel)*. 2022; 13:

Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1985; 12: 1-20

Zandbergen D, Slot DE, Niederman R, Van der Weijden FA. The concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole compared to scaling and root planing alone in treating periodontitis: =a systematic review=. *BMC Oral Health*. 2016; 16: 27

Zhao J, Zhou YH, Zhao YQ, Feng Y, Yan F, Gao ZR, Ye Q, Chen Y, Liu Q, Tan L, Zhang SH, Hu J, Dusenge MA, Feng YZ, Guo Y. Gender Variations in the Oral Microbiomes of Elderly Patients with Initial Periodontitis. *J Immunol Res*. 2021; 2021: 7403042

Zhu Q, Hu Q, Shepherd L, Wang J, Wei L, Morrison CD, Conroy JM, Glenn ST, Davis W, Kwan ML, Ergas IJ, Roh JM, Kushi LH, Ambrosone CB, Liu S, Yao S. The impact of DNA input amount and DNA source on the performance of whole-exome sequencing in cancer epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015; 24: 1207-1213

10. Erklärung zum Eigenanteil

Die Dissertation wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie und der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde unter Betreuung von Prof. Dr. Isabelle Béatrice Bekeredjian-Ding sowie Prof. Dr. Raluca Cosgarea erarbeitet. Den praktischen Teil der Arbeit habe ich am Paul-Ehrlich-Institut durchgeführt. Die Studie stellt eine Sekundäranalyse dar (Cosgarea et al., 2022). Die Genehmigung der Hauptanalyse fand durch die Ethikkommission der Fakultät für Medizin und Pharmazie von Cluj-Napoca statt (Antrag #398/02.07.2015, Amendment #346/16.11.2020). Mit der Arbeit an den DNA-Isolaten setzte der praktische Teil meiner wissenschaftlichen Untersuchung ein. Sämtliche Arbeitsschritte bis zur Sequenzierung wurden (nach Einarbeitung durch Dr. Birgit Blissenbach (Paul-Ehrlich-Institut)) von mir eigenständig durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung fand durch Dr. Oleg Krut (Paul-Ehrlich-Institut) statt. Die Ergebnisse wurden von mir in Zusammenarbeit mit Dr. Oleg Krut interpretiert und mit Prof. Dr. Cosgarea sowie Prof. Dr. Isabelle Béatrice Bekeredjian-Ding diskutiert. Zur sprachlichen und optischen Optimierung einzelner Abschnitte wurde in begrenztem Umfang die Basisversion von ChatGPT eingesetzt. Die entsprechenden Passagen wurden anschließend sorgfältig überprüft und überarbeitet. Ich übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift. Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.