

Aus der Klinik für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Isolierung von Oberflächenproteinen des Bakterienstammes
Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans
(DSM 11123)
und Adhäsion an Kohlenhydrate

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von

Herrn Kamal Louh
Geburtsort: Bait Lahia

Datum der Promotion: 03.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abstract (deutsch)	VII
Abstract (englisch)	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Klassifizierung von parodontalen und gingivalen Erkrankungen	1
1.2 Ätiologie entzündlicher Parodontalerkrankungen	2
1.3 Plaque (oraler Biofilm)	3
1.4 Parodontitis	5
1.5 Aggregatibacter (Actinobacillus) <i>actinomycetemcomitans</i>	9
1.5.1 Eigenschaften	10
1.5.2 Adhäsion	12
1.5.3 Oberflächenproteine (engl.: <i>outer membrane proteins, OMP</i>)	12
1.6 Lektine	13
1.7 Glykoproteine	16
1.7.1 Glykoproteine des Speichels	18
1.7.2 Muzine	19
1.7.3 Anti-adhäsive Wirkung löslicher Kohlenhydrate	20
2. Fragestellung	21
3. Material und Methodik	22
3.1 Materialien	22
3.2 Methoden	26
3.2.1 Studienablauf	26
3.2.2 Anzucht von <i>A. actinomycetemcomitans</i>	28
3.2.3 Gewinnung der biotinylierten <i>A. actinomycetemcomitans</i> Lektine	30
3.2.4 Biotinylierung	32
3.2.5 Gewinnung und Fraktionierung der Oligosaccharid-Fractionen	33
3.2.6 Lektinbindungs-Inhibitionstest	36
3.2.7 Quantitative Proteinanalyse	40
3.2.8 Qualitative Proteinanalyse	42
4. Ergebnisse	45
4.1 Anzucht von <i>A. actinomycetemcomitans</i>	45

4.2 Auswahl der <i>A. actinomycetemcomitans</i> Lektin-Präparation für den Lektinbindungs-Inhibitionstest.....	45
4.2.1 Lektinbindung vom Rohextrakt zum Muzin	45
4.2.2 Lektinbindungs-Inhibitionstest der Isolate während bzw. nach der Affinitätschromatografie	47
4.3 Bindung des Rohextraktes aus <i>A. actinomycetemcomitans</i> an die Oligosaccharid-Fractionen	47
4.4 Quantitative Proteinanalyse der Zellpräparationen aus <i>A. actinomycetemcomitans</i>	50
4.5 Qualitative Proteinanalyse der Zellpräparationen aus <i>A. actinomycetemcomitans</i>	51
5. Diskussion	54
5.1 Parodontalbehandlung.....	54
5.2 Antimikrobielle Therapie	55
5.3 Medizinische Bedeutung der Arbeit	56
5.4 Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Serotyp b).....	57
5.4.1 Kultur von <i>A. actinomycetemcomitans</i>	58
5.4.2 Reinheitskontrolle	59
5.5 Biotinylierung	59
5.5.1 Biotinylierung vor der Lyse	59
5.5.2 Biotinylierung nach der Lyse.....	59
5.6 Lektinbindungs-Inhibitionstest.....	60
5.7 Quantitative Proteinanalyse	61
5.8 Qualitative Proteinanalyse	61
6. Schlussfolgerung	63
6.1 Perspektiven	63
7. Literaturverzeichnis	65
8. Eidesstattliche Versicherung	81
9. Lebenslauf	83
10. Danksagung.....	84

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ätiologische Faktoren der Parodontitis (König 1987)	2
Abb. 2: Panorama-Röntgenaufnahme eines 19-jährigen Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis. Auf der linken Seite ist der Knochenabbau bei den ersten Schneidezähnen und den ersten Molaren (1,6-er Typ) zu erkennen.	7
Abb. 3: Aggregatibacter actinomycetemcomitans: Sternförmige Struktur nach 4 Tagen auf Agarplatte	9
Abb. 4: Virulenzfaktoren von <i>A. actinomycetemcomitans</i>	11
Abb. 5: Unter Elektronenmikroskop zeigt das Bild A <i>A. actinomycetemcomitans</i> mit Fimbrien (schwarze Pfeile) und das Bild B ohne Fimbrien (mit extrazelluläres Matrixprotein-Adhäsion A (EmaA) (weisse Pfeile).....	12
Abb. 6: Agglutinierendes Lektin.....	14
Abb. 7: Strukturbeispiele für Oligosaccharide	17
Abb. 8: Verknüpfungsmöglichkeiten für Oligosaccharide	18
Abb. 9: Müller-Esterl W. (2018) Posttranslationale Prozessierung und Sortierung von Proteinen.....	20
Abb. 10: verdeutlicht die Arbeitsschritte der vorliegenden Arbeit.	26
Abb. 11: zeigt das Vorgehen bei dieser Arbeit am Beispiel von <i>E. coli</i> Bakterium	27
Abb. 12: Kolonien von <i>A. actinomycetemcomitans</i> auf einer Columbia-Blut-Agar-Platte.....	29
Abb. 13: Schematischer Versuchsablauf des Lektinbindungs-Inhibitionstests.....	36
Abb. 14: Komplexbildung und Reduktion von Kupferionen bei der Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bichonin-(BCA)-Reagenz.	41
Abb. 15: Affinität des Lektins zum ungewaschenen Muzin	46
Abb. 16: Vergleich der Affinitäten vom Lektin zum Muzin bei Zugabe von Tris-Probenpuffer (TPP, blau) und gewaschenem Muzin (rosa)	46
Abb. 17: Bindungsaffinität des während (links) bzw. nach (rechts) der Affinitätschromatografie biotinylierten Isolats.....	47
Abb. 18: Affinität der 200 Oligosaccharid-Fractionen in % zu den biotinylierten Lektinen aus dem Rohextrakt von <i>A. actinomycetemcomitans</i>	48
Abb. 19: Standardkurve zur Ermittlung der Proteinkonzentration in den biotinylierten Isolaten aus <i>A. actinomycetemcomitans</i> mittels Bichonin-(BCA)-Test.....	51
Abb. 20: Proteinspektrum der Präparationen aus <i>A. actinomycetemcomitans</i> nach Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Silberfärbung	52
Abb. 21: Laufstrecke der Proteine (mm) in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Gelelektrophorese in Relation zu ihrem Molekulargewicht (kDa)	53

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Schematische Darstellung der Aufteilung einer Mikrotiter-Platte beim Lektinbindungs-Inhibitionstest.....	38
Tab. 2: Verdünnungsschema für die Standardreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bichonin-(BCA)-Reagenz	41
Tab. 3: Verdünnungsreihe und Pipettierschema für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben.....	42
Tab. 4: Auftragungsschema des Acrylamidgels	44
Tab. 5: Übersicht Bindungsaffinität	49
Tab. 6: Molekulare Masse (kDa) und Laufstrecke (mm) der Proteine.....	53
Tab. 7: Nebenwirkungen von drei Antibiotikaklassen.....	56

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter (Actinobacillus)</i> <i>actinomycetemcomitans</i>
BCA	Bichoninsäure
dest.	destilliert
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IgA, IgG	Immunglobulin A, Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
LAP	Lokalisierte aggressive Parodontitis
L-Fuc	Fucose
Min.	Minuten
Man	Mannose
NANA	Sialinsäure (engl.: <i>N-acetylneuraminic acid</i>)
OMP	Oberflächenproteine (engl.: <i>outer membrane proteins</i>)
PBS	Phosphatpuffer (engl.: <i>phosphate-buffered saline</i>)
PTS	Region im Muzin-Grundgerüst
s.	siehe
sec.	Sekunden
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TPP	Tris-Probenpuffer
TWP	Tris-Waschpuffer
U/min	Umdrehungen pro Minute

Abstract (deutsch)

Einleitung: Der Keim *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) verursacht nicht nur orale, sondern auch extraorale Erkrankungen. Auch bei der Ätiologie der lokalisierten aggressiven Parodontitis (LAP) spielt er eine zentrale Rolle. Von seinen sieben Serotypen (a–g) kommt der Serotyp b bei LAP am häufigsten vor. Mikrobiellen Adhäsine (Lektine) sind in der Lage, an Glykane sowohl im Speichel als auch an der Oberfläche von Epithelzellen zu binden. Diese Interaktion ist an der Adhäsion und Invasion der Bakterien beteiligt. Der Adhäsionsprozess hängt von der Bindung der Lektine an spezifischen Kohlenhydrat-Strukturen ab. Sind diese Kohlenhydrat-Strukturen in ausreichender Menge im Speichel vorhanden, können sie eine Bindung von *A. actinomycetemcomitans* an die Mundhöhlenschleimhaut kompetitiv hemmen. Dieser Mechanismus lässt sich potenziell durch die Gabe Lektin-spezifischer Oligosaccharide im Rahmen der Prävention und Therapie der LAP nutzen.

Ziel: In der vorliegenden Arbeit sollten daher Oligosaccharide mit einer hohen Affinität zu den Lektinen von *A. actinomycetemcomitans* identifiziert werden.

Arbeit und Methode: Dazu wurden die Lektine von *A. actinomycetemcomitans* über eine Muzin-Affinitätschromatografie extrahiert. Weiter wurden 200 Oligosaccharid-Faktionen des Glykokonjugats II (Molke) mittels high performance liquid chromatography (HPLC) hergestellt. Diese wurden mittels Lektinbindungs-Inhibitionstest auf ihre Affinität zu den Lektinen von *A. actinomycetemcomitans* untersucht.

Ergebnis: Auf diese Weise konnte eine Oligosaccharid-Fraktion, mit einer hohen Affinität zu den Lektinen von *A. actinomycetemcomitans* identifiziert werden.

Perspektive: Diese Fraktion sollte in biochemischen Studien weiter analysiert und charakterisiert werden. Möglicherweise eignen sich die Kohlenhydrate der Oligosaccharid-Fraktion als kompetitive Inhibitoren der Interaktion zwischen den Lektinen von *A. actinomycetemcomitans* und den Kohlenhydrat-Strukturen auf der Oberfläche der oralen Schleimhaut und damit als alternative Präventions- und Therapieoption bei Patienten mit LAP.

Abstract (englisch)

Introduction: *Aggregatibacter* (Actinobacillus) *actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) causes not only oral but also extraoral diseases. It also plays a central role in the etiology of localized aggressive periodontitis (LAP). Of its seven serotypes (a – g), serotype b is the most common in LAP. Microbial adhesins (lectins) are able to bind to glycans both in saliva and on the surface of epithelial cells. This interaction is involved in the adhesion and invasion of bacteria. The adhesion process depends on the binding of the lectins to specific carbohydrate structures. If these carbohydrate structures are present in sufficient quantities in the saliva, they can competitively inhibit binding of *A. actinomycetemcomitans* to the oral cavity mucosa. This mechanism can potentially be used through the administration of lectin-specific oligosaccharides as part of the prevention and therapy of LAP.

Aim: In the present study, oligosaccharides with a high affinity for the lectins of *A. actinomycetemcomitans* should be identified.

Method: For this purpose, the lectins of *A. actinomycetemcomitans* were extracted via mucin affinity chromatography. In addition, 200 oligosaccharide fractions of glycoconjugate II (whey) were produced using high performance liquid chromatography (HPLC). These were examined for their affinity to the lectins of *A. actinomycetemcomitans* by means of a lectin binding inhibition test (a competitive enzyme-linked lectin-binding assay).

Result: In this way an oligosaccharide fraction with a high affinity to the lectins of *A. actinomycetemcomitans* could be identified.

Perspective: This fraction should be further analyzed and characterized in biochemical studies. Possibly the carbohydrates of the oligosaccharide fraction are suitable as competitive inhibitors of the interaction between the lectins of *A. actinomycetemcomitans* and the carbohydrate structures on the surface of the oral mucous membrane and thus as an alternative prevention and therapy option for patients with LAP.

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit wurde als interdisziplinäres Forschungsprojekt der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin des Zentrums für Zahnmedizin und dem Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Humboldt-Universität zu Berlin, durchgeführt. Das Ziel des Projektes war die Aufklärung verschiedener Aspekte der Ätiologie und Therapie der lokalen aggressiven Parodontitis (LAP).

1.1 Klassifizierung von parodontalen und gingivalen Erkrankungen

1999 schlug der „*International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*“ in Oak Brook (USA) eine neue Klassifikation von Parodontalerkrankungen vor (Armitage 1999). Diese Nomenklatur der *American Academy of Periodontology* (AAP) ersetzte die Nomenklatur der marginalen Parodontopathien, die von der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie e. V. (1987) erarbeitet wurde. Nach der seit 1999 verwendeten Einteilung wurde die Parodontitis als chronisch und aggressiv, d. h. lokalisiert und nekrotisierend, oder als Manifestation einer systemischen Erkrankung generalisiert klassifiziert. Erkenntnisse epidemiologischer und prospektiver Studien sowie aus der Grundlagenforschung führten 2017 zur Entwicklung eines neuen Klassifikationsrahmens.

2017 definierte ein Workshop drei Formen der Parodontitis nach pathophysiologischen Kriterien. Dazu gehörten die nekrotisierende Parodontitis und eine Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen. Die „chronischen“ oder „aggressiven“ Erkrankungsformen wurden in der Kategorie „Parodontitis“ zusammengefasst. Der überarbeitete Klassifikationsrahmen für Parodontitis beinhaltet zudem ein multidimensionales an neue Erkenntnisse anpassbares „*Staging*“- und „*Grading*“-System.

Das mittels *Staging* bestimmte Stadium der Erkrankung hängt vom diagnostizierten Schweregrad sowie von der Komplexität des Therapiemanagements ab. Die Beurteilung des Grades der Erkrankung (*Grading*) liefert zusätzliche Informationen über biologische Merkmale. Dazu gehören die auf der Anamnese basierende Beurteilung der Progressionsrate, die Einschätzung des Risikos für eine weitere Progression, mögliche ungünstige Behandlungsergebnisse sowie die Abschätzung des Risikos einer negativen

Beeinflussung des allgemeinen Gesundheitszustands des Patienten durch die Krankheit oder ihre Behandlung (Caton *et al.* 2018, Tonetti *et al.* 2018).

1.2 Ätiologie entzündlicher Parodontalerkrankungen

Bei der Ätiologie parodontaler Erkrankungen müssen wie bei der Kariesentstehung Mikroorganismen, Wirt, Substrat und genügend Zeit vorhanden sein (s. Abbildung 1).

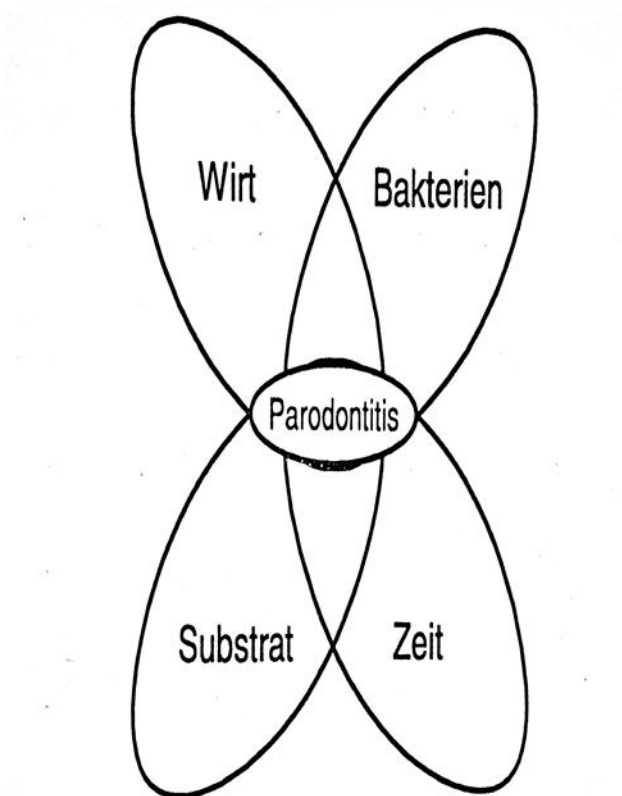


Abb. 1: Ätiologische Faktoren der Parodontitis (König 1987)

Parodontopathien sind somit multifaktoriell bedingte, entzündliche Erkrankungen des Zahnhalteapparates, die 10-15% der Weltbevölkerung befallen (Emani S. *et al.* 2014) und zum Verlust des Zahnes führen können (Hirschfeld und Wasserman 1978, McFall 1982, Tonetti *et al.* 2018). Komplexe Interaktionen verschiedener Parameter sind kausal und modulierend an der Pathogenese beteiligt (Preshaw PM 2015). Dabei spielen insbesondere Bakterien, aber auch die Immunabwehr und exogene Faktoren (z. B. Umwelt, Verhalten) eine bedeutende Rolle. Zu den an der Entstehung einer Parodontitis beteiligten Wirtsfaktoren zählen genetisch bedingte (Laine *et al.* 2014) oder erworbene

Immundefekte, Stress (Acquier *et al.* 2017, Green *et al.* 1986, Deinzer *et al.* 1999) und Rauchen (Costa *et al.* 2013, Dietrich *et al.* 2015, Haber *et al.* 1993).

Als Infektionserkrankungen werden Parodontopathien primär durch Mikroorganismen verursacht. Laut der unspezifischen Plaquehypothese ist die quantitative Plaquemenge für die Pathogenität verantwortlich (Theilade 1986, Loe *et al.* 1965). Die spezifische Plaquehypothese macht dagegen bestimmte bestimmte Bakterien für die Entwicklung einer Parodontopathie verantwortlich (Loesche 1976, Tanner 1988). Nach der ökologischen Plaquehypothese führt ein Ungleichgewicht in der Mikroflora aufgrund verschiedener Faktoren (z. B. pH-Wert, Ernährung, Redoxpotenzial) zu parodontalen bakteriellen Infektionen (Marsh 2006).

Die orale Mikroflora umfasst mehr als 700 verschiedene Arten; gentechnische Studien gehen von bis zu 1000 Arten aus (Socransky und Haffajee 1994, Aas *et al.* 2005). Trotz der Dominanz bakterieller Erreger sind auch Sprosspilze der Gattung *Candida* (Rams und Slots 1991) und Protozoen wie *Entamoeba gingivalis* und *Trichomonas tenax* (Süleyman Y. *et al.* 2016, Nisengard *et al.* 1988) an der Entstehung entzündlicher Parodontalerkrankungen beteiligt.

Alle Parodontopathien führen mit Ausnahme der Gingivitis zum Abbau des Alveolarknochens und der desmodontalen Fasern (Tonetti *et al.* 2018). Die Gingivitis entsteht am ehesten dadurch, dass die unspezifische Bakterienmasse in der Plaque die Toleranzschwelle des Wirts übersteigt (Loe *et al.* 1965). Dagegen wird die Entstehung und der Verlauf anderer Parodontiden mit spezifischen Parodontalkeimen in Verbindung gebracht (Tanner 1988). Dazu zählen *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans)*, *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* und *Parvimonas micra* (Coutinho D. *et al.* 2018). Laut verschiedener Arbeiten ist die LAP eine mit *A. actinomycetemcomitans* assoziierte Parodontitis, die sich nach Keimelimination in der Regel nicht weiterentwickelt (Mandell *et al.* 1986, Yang *et al.* 2004). Ohne Therapie schreitet der Entzündungsprozess fort, und führt zur Zahnlockerung mit anschließendem Zahnverlust (Socransky and Haffajee 1992).

1.3 Plaque (oraler Biofilm)

Die Plaque ist ein festhaftender, histologisch strukturierter Belag aus lebenden und toten Mikroorganismen in einer Polysaccharid-Glykoprotein-reichen Matrix (Riethe 1988).

Loe *et al.* (1965) wiesen den Zusammenhang zwischen der Akkumulation der bakteriellen Plaque und der Entwicklung entzündlicher Parodontalerkrankungen (Gingivitis) nach. In ihrem klassischen Experiment putzten zwölf Probanden mit perfekter Mundhygiene sich drei Wochen lang nicht die Zähne. Bereits drei Tage nach Beendigung der Mundhygiene traten erste Entzündungszeichen in der Gingiva auf, die im Verlauf des Experiments zunahmen. Die Gingiva war gerötet, blutete bei Stimulation und war aufgeschwollen. Durch professionelle Entfernung der Plaque und anschließender Wiederaufnahme der gewohnten Mundhygiene ging die Entzündung innerhalb von neun Tagen vollständig zurück. Die Gingiva erreichte wieder den Ausgangszustand vor Experimentbeginn.

Die Plaquebildung beginnt mit der Ausbildung eines dünnen ($< 1 \mu\text{m}$) Biofilms (Pellicel, *Pellicula dentis*) durch die Adsorption von Speichelproteinen auf den Oberflächen der Mundhöhle (Meckel 1968). Die Pellicel bildet sich schon kurz nach der Reinigung der Zahnoberfläche (Dawes C. *et al.* 1963). Die Moleküladsorption erreicht nach ca. 90–120 min. ihr Maximum. Die bakteriellen Stoffwechselaktivitäten modifizieren die Zusammensetzung und Struktur der Pellicelschicht (Marsh and Bradshaw 1995). Die Mikroorganismen sind im Biofilm von einer Polysaccharid-Matrix und weiteren organischen und anorganischen Materialien umgeben (Xie *et al.* 2000). Die Pellicel enthält wirtsspezifische Moleküle (z. B. saure Prolinreiche Proteine, Glykoproteine, Serumproteine, Enzyme, Statherin, Histatine, Cystatine, Immunglobuline), aber auch bakterielle Glykosyltransferasen und Glukane (Marsh und Bradshaw 1995). Zu den Funktionen dieser Moleküle zählen die Modulation bakterieller Adhäsionsprozesse und die Ausbildung einer Matrix im extrazellulären Umfeld der Bakterien (Scheie 1994). Aufgrund der Eigenladung der Speichelproteine erfolgt eine elektrostatische Bindung an die Kalzium- und Phosphatgruppen des Apatits der Zahnhartsubstanz (Hannig *et al.* 2009).

Die Pellicelschicht ist für die initiale Adhäsion und Ansiedlung von Bakterien (z. B. Streptokokken, Aktinomycceten) auf den Zahnoberflächen von großer Relevanz (Marsh and Bradshaw 1995). Darüber hinaus ist sie maßgeblich an der De- und Remineralisation des Zahnschmelzes beteiligt. Dabei sind insbesondere Prolinreiche Proteine, Histatine und α -Amylase von Bedeutung (Rosan and Lamont 2000). Bei der Ausbildung der dentalen Plaque werden verschiedene Phasen durchlaufen:

- **Phase 1:** initiale (reversible und irreversible) Adhäsion von Mikroorganismen an Materialoberflächen (Busscher and van der Mei 1997, Quirynen and Bollen 1995)

- **Phase 2:** Wachstum des Biofilms durch Mechanismen der (Co)-Adhäsion und Koaggregation sowie Matrix-Produktion (Kolenbrander 2000, Marsh and Bradshaw 1995)
- **Phase 3:** Einleitung stoffwechselspezifischer Reaktionen der interbakteriellen Kommunikation und Genexpression (Frias *et al.* 2001, Kolenbrander 2000, Rosan and Lamont 2000, Simmonds *et al.* 2000, Xie *et al.* 2000)
- **Phase 4:** Ausbildung eines stationären Gleichgewichts zwischen Biofilmwachstum und Ablösung (Marsh and Bradshaw 1995)

In der Initialphase der Plaquebildung dominieren grampositive Kokken (z. B. Streptokokken). Aus der zunehmenden Einlagerung gramnegativer Bakterien resultiert eine komplexere Plaque. In der mehrschichtigen Plaque befinden sich die Anaerobier in tieferen, sauerstoffarmen Schichten. Nach etwa einer Woche ist die Plaque völlig ausgereift und es sind vermehrt Spirochäten vorhanden (Theilade *et al.* 1982).

Die Salze des Speichels mineralisieren die am Zahn haftende Plaque. Bei einer supragingivalen Lokalisation wird die Plaque als Zahnstein bezeichnet, bei einer subgingivalen Manifestation als subgingivales Konkrement. Die subgingivale Konkrementbildung korreliert mit der Zusammensetzung der subgingivalen Flora (Brown *et al.* 1991). Dunkel pigmentierte Konkreme werden durch schwarz pigmentierte Anaerobier und Spirochäten verursacht. Mit *A. actinomycetemcomitans* besiedelte subgingivale Taschen weisen deutlich weniger Konkreme auf als Taschen mit schwarz pigmentierten anaeroben Bakterien und Spirochäten (Brown *et al.* 1991). Subgingivale Konkreme sind fest mit dem Wurzelzement verbunden, so dass eine exakte Unterscheidung von Zahn und Konkrement nicht mehr möglich ist (Selvig 1970). Damit ist die Plaque ein wichtiger Faktor für die Entwicklung von Parodontopathien. In allen Studien wurde die Plaque als Hauptursache für die parodontale Destruktion identifiziert, wobei noch weitere Faktoren eine Rolle spielen (Abdellatif and Burt 1987, Africa *et al.* 1985, Loe *et al.* 1965, Lussi *et al.* 1993).

1.4 Parodontitis

Bei der marginalen Parodontitis handelt es sich um eine multifaktorielle das Parodontium betreffende Erkrankung mit unterschiedlichen Verlaufsformen. Zu Beginn sind der alveoläre Knochen und der desmodontale Faserapparat entzündlich betroffen (Silva *et*

al. 2015). Neben der Karies (50 %) zählt die Parodontitis (30–35 %) zu den häufigsten Ursachen einer Zahnextraktion. Anders als bei einer Gingivitis betreffen die entzündlich-pathologischen Veränderungen bei der marginalen Parodontitis nicht nur das Saumepithel und das gingivale Bindegewebe, sondern auch die Strukturen des Parodonts (Klock and Haugejorden 1991).

Die Bakterien und ihre Stoffwechselprodukte im dentogingivalen Bereich lösen entzündliche Reaktionen in der Gingiva aus, die lokal zu einer irreversiblen Zerstörung des Zahnhalteapparates, d. h. zu einer marginalen Parodontitis, führen können. Der Prozess der Zerstörung des Zahnhalteapparates lässt sich durch eine verbesserte Mundhygiene, ständige Plaquekontrollen und die restlose Entfernung aller subgingivalen Bakterien stoppen oder zumindest verlangsamen (Loe *et al.* 1965). Für einen nachhaltigen Erfolg der Parodontaltherapie sind eine regelmäßige professionelle Plaquekontrolle und eine gute Mundhygiene erforderlich (Lindhe and Nyman 1975). Bei der Behandlung parodontaler Erkrankungen haben sich in der Praxis folgende Schritte etabliert.

- **Schritt 1 – Initialtherapie:** Der Patient wird über seine Erkrankung aufgeklärt, motiviert und zur Mundhygiene instruiert.
- **Schritt 2 – Weiterführende Therapie:** Die Konkremente begünstigen eine zusätzliche Einlagerung von Pathogenen, die zum weiteren Abbau des Zahnhalteapparates führen. Die mechanische Entfernung der subgingivalen Konkremente und des supragingivalen Zahnsteins durch Handinstrumente mit *Scalern* und Küretten verbessert den parodontalen Zustand (Lindhe and Nyman 1975). In manchen Fällen (z. B. bei der aggressiven Parodontitis) ist eine systemische oder lokale Antibiotikatherapie sinnvoll (Herrera *et al.* 2002).
- **Schritt 3 – Erhaltungstherapie:** Das Ziel der Erhaltungstherapie ist die langfristige Sicherung des durch die vorausgegangene Parodontalbehandlung erzielten Zustandes. Eine komplette Heilung des Parodonts ist nicht immer möglich. In der Praxis gilt es in vielen Fällen die Entzündung langfristig zu kontrollieren.

Durch einen *Recall* soll einer möglichen Exazerbation der Erkrankung vorgebeugt werden. Beim Vorliegen eines Rezidivs lässt sich mittels *Recall* dieses frühzeitig behandeln (Ketterl 1990). Die konservative Behandlung durch *Scaling* und Wurzelglättung kann in Kombination mit der Gabe eines Breitspektrum-Antibiotikums das

Fortschreiten der Parodontitis hemmen (Herrera *et al.* 2002, Loesche 1976, Mombelli and van Winkelhoff 1997, Trombelli and Tatakis 2003).

Lokalisierte aggressive Parodontitis (LAP)

Bei der aggressiven Form der Parodontitis wird nach der Klassifizierung parodontaler Erkrankungen von 1999 zwischen einer lokalisierten und einer generalisierten Form unterschieden (Armitage 1999). Ein Hauptmerkmal der aggressiven Parodontitis ist die schnelle Destruktion des Parodontiums (Llorente and Griffiths 2006). Während die LAP lediglich die ersten Schneidezähne und die ersten Molaren befällt (1,6-er Typ, s. Abbildung 2) und in der Pubertät zwischen 12 und 18 Jahren auftritt, kann die generalisierte Form der aggressiven Parodontitis das gesamte Gebiss befallen (Ebersole *et al.* 1994, Tonetti and Mombelli 1999, Dahlen D. *et al.* 2019).

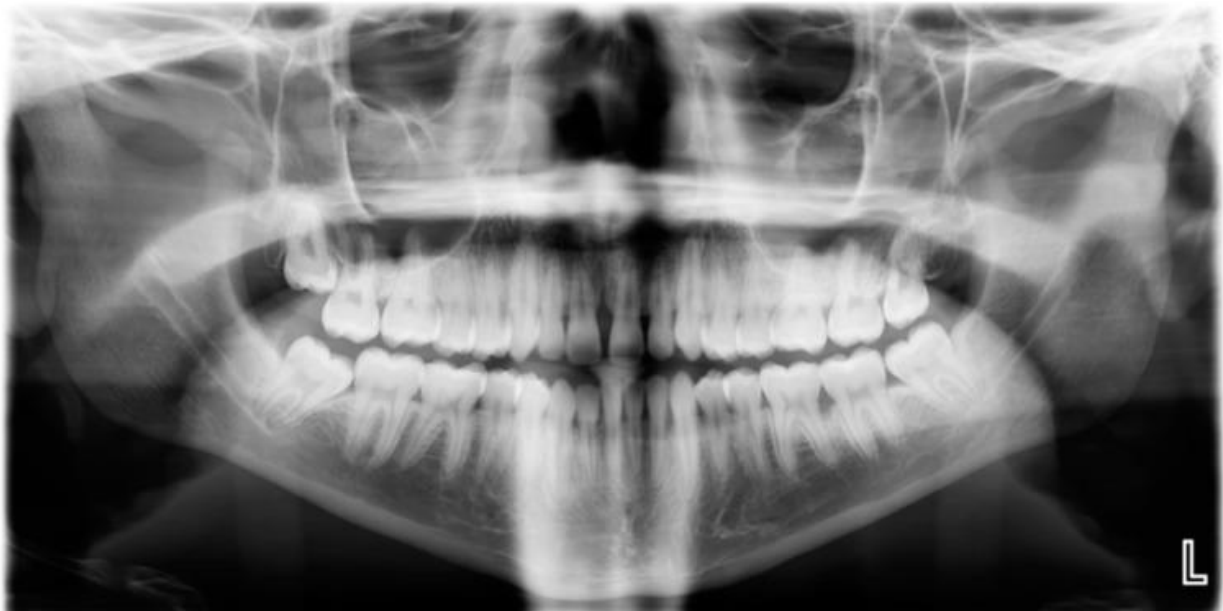


Abb. 2: Panorama-Röntgenaufnahme eines 19-jährigen Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis. Auf der linken Seite ist der Knochenabbau bei den ersten Schneidezähnen und den ersten Molaren (1,6-er Typ) zu erkennen.

Quelle: Pathogens. 2020 Mar; 9(3): 179. Published online 2020 Mar 2. doi: 10.3390/pathogens9030179

Sie tritt vermehrt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr auf (Haubek *et al.* 2006, Tonetti and Mombelli 1999). Die chronische Parodontitis kommt dagegen vor allem bei Erwachsenen vor, steht im direkten Zusammenhang mit der Plaqueakkumulation, und ist im Vergleich zur aggressiven Form durch eine langsame Progression gekennzeichnet (Philstrom *et al.* 2005). Die LAP zeichnet sich durch klinische, mikrobiologische und immunologische Charakteristika aus. Dazu zählen eine schnelle Gewebedestruktion bei

vergleichsweise geringer Plaqueansammlung (Zambon 1985, Armitage 1999). Die LAP beginnt während oder kurz nach der Pubertät nahezu symptomlos (Shaddox L. *et al.* 2010). Bei einer familiären Häufung sind Mädchen häufiger als Jungen betroffen (Baer 1971). Innerhalb weniger Jahre kommt es zu einem massiven Knochenabbau im Bereich der ersten Molaren und mittleren Schneidezähne (Tonetti and Mombelli 1999). Mikrobiologische Untersuchungen von Plaqueproben haben ergeben, dass die befallenen Zahnfleischtaschen vermehrt Bakterien bzw. Bakterienspezies enthalten (Slots 1976, Eger *et al.*, 1996). In zahlreichen Studien wurden große Mengen von *A. actinomycetemcomitans* aus Läsionen der LAP isoliert (Belibasakis G.N. *et al.* 2019, Haubek *et al.* 2006, Slots 1976, Watanabe *et al.* 1989, Yang *et al.* 2004). Für die Pathogenese der LAP ist die Fähigkeit von *A. actinomycetemcomitans*, das Gewebe am Boden der parodontalen Tasche zu invadieren, von erheblicher Bedeutung (Christersson *et al.* 1987a, 1987b). Das Bakterium ist bei 90 % der LAP-Patienten in den parodontalen Taschen nachweisbar (Slots *et al.* 1980). Nahezu alle Patienten mit LAP weisen erhöhte Serum-Antikörpertiter gegen *A. actinomycetemcomitans* und sein Leukotoxin auf (Ling *et al.* 1993).

Ebersole *et al.* (1982) fanden einen erhöhten Antikörpertiter bei LAP-Patienten sowohl im Serum als auch im Speichel. Bei Patienten mit aggressiver Parodontitis oder generalisierter, früh beginnender Parodontitis ist eine verminderte Sekretion von Immunglobulin A (IgA) im Speichel nachweisbar (Hägewald *et al.* 2000, 2002). Ebenso weisen Patienten mit LAP im Vergleich zu Probanden mit gesundem Parodont bzw. mit anderen Formen parodontaler Erkrankungen einen höheren Immunglobulin G (IgG) Antikörpertiter gegen bestimmte Serotypen von *A. actinomycetemcomitans* (vor allem Serotyp b) im Serum und im Gingiva-Fluid auf (Ebersole *et al.* 1982).

Eine Vielzahl von Virulenzfaktoren von *A. actinomycetemcomitans* – darunter ein Leukotoxin, das polymorphkernige Granulozyten und Monozyten lysiert – besitzen eine herausragende Bedeutung in der Pathogenese der LAP (Åberg *et al.* 2015, Frias *et al.* 2001, Vega *et al.* 2019). Laut Untersuchungen gibt es beim Vorkommen der Serotypen geografische und ethnische Unterschiede (Brigido *et al.* 2014). Serotyp b wurde am häufigsten isoliert. Bei deutschen Patienten dominiert der Serotyp b (33,3 %) gegenüber Serotyp c (25 %) und Serotyp a (20 %). In den USA wurde ebenfalls der Serotyp b bei LAP am häufigsten isoliert (Brigido *et al.* 2014, Kim *et al.* 2009). Da das Bakterium *A. actinomycetemcomitans* bei der Ätiopathologie der LAP eine entscheidende Rolle spielt

(Haubek *et al.* 2008, Henderson *et al.* 2010), wurde es für diese Studie ausgesucht, und wird es im Folgenden näher beschrieben.

1.5 *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans gehört zu Gattung *Actinobacillus* und zur Familie der *Pasteurellaceae* (Niels Nørskov-Lauritsen *et al.* 2019). Hierzu zählt eine Vielzahl gramnegativer, fakultativ anaerober Bakterien, darunter die Gattungen *Pasteurella*, *Actinobacillus* und *Haemophilus*, mit bestimmten phäno- und genotypischen Gemeinsamkeiten (Niels Nørskov-Lauritsen and Kilian 2006). 2006 wurde der Name des *A. actinomycetemcomitans* von *Actinobacillus* zu *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* geändert (Nørskov-Lauritsen and Kilian 2006).

A. actinomycetemcomitans wurde erstmals 1912 von Klinger beschrieben (Klinger 1912). Das Bakterium lässt sich auf Agar anaerob oder bei 5-10 % CO₂ in der Luft kultivieren (Stalons *et al.* 1974, Slots 1982). Nach zwei bis drei Tagen erscheinen auf der Agar-Oberfläche 0,5–1 mm große, graue, glatte Kolonien. Aufgrund von Fimbrien zeigen die Zellen eine gute Adhärenz auf der Agar-Oberfläche und beherbergen eine innere sternförmige Struktur (Inouye T. *et al.* 1990, Blix *et al.* 1990, Niels Nørskov-Lauritsen *et al.* 2019, s. Abbildung 3).



Abb. 3: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Sternförmige Struktur nach 4 Tagen auf Agarplatte

Quelle: Niels Nørskov-Lauritsen *et al.* 2019. <https://doi.org/10.20944/preprints201910.0042>.

Die Prävalenz von *A. actinomycetemcomitans* ist bei der LAP besonders hoch (Slots J. 1976); der Keim ist aber auch bei der chronischen Parodontitis nachweisbar (Slots *et al.* 1980). Die subgingivale Mikroflora bei jungen Patienten mit LAP besteht zum größten Teil aus *A. actinomycetemcomitans* (Slots J. 1976, Fine D.H. *et al.* 2019). Bei der Übertragung

unterscheidet man endogene und exogene Formen. Klinisch relevant ist sowohl die Übertragung unter Partnern, aber auch zwischen Eltern und Kindern (DiRienzo *et al.* 1990, 1994, Petit *et al.* 1993, Poulsen *et al.* 1994). Der Übertragungsweg wird durch molekularbiologische Verfahren (z. B. Pulsfeld-Gelelektrophorese) identifiziert, wobei eine genetische Heterogenität von *A. actinomycetemcomitans*-Stämmen bei unterschiedlichen Patienten festgestellt wurde (Kaplan *et al.* 2002). Während in einer Studie bei 18 Patienten elf Genotypen von *A. actinomycetemcomitans* gefunden wurden, wiesen unterschiedliche Plaqueproben eines Patienten nur identische Genotypen auf (Ehmke *et al.* 1999). Bei Familienmitgliedern und zwischen Partnern wird häufig der gleiche Klon identifiziert, was eine familiäre Übertragung belegt (Alaluusua *et al.* 1991).

1.5.1 Eigenschaften

Als parodontalpathogen wird ein Bakterium laut Socransky (1977, 1979) eingestuft, wenn es die folgenden Kriterien erfüllt:

1. Bei Erkrankungsprozessen sollte der Erreger in großer Zellzahl isolierbar sein, im gesunden Zustand dagegen nicht oder nur geringfügig vorliegen.
2. Eine Therapie zur Unterdrückung oder Eliminierung des Erregers sollte sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken.
3. Der Erreger sollte beim Wirtsorganismus eine humorale und/oder eine zelluläre Immunantwort auslösen.
4. Einige der beim Menschen auftretenden Krankheitssymptome sollten nach Inokulation mit dem Erreger auch im Tiermodell zu beobachten sein (z. B. Abbau von Knochen, Destruktion von Bindegewebe, Entzündung).
5. Der Erreger sollte grundsätzlich Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren aufweisen.

A. actinomycetemcomitans erfüllt alle Forderungen von Socransky:

- Weil sich die LAP mit einer Antibiose bei gleichzeitiger Entfernung der subgingivalen Plaquebakterien erfolgreich behandeln lässt, ist von einer Korrelation zwischen der Eliminierung von *A. actinomycetemcomitans* und dem Rückgang der LAP auszugehen (Christersson and Zambon 1993, Slots and Rosling 1983).
- Bei 69–90 % der LAP-Patienten ist eine Erhöhung der Serum-Immunglobulin-Titer (IgG, IgM) gegen *A. actinomycetemcomitans* (Gmür and Baehni 1997, Kaplan *et al.* 1989, Kaslick *et al.* 1980, Lehner *et al.* 1974, Ling *et al.* 1993, Nieminen *et al.* 1993) nachweisbar. Außerdem sind spezifische IgG, IgM und IgA im Speichel und in der

Sulkusflüssigkeit (Ling *et al.* 1993) höher konzentriert. Bei Mäusen verursacht die Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* lokale Abszesse unter dem Fell (Chen *et al.* 1991).

- *A. actinomycetemcomitans* besitzt mehrere Virulenzfaktoren, die mit der Pathogenese der Parodontitis – insbesondere der LAP – assoziiert sind (Fine *et al.* 2019).

Charakteristische Eigenschaften von *A. actinomycetemcomitans* im Zusammenhang mit einer LAP sind die Fähigkeit zur Gewebeinvasion und zur Adhärenz an das Gingiva-Epithel, zur Auslösung einer polymorphkernigen neutrophilen (PMN)-Leukozytose, zur Inhibition der Chemotaxis sowie zur Synthese von Leukotoxinen (lysieren Monozyten und nHL-60-Zellen) (Johansson *et al.* 2000), Lymphozyten-Suppressoren, Resistenzfaktoren gegen die Komplement-vermittelte Lyse, Katalase, Lipopolysaccharide (LPS), Säuren, alkalische Phosphatase, Knochenabbau-Induktionsfaktoren, Kollagenase, Fibroblasten-Inhibitionsfaktoren, Epitheliotoxin (Zambon 1985, Fais *et al.* 2016, s. Abbildung 4).

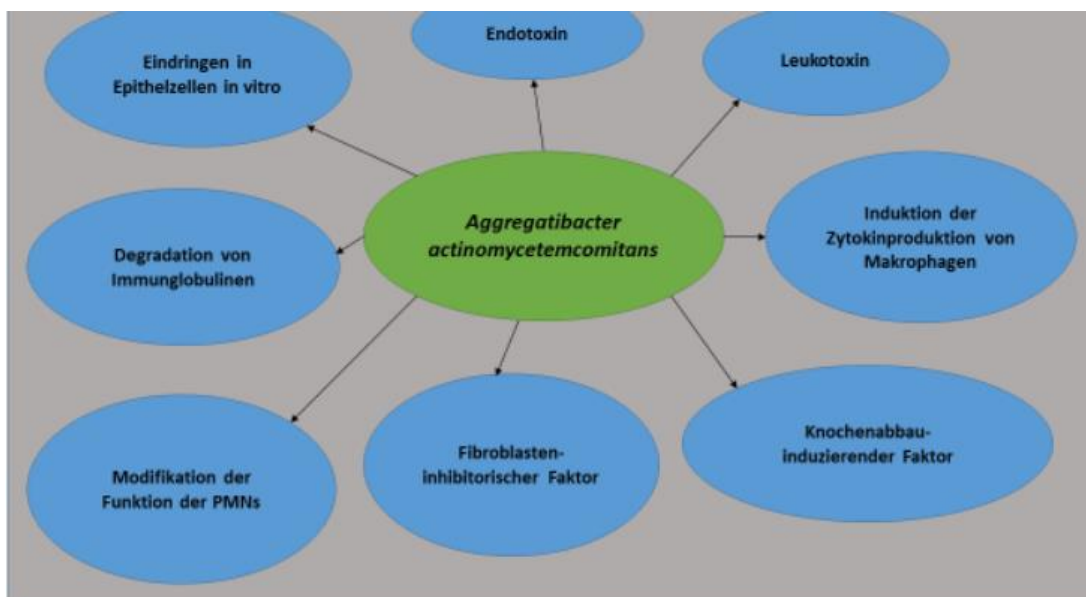


Abb. 4: Virulenzfaktoren von *A. actinomycetemcomitans*

Quelle: Elisa Jurianz 2019

Bueno *et al.* (1998) untersuchten genetische Varianten von *A. actinomycetemcomitans* bei Kindern zweier Familien mit und ohne LAP. Stämme, die vermehrt Leukotoxin produzierten, waren auch bei gesunden Familienmitgliedern in der Lage eine LAP auszulösen (Belibasakis G.N. 2019, Haubek D. *et al.* 2014). In einer Langzeitstudie von Haubek *et al.* (2002) war ein *A. actinomycetemcomitans*-Stamm (JP2) zehn Jahre nach einer konservativen und chirurgischen Behandlung mit Antibiose nicht mehr nachweisbar.

1.5.2 Adhäsion

Die Adhäsion ist die erste Stufe einer Infektion und Voraussetzung für die Invasion und Etablierung des Keimes im Wirtsgewebe (Gibbons and Houte 1975, Manocha und Chen 1990, Ofek und Doyle 1994). Multiple Faktoren der Zelloberfläche von *A. actinomycetemcomitans* (Fimbrien, äussere Membranproteine, und Vesikel) sind bei der Adhäsion beteiligt (P Fives-Taylor *et al.* 1995). Die Bedeutung der Fimbrien bei der Adhäsion wurde von Meyer und Five-Taylor (1993) untersucht. Die Adhäsionsfähigkeit gut adhätierender *A. actinomycetemcomitans*-Stämme sank nach einer Behandlung mit Phosphatpuffer (PBS = engl.: *phosphate-buffered saline*) um 50 %. Die Waschflüssigkeit mit dem Oberflächenmaterial des gut adhätierenden Stammes steigerte die Adhäsionsfähigkeit von schlecht adhätierenden Stämmen. Die Proteine in den Oberflächenkomponenten sind an der Adhäsion beteiligt (Meyer and Fives-Taylor 1994, Mintz and Fives-Taylor 1994).

1.5.3 Oberflächenproteine (engl.: *outer membrane proteins, OMP*)

Im Elektronenmikroskop zeigt der parodontalpathogene Keim *A. actinomycetemcomitans* zwei Strukturen der Oberflächenproteine, mit und ohne Fimbrien (David R. Danforth *et al.* 2019, s. Abbildung 5).

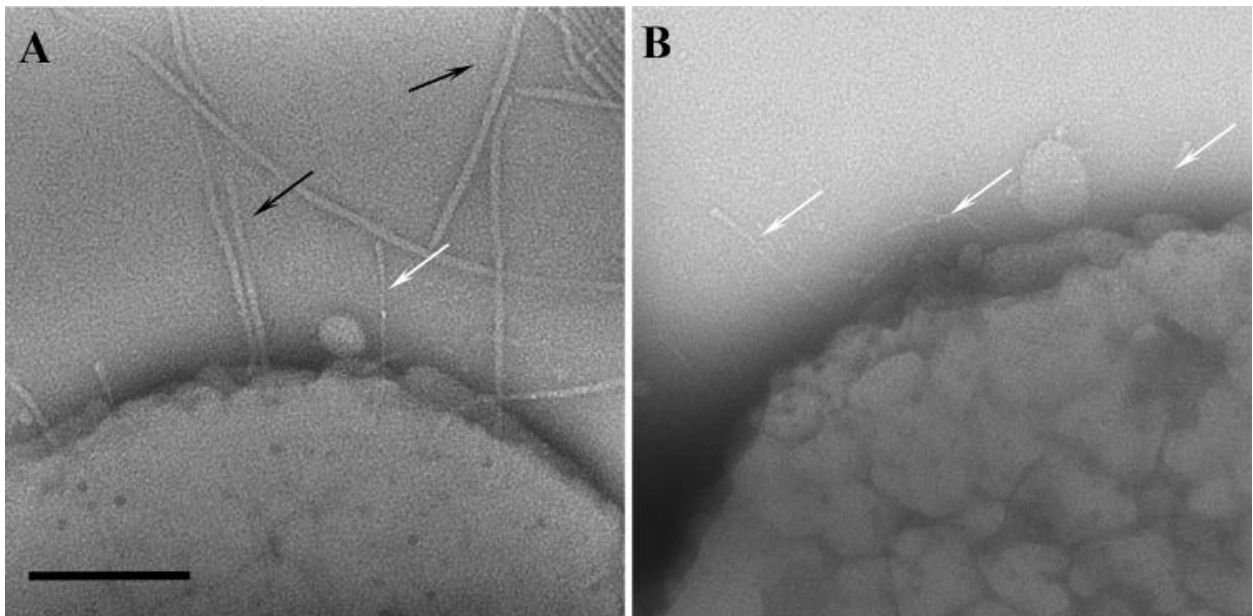


Abb. 5: Unter Elektronenmikroskop zeigt das Bild A *A. actinomycetemcomitans* mit Fimbrien (schwarze Pfeile) und das Bild B ohne Fimbrien (mit extrazelluläres Matrixprotein-Adhäsion A (EmaA) (weisse Pfeile)).

Quelle: Infect Immun. 2019 Jan; 87(1): e00704-18. Published online 2018 Dec 19. Prepublished online 2018 Oct 8. doi: 10.1128/IAI.00704-18

Ein Oberflächenprotein, das die Adhäsion von *A. actinomycetemcomitans* an Kollagen vermittelt, wurde identifiziert (Mintz KP 2004, Ruiz *et al.* 2006). EmaA befindet sich auf der nicht fimbrienhaltigen Oberfläche. Verschiedene nicht in Fimbrien enthaltene Adhäsine zeigen eine Bindung zu Epithelzellen [Aae (Autotransporter Adhesin) (Rose JE *et al.* 2003, Fine HD *et al.* 2005) und OMP100 (Asakawa R. *et al.* 2003)] oder Kollagen [extrazelluläres Matrixprotein-Adhäsin A EmaA (Mintz KP 2004) und OMP100 (Asakawa R *et al.* 2003)]

Haase *et al.* (1999) bestimmten in dem *A. actinomycetemcomitans*-Stamm 283 zwei OMP mit einem Molekulargewicht von 43 und 20 kDa. Asakawa *et al.* (2003) fanden in ihrer Untersuchung zur OMP-Virulenz bei *A. actinomycetemcomitans*-Stamm Y4 sechs Proteine (Molekulargewicht in kDa: OMP100, OMP64, OMP39, OMP29, OMP18 und OMP16).

OMP100 befindet sich auf der Oberfläche von *A. actinomycetemcomitans*-Stämmen mit starker Virulenz und ist an der Adhäsion und Invasion beteiligt (Asakawa *et al.* 2003, Oscarsson *et al.* 2019). OMP34 (früher OMP29) ähnelt dem OmpA Protein von *Escherichia coli* (*E. coli*) und lässt sich wie dieses durch Hitze modifizieren. Es kommt vor allem beim Serotyp b vor (Bueno *et al.* 1998). Eine Untersuchung der äußeren Membranen dieser Bakterien ergab vier weitere Hauptproteine mit Molekulargewichten von 30 kDa, 36 kDa, 37 kDa und 39 kDa (Komatsuzawa *et al.* 1999). Weitere OMP mit Molekulargewichten von 19 kDa, 24 kDa, 29 kDa, 35 kDa, 40 kDa und 70 kDa wurden von Watanabe *et al.* (1989) beschrieben.

OmpA1 und OmpA2 (*outer membrane proteins A1 und A2*) spielen ebenfalls bei der Adhäsion und Serumresistenz von *A. actinomycetemcomitans* eine wichtige Rolle (Mark Lindholm *et al.* 2019).

1.6 Lektine

Lektine sind komplexe, kohlenhydratbindende Proteine. Sie sind meist nicht immunogen, führen aber zur Agglutination von Zellen oder zur Präzipitation von Polysacchariden bzw. Glykokonjugaten (Kocourek and Horejsi 1981, Dixon 1981).

Stillmark berichtete bereits 1888 von hämagglutinierenden Pflanzeninhaltsstoffen. Er beobachtete, dass Erythrozyten unter dem Einfluss des toxischen Ricins aus den Samen von *Ricinus communis* (Wunderbaum), zusammenklumpen (s. Abbildung 6).

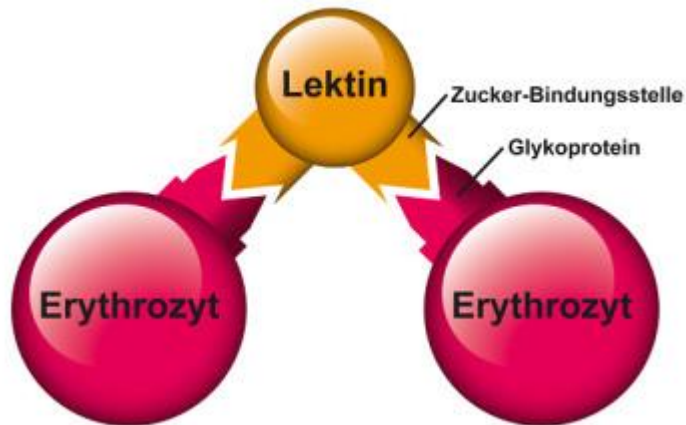


Abb. 6: Agglutinierendes Lektin.

Quelle: Ferninstitut für mentale Technologie <https://www.menttech.de/ernaehrung/8-vom-preisder-ignoranz/>

Das Lektin Concanavalin A (Con A) aus *Canavalia ensiformis* führt laut Sumner und Howell (1936) nicht nur zur Agglutination von Erythrozyten (s. Abbildung 6), sondern auch zur Verklumpung von Stärke-Granula sowie zur Präzipitation von Mukoproteinen und Glykogen. Sucrose hemmt die Inhibition der Hämagglutination, was beweist, dass es sich bei den Lektin-Rezeptoren um Kohlenhydrat-Gruppen handelt.

Der Terminus Lektin (von lat.: *legere: auswählen*) geht auf Boyd und Shapleigh (1954) zurück. Diese Bezeichnung ersetzte ältere Begriffe, wie Phyttagglutinine, Phythämagglutinine, Phasine, Normalantikörper, natürliche Antikörper oder antikörperähnliche Substanzen (Kocourek 1986, Sharon 1977).

Lektine bestehen in der Regel aus zwei bis vier Untereinheiten mit jeweils einer Kohlenhydrat-Bindungsstelle. Die Bindungsstellen der Untereinheiten des Lektins sind in der Regel identisch; Ausnahmen mit verschiedenen Bindungsstellen innerhalb eines Lektins sind jedoch bekannt (Sharon 1977).

Lektine sind ein Bestandteil der Oberflächenproteinen in Pili lokalisiert. Durch ihre Hilfe können die Bakterien an Wirtsrezeptoren adhären. Sie werden deshalb als Ahäsine genannt (Sharon N 1987, Sharon N *et al.* 1981)

Dass Mikroorganismen eine Bindung über ihre Lektine an Oberflächenkohlenhydratstrukturen des Wirts einhergehen, wurde in mehreren Untersuchungen bestätigt (Uhlenbruck G *et al.* 1983, Schüler *et al.* 2012).

Die Zuckerspezifität der Lektine wird über die Hemmung der Lektin-bedingten Hämagglutination bzw. Präzipitation mittels Monosaccharide bestimmt. Viele Lektine gehen mit Oligosacchariden eine stärkere Bindung ein als mit Monosacchariden; einige Lektine lassen sich nur mit Oligosacchariden hemmen (Brooks *et al.* 1997, Goldstein and Poretz 2012, Sharon 1977, 1987). Lektine binden in der Regel an die terminalen Glykosylgruppen der Polysaccharide oder Glykoproteine. Ausnahmen bilden z. B. Concanavalin A (Con A) und Weizenkeim-Agglutinin (WGA, engl.: *wheat germ agglutinin*), die an interne Mannose-(Man)-Strukturen (Concanavalin A) bzw. an terminale Zucker und interne N-Acetylgalaktosamine (GalNAc, Weizenkeim-Agglutinin) binden (Goldstein and Poretz 2012).

Neben Lektinen pflanzlicher Herkunft sind auch Lektine mikrobiellen Ursprungs bekannt. Während Lektine pflanzlichen Ursprungs zum pflanzlichen Abwehrsystem gehören (z. B. Hemmung von Pilzwachstum) (Brooks *et al.* 1997), dienen mikrobielle Lektine der Adhäsion der Mikroorganismen an ihre Zielzellen. Diese Adhäsine oder bakteriellen Lektine sind Bestandteil von Fimbrien und Pili auf der Bakterienoberfläche (Sharon 1977). Die meisten Bakterien besitzen verschiedene Adhäsine. Die Adhäsine-vermittelte Anheftung wird durch diverse Faktoren (z. B. Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen, andere Oberflächenmoleküle) beeinflusst (Ofek and Doyle 1994).

Kohlenhydrat-Abschnitte von Molekülen des Mucus oder an den zellulären Oberflächen fungieren als Rezeptoren für bakterielle Lektine. Die Adhärenz von *Streptococcus mutans* (*S. mutans*; Serotyp a, b, c, e, g) an von Speichel-ummanteltes Hydroxylapatit (S-HA, engl.: *saliva-coated hydroxylapatite*) wird durch 0,1 M Galaktose (Gal) und Melibiose (6 α -D-Galaktosyl-D-Glukose), nicht jedoch durch Laktose gehemmt (Gibbons and Houte 1975). Diese Befunde belegen die Existenz eines *S. mutans*-Lektins spezifisch für α -Galaktoside der Speichelproteine der Pellikel. Durch eine Vorbehandlung der Muzine mit α -Galaktosidase wird die Agglutination von *S. mutans* gehemmt (Levine *et al.* 1978). Auch die enzymatische Abspaltung von Sialinsäure (engl.: N-acetylneuraminic acid, NANA) aus künstlichen Pellikel verringert die Bindung von *S. mutans* an Speichel-ummanteltes Hydroxylapatit, was die Existenz eines NANA-spezifischen Adhäsins in *S. mutans* belegt (Liljemark *et al.* 1989).

Aktuell hat sich die Kategorisierung der Lektine anhand ihrer Zuckerspezifität (Zucker ohne Angabe in D-Konfiguration) und nicht anhand ihrer Herkunft etabliert (Goldstein and Poretz 2012):

1. Glukose-(Glc)- bzw. Man-bindende Lektine
2. N-Acetylglukosamin-(GlcNAc)-bindende Lektine
3. GalNAc- bzw. Gal-bindende Lektine
4. L-Fukose-(L-Fuc) -bindende Lektine
5. NANA-bindende Lektine

In der Literatur fehlen Studien zur spezifischen Bindung zwischen den Oberflächenproteinen von *A. actinomycetemcomitans* und den Oligosacchariden.

1.7 Glykoproteine

Glykoproteine zählen zusammen mit Glykolipiden, Glykophospholipiden, Glykosphingolipiden und Proteoglykanen zu den Glykokonjugaten. Durch ihre Ummantelung mit Oligosacchariden (*Coating*) werden Glykoproteine vor Angriffen durch Proteasen oder Antikörper geschützt (O'Connell *et al.* 1991, Smith *et al.* 1986, Varki 1993). Viele sezernierte Proteine (z. B. Antikörper, Blutgerinnungsfaktoren) enthalten Oligosaccharid-Einheiten. Strukturbeispiele für Oligosaccharide sind in Abbildung 7 dargestellt.

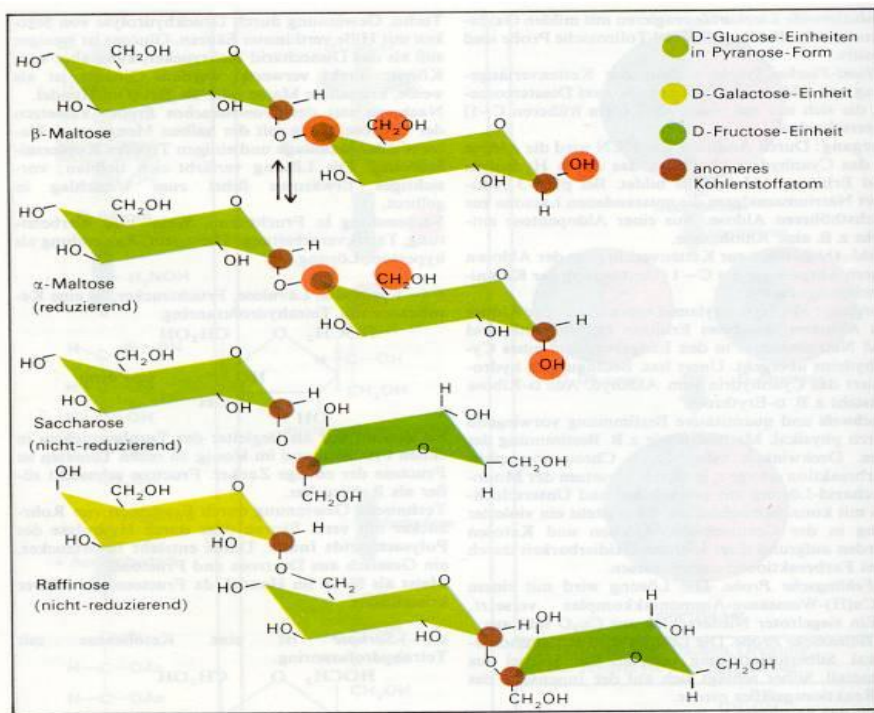


Abb. 7: Strukturbeispiele für Oligosaccharide

Dargestellt sind vier Zucker (alpha- und beta-Maltose, Saccharose und Raffinose) mit Verknüpfung der Monosaccharid-Einheiten und Konfiguration.

Quelle: Breuer 1992

In der Zellmembran kommen Oligosaccharide als Bestandteile von Glykoproteinen und Glykolipiden vor. Häufige Monosaccharid-Einheiten in Glykokonjugaten sind L-Fuc, D-Gal, D-GalNac, D-GlcNac, D-Man und NANA (Stryer 1994). Die zahlreichen Verknüpfungsmöglichkeiten, die sich aus der Möglichkeit der α - und β -glykosidischen Bindung ergeben (vgl. Abbildung 8), bedingen eine große strukturelle Vielfalt der Glykokonjugate.

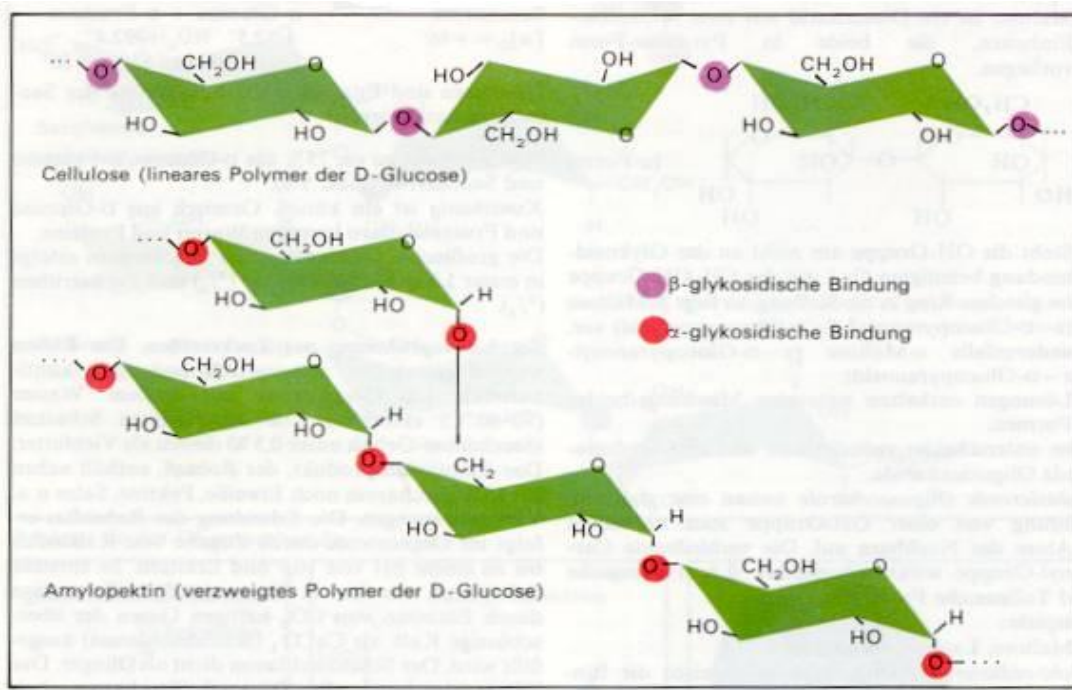


Abb. 8: Verknüpfungsmöglichkeiten für Oligosaccharide

Bei der Cellulose (oben) handelt es sich um eine beta-glykosidische, beim Amylopektin (unten) um eine alpha-glykosidische Bindung.

Quelle: Breuer 1992

Die Kohlenhydrat-Reste von Glykoproteinen sind auf drei Arten mit dem Protein verbunden: N-glykosidisch, O-glykosidisch oder über Ethanolaminphosphat (Varki 1993). Die Glykane werden entsprechend als N-Glykane bzw. O-Glykane bezeichnet. Bei N-Glykanen ist GlcNAc über eine Asparagin-Seitenkette an das Protein gebunden. Bei O-Glykanen erfolgt die Verknüpfung über die Hydroxylgruppen von Serin, Threonin oder Hydroxyprolin (Kornfed and Kornfed 1985).

1.7.1 Glykoproteine des Speichels

Je nach Ausmaß der Glykosylierung besitzen Glykoproteine einen serösen oder mukösen Charakter. Die Glykoproteine des Speichels lassen sich wie folgt einteilen (Jancke 2002):

1. Glykoproteine mit einer selbstständigen Glykoproteingruppe (sekretorisches IgA, Laktoferrin, Kallikrein, Fibronectin).
2. seröse Glykoproteine mit einem hohen Man-Anteil, einem niedrigen Molekulargewicht und einer N-glykosidischen Bindung (Prolinreiche Glykoproteine, α -Amylase, Peroxidase, Anhydrase).
3. muköse Glykoproteine mit einem hohen Molekulargewicht, einem geringen Man-Anteil und überwiegend O-glykosidischen Bindungen (Muzine).

Dem Kohlenhydratanteil bei den hochmolekularen Muzinen und prolinreichen Glykoproteinen kommt eine große Bedeutung bei der Adhärenz von Mikroorganismen an orale Strukturen zu. Glykane dienen als spezifische Rezeptoren für bakterielle Lektine. Binden die Glykane an Hydroxylapatit, fördern sie die Bindung der Mikroorganismen an Zahnoberfläche. Sind die Glykane im Speichel gelöst, blockieren sie die Bindungsstellen der Lektine. Auf diese Weise können die Mikroorganismen an die oralen Strukturen nicht adhären (Jancke 2002, Tenovuo 1989, Kage 2000).

Bei der Untersuchung der Bindung der Oligosaccharide an *A. actinomycetemcomitans* wurde in unseren Experimenten Muzin zum Einsatz gebracht.

1.7.2 Muzine

Muzine sind die Hauptvertreter der Proteine mit einer O-Glykosylierung. Sie werden häufig auf Epithelzellen gefunden (Haltiwanger and Lowe 2004). Die von Becherzellen und exokrinen Drüsen sekretierten Muzine machen einen wesentlichen Anteil des Mukus aus. Muzine besitzen einen Kohlenhydrat-Anteil von 90 % (Rose 1989).

Obwohl sich die Muzine durch die Art, Häufigkeit und Zusammensetzung der Kohlenhydrate teilweise deutlich unterscheiden, existieren auch Gemeinsamkeiten. Grundsätzlich werden die Oligosaccharidketten entweder über eine O- oder N-glykosidische Bindung an den Peptidstrang gebunden (s. Abbildung 9). Bei der O-glykosidischen Bindung in der PTS-Region fungieren GalNAc auf der Kohlenhydrat-Seite bzw. Serine / Threonine auf der Proteinseite als Bindeglieder. Diese Glykoproteine formen das Hauptelement des Mukus. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie auch als Muzin-ähnliche Glykoproteine (engl.: *mucin-like glycoproteins*) bezeichnet. Sie kommen auch an deren Stelle vor, so etwa in Membranen als elementares Element der Phospholipid-Bilayer.

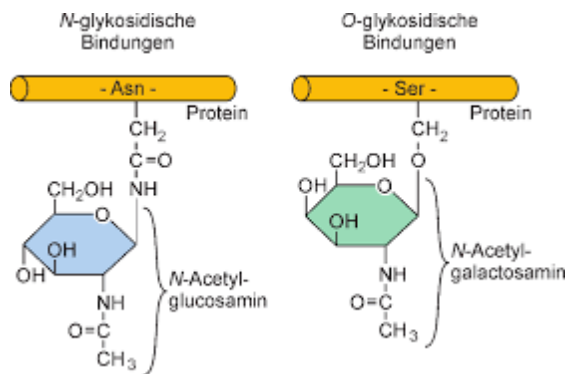


Abb. 9: Müller-Esterl W. (2018) Posttranslationale Prozessierung und Sortierung von Proteinen.

Quelle: In: Biochemie. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54851-6_19

1.7.3 Anti-adhäsive Wirkung löslicher Kohlenhydrate

Die Lektin-vermittelte Adhäsion von Mikroorganismen an zelluläre Oberflächenstrukturen sind für das Infektionsgeschehen von großer Relevanz (Gibbons, R. J. *et al.* 1975, Ofek I, *et al.* 2003). Durch Störung der Ligand-Rezeptor-Interaktion zwischen Mikroorganismus und Zielzelle kann die Besiedelung von epithelialen Oberflächen und damit die Infektion verhindert werden (Lindhorst 2000). Die immunologische Funktion der Oligosaccharide wurde in vielen Arbeiten beschrieben (Ofek *et al.* 1977). Sie verhindern die Adhäsion der Mikroorganismen und damit ihre Invasion (Ofek und Doyle 1994, Bode L. 2012, Musilova S. *et al.* 2014, Morozov V. *et al.* 2018) und dienen somit als Schutz vor Infektion. Potenziell lässt sich die anti-adhäsive Wirkung von Zuckern oder zuckerähnlichen Strukturen (Glykomimetika) auch therapeutisch nutzen. Glykomimetika imitieren die Kohlenhydrat-Reste der Oberflächenstrukturen (z. B. Membranproteine) der Zielzellen, und können über die Bindung an die mikrobiellen Lektine die Adhäsion von Mikroorganismen an die Epithelien verhindern (Kage *et al.* 1995). Diese Bindung erfuh in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen (Lindhrst und Dubber 2015, Sood *et al.* 2018, Haab und Klamer 2020).

2. Fragestellung

Bei der Mehrzahl der Infektionen ist die Anheftung eines pathogenen Erregers an das Wirtsgewebe der erste Schritt im pathogenetischen Geschehen (Manocha and Chen 1990). Die Adhäsion erfolgt über die Bindung von Oberflächenstrukturen (Lektine) der bakteriellen Erreger an spezifische Glykan- oder Glykokonjugate der Wirtszelle (Uhlenbruck *et al.* 1983, Marsh *et al.* 1995, Haab und Klamer 2020). Diese Adhäsion ist eine unverzichtbare Voraussetzung für die folgende Invasion (Ofek und Doyle 1994). Die adhäsionhemmende Wirkung der Oligosaccharide beruht auf einer Strukturähnlichkeit mit den Glykanen auf der Wirtszelloberfläche (Bernardi A. *et al.* 2015, Lindhorst und Dubber 2015, Sood *et al.* 2018). Die antimikrobielle Rolle z.B. der Muttermilch-Oligosaccharide ist damit verbunden, dass sie eine Bindung mit den Lektinen der Mikroorganismen einhergehen, und damit ihre Adhäsion verhindern (Craft KM *et al.* 2019). Die Identifikation der Struktur des Kohlenhydrat-Anteils, an den ein Lektin bindet, ermöglicht den Einsatz löslicher Oligo- bzw. Monosaccharide als kompetitive Hemmstoffe, um die Adhäsion von Mikroorganismen zu hemmen bzw. eine bestehende Bindung aufzulösen (Kage *et al.* 1995, Kage 2000).

In der vorliegenden Arbeit soll die potenzielle Bindung der Lektine (Oberflächenproteine) von *A. actinomycetemcomitans* an 200 aus der Molke extrahierte Oligosaccharid-Fractionen untersucht werden. Dabei sollen Oligosaccharide mit hohen Bindungsaffinitäten identifiziert werden, die sich möglicherweise als kompetitive Inhibitoren der Lektin-Kohlenhydrat-Interaktion eignen, um die Adhäsion von *A. actinomycetemcomitans* an die zelluläre Oberfläche zu unterbinden. Die antiadhäsive Kapazität der Oligosaccharide soll mittels eines kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionstests gemessen werden.

3. Material und Methodik

3.1 Materialien

Folgende **Materialien und Geräte** wurden für die vorliegende Dissertation verwendet:

- 96-Well Mikrotiter-Platten (Nunc GmbH & Co. KG Deutschland, Wiesbaden)
- Bichonin (BCA) Protein Assay Reagent (Pierce) (Pierce, Rockford USA)
- Columbia-Agar (Sifin GmbH, Berlin, Germany)
- Eppendorf Multipipette® (Eppendorf, Berlin)
- Eppendorf Zentrifuge 5415c (Eppendorf, Berlin)
- Gefrierschrank (-20°C) (Liebherr, Biberach an der Riss)
- Gefrierschrank (-80°C) (Liebherr, Biberach an der Riss)
- Greiner-Röhrchen (Greiner, Nürlingen)
- Inkubator Heraeus VT 5042 EK (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
- Kolbenhubpipetten (Capp, Dänemark)
- Kühlschrank (4°C) (Liebherr, Biberach an der Riss)
- Lagerungskästen für Greiner-Röhrchen (Greiner, Nürlingen)
- Messbecher
- Multikanalpipette (Capp, Dänemark)
- Polyethylenterephthalat-(PET)-Flaschen
- Pipettenspitzen (R. Brand GmbH & Co, Wertheim)
- Plastikfolie zum Abkleben der Platte
- Sartorius Analysewaage (Sartorius GmbH, Göttingen)
- Schalen zum Färben (StainEase)
- Schüttler IKA MTS 4 (IKA Labortechnik, Staufen i. Br.)
- Spektralphotometer Dynatech MR 7000 (Dynatech, Denkendorf)
- Tecan ultra 384-Photometer (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany)
- 4–12 % Tris-Glycine Gel 1 mm x 10-well (Invitrogen)
- Waschautomat Dynatech MR 7000 (Dynatech, Denkendorf)
- XCell SureLock: Gelelektrophorese-Kammer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland)
- Drigalskispatel (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Germany)

Folgende **Reagenzien** wurden verwendet:

- Bromphenolblau
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Dithiothreitol (DTT)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
- Ethanol
- Glycerol
- Kaliumdihydrogenphosphat
- Kaliumhydroxid
- Mark12™ Unstained Standard Proteingrößenmarker (Invitrogen)
- Natriumchlorid
- Natriumphosphat
- 5 % Schafsblut (Oxoid)
- Schädler-Bouillon (Becton-Dickinson)
- Tetramethylbenzidin (TMB)
- Tris-HCl
- Streptavidin, gekoppelt mit Peroxidase (Calbiochem Corporation, La Jolla, USA)
- Tween® 20 (Sigma Biochemica, Deisenhofen)
- Vitamin K (Oxoid)
- Wasserstoffperoxid
- Zitronensäure-Monohydrat

Kulturmedium für *A. actinomycetemcomitans*

Das für die Kultivierung von *A. actinomycetemcomitans* verwendete Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Zur Anzucht von fakultativen Anaerobiern und Aerobiern wurden Columbia-Agar mit 5% Schafsblut verwendet. Auf diesem Nährboden ist die Anzucht der meisten fakultativ anaeroben Bakterien möglich.

Columbia-Agar (Sifin GmbH, Berlin, Germany)

Mischung aus 50 mg Häm, 1 ml 1 N Natriumhydroxid (NaOH) und 100 ml dest. H₂O

- 2 Ampullen Vitamin K.

- 5 % Schafsblut

Schädler-Bouillon (Becton-Dickinson)

Zusammensetzung in g/l (angenähert):

Caseinpepton	5,66
Sojapepton	1,0
Natriumchlorid	1,66
Kaliumhydrogenphosphat.....	0,83
Peptonmischung.....	5,0
Hefeextrakt	5,0
Glucose	5,83
Tris.....	3,0
L-Cystin	0,4
Haemin	0,01
pH-Wert	7,6 ± 0,2

Puffer und Lösungen für die Biochemie

Gallati-Puffer (Sigma Biochemica, Deisenhofen)

8,4 g Zitronensäure-Monohydrat in 160 ml dest. H₂O lösen

- mit 4 N Kaliumhydroxid (KOH) auf pH 3,95 einstellen
- auf 200 ml mit dest. H₂O auffüllen
- abschließend 68 µl 30%ige Wasserstoffperoxid (H₂O₂) hinzufügen

Phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma Biochemica, Deisenhofen)

- 1,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)
- 8,22 g Natriumphosphat (Na₂PO₄)
- auf pH 7,6 einstellen und auf 1 l auffüllen

Probenpuffer für die Elektrophorese (2 x) (Sigma Biochemica, Deisenhofen)

- 250 mg Dithiothreitol (DTT) in 0,5 ml dest. H₂O lösen, 2-fach konzentriert
- 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (2,5 ml)
- 10 % Bromphenolblau (0,5 ml)
- Glycerol (ml)
- 2,6 M Dithiothreitol-(DTT) -Lösung (100 µl)

Probenverdünnungspuffer (Sigma Biochemica, Deisenhofen)

- 150 mM Natriumchlorid (NaCl) (= 0,766 g/l)
- 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (= 372,2 mg/l)
- in PBS lösen

Streptavidin (Calbiochem Corporation, La Jolla, USA)

- gekoppelt mit Peroxidase als sekundäres Konjugat (lag als fertige Lösung vor)

Tetramethylbenzidin-(TMB)-Färbepuffer (Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz)

- 1 % Tetramethylbenzidin-(TMB)-Substrat in Gallati-Puffer

Tetramethylbenzidin-(TMB)-Substrat (Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz)

- 240 mg Tetramethylbenzidin (TMB)
- 5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)
- 5 ml Ethanol

Waschpuffer (Sigma Biochemica, Deisenhofen)

- 1,2 g KH_2SO_4 + 8,22 g Na_2HPO_4 / l (= PBS)
- + 0,05 % TWEEN
- 0,05 % Tween® 20 in PBS lösen

3.2 Methoden

3.2.1 Studienablauf

Ablaufschema

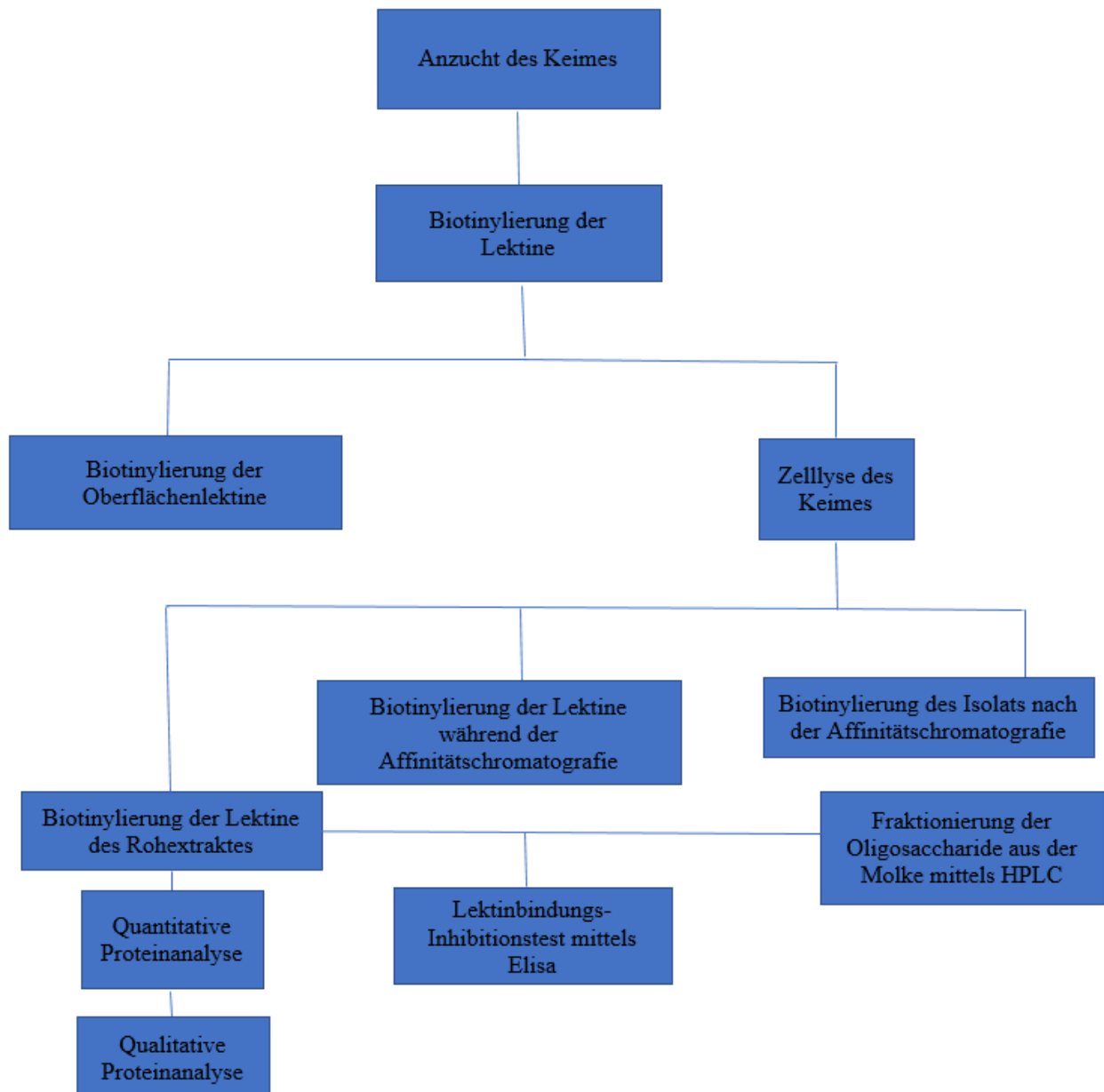


Abb. 10: verdeutlicht die Arbeitsschritte der vorliegenden Arbeit.

Nach der Anzucht der Bakterien wurden Reinheitskontrollen durchgeführt. Die für die Adhäsion verantwortlichen OMP (Lektine) wurden für die Detektion biotinyliert (s. Abbildung 11). Da bei einer Oberflächen-Biotinylierung nicht alle OMP mit Biotin markiert werden könnten (nicht vom Biotin erfasst), wurde dazu eine Zellyse durchgeführt. Zur

Abtrennung zellinterner Proteine (spielen bei der Adhäsion keine Rolle) von den OMP wurde die Affinitätschromatografie (Muzin-Sepharose-Säule) verwendet. Biotinyliert wurde folglich der Rohextrakt (ohne Säule, d. h. es enthält zellinterne und externe Proteine), die Extrakte während des Affinitätschromatografie-Vorgangs und die Extrakte danach (Eluat). Die Fraktionierung der Oligosaccharide aus der Molke erfolgte mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC). Die extrahierten *A. actinomycetemcomitans*-Lektine wurden in einen Lektinbindungs-Inhibitionstest (Elisa) mit den 200 Oligosaccharid-Fractionen eingesetzt. Im Anschluss erfolgten quantitative und qualitative Proteinbestimmungen der extrahierten Lektine. Die qualitative Proteinanalyse wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und die quantitative Proteinanalyse mittels BCA-Reagenzes durchgeführt.

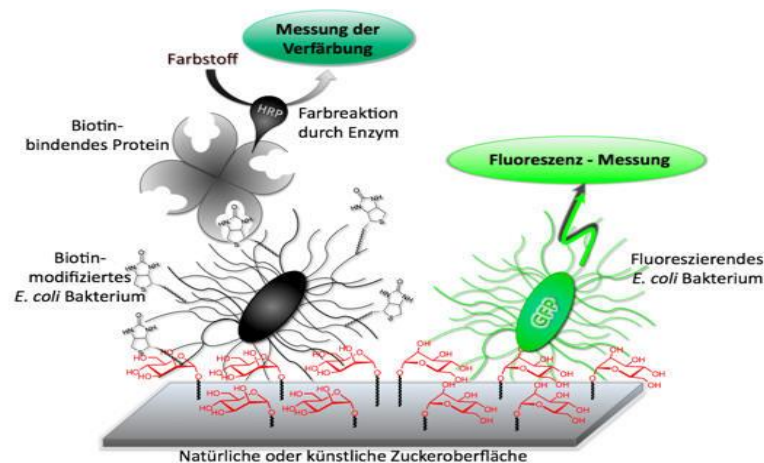


Abb. 11: zeigt das Vorgehen bei dieser Arbeit am Beispiel von *E. coli* Bakterium

Quelle: Mirja Hartmann, Uni Kiel Beobachtung der Adhäsion von Bakterien an künstliche, glykosilierte Oberflächen (URL: <https://www.organische-chemie.ch/chemie/2009/dez/bakterien.shtm>)

Auf der künstlichen Zuckeroberfläche (unten) werden zwei Bakterienarten aufgebracht. Links ein Bakterium, dessen Fimbrien mit Biotin markiert sind. Dieses Biotin geht eine Verbindung mit einem speziellen Protein ein, das durch Grünfärbung sichtbar gemacht werden kann. Rechts ein Bakterium, dessen Struktur so verändert wurde, dass es fluoresziert.

3.2.2 Anzucht von *A. actinomycetemcomitans*

Auswahl des Keimes

Die verwendeten *A. actinomycetemcomitans* Bakterien stammten aus der Abteilung für „Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin“ des Zentrums für Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Leiter Prof. Dr. Dr. J.P. Bernimoulin). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der parodontalpathogene Stamm von *A. actinomycetemcomitans* Serotyp b DSM 11123 eingesetzt, da dieser bei der LAP am häufigsten vorkommt und bei der Pathogenese eine Schlüsselrolle spielt. Der Keim wurde in lyophilisierter Form von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig (Deutschland) bezogen. Die Vorkultivierung von *A. actinomycetemcomitans* erfolgte auf Columbia-Blut-Agar-Platten. Einzelne Kolonien wurden in eine Schädler-Bouillon überführt und unter anaeroben Bedingungen (5% CO₂) bei 37 °C inkubiert (Stalons *et al.* 1974).

Mikrobiologische Methoden und Stammhaltung

Zur Herstellung der Columbia-Blut-Agar-Platten wurden 42,5 g Agar abgewogen und in einem Liter dest. H₂O unter ständigem Rühren gelöst. Durch Erhitzen wurde die Lösung aufgeköcht und bei 121 °C für 15 min autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur auf 50 °C abgekühlt. Danach wurden der Lösung 50 mg Hämin, 1 ml 1 N Natriumhydroxid (NaOH), zwei Ampullen Vitamin K und 5 % Schafsblut zugefügt und durch Rühren vermischt. Die fertige Columbia-Agar-Lösung wurde vorsichtig in Petrischalen gegossen. Nach einer Lagerung für 2,5 h im Kühlschrank wurden die Agarplatten mit *A. actinomycetemcomitans* angeimpft.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Platten unter sterilen Bedingungen angeimpft. Zunächst wurden die Agarplatten zum Trocknen unter eine Laminar-*flow* Werkbank gestellt. Anschließend wurde 1 µl *A. actinomycetemcomitans* Lösung mit einer sterilen Einmalpipette auf jede Agarplatte aufgetragen. Die Bakteriensuspension wurde mit einem sterilen Drigalskispatel gleichmäßig ausgestrichen. Zur Inkubation wurden die Platten in einen festverschließbaren Behälter überführt. Zur Kontrolle der anaeroben Bedingung wurde ein *Code*-Streifen in den Behälter eingebracht. Unter anaeroben Bedingungen verfärbte sich der *Code*-Streifen von blau nach weiß. Die Inkubation des Behälters erfolgte im Brutschrank bei 37 °C.

Nach zwei Tagen wurden die Agarplatten makroskopisch und unter dem Lichtmikroskop auf Verunreinigungen untersucht. Makroskopisch waren punktförmige graue Kolonien mit homogenem Erscheinungsbild erkennbar (vgl. Abbildung 12).



Abb. 12: Kolonien von *A. actinomycetemcomitans* auf einer Columbia-Blut-Agar-Platte

Für die lichtmikroskopische Kontrolle wurde eine Gramfärbung durchgeführt.

Gramfärbung

Ein Tropfen sterile Natriumchlorid-Lösung (NaCl, 0,9 %) wurde auf einen fettfreien Objektträger gegeben. Eine Kolonie von *A. actinomycetemcomitans* wurde von der Agarplatte entnommen und in der Natriumchlorid-Lösung gleichmäßig auf dem Objektträger verrieben. Nach einer Lufttrocknung wurde eine Hitzefixierung durchgeführt, indem der Objektträger dreimal kurz in den oberen Teil einer Bunsenbrenner-Flamme gehalten wurde.

Für die anschließende Gramfärbung wurde der Objektträger für 1 min vollständig mit Lugols-Lösung bedeckt und anschließend unter dest. H₂O vorsichtig für etwa 5 sec. abgespült. Die Entfärbung mit dest. H₂O wurde solange durchgeführt, bis keine blauen Farbwolken mehr abfließen. Der Objektträger wurde vollständig mit Safarilösung bedeckt und danach mit dest. H₂O 5 sec. abgespült. Nach dem Trocknen wurde der Objektträger unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Verunreinigungen durch grampositive Mikroorganismen waren durch die Blaufärbung der Zellen erkennbar. *A. actinomycetemcomitans* stellte sich als gramnegativer Keim rosa bis rot dar.

Herstellen der Schädler-Bouillon-Lösung

Schädler-Bouillon ist ein excellentes reihhaltiges flüssiges Medium, in dem anaerobe Pathogene sehr gut wachsen können (Stalons D.R. *et al.* 1974). Die durch das langsame Rühren und Erhitzen entstandene homogene Lösung (28,4 g Pulver in einem Liter dest. H₂O) wurde in 500 ml-Flaschen abgefüllt und 1 h bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurden die Flaschen bei Zimmertemperatur abgekühlt.

Vermehrung von *A. actinomycetemcomitans* in der Schädler-Bouillon-Lösung

A. actinomycetemcomitans-Kolonien wurden von nicht-kontaminierten Agarplatten in Schädler-Bouillon-Lösung überführt und bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen für 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte eine optische und lichtmikroskopische (Gramfärbung) Kontrolle.

Nicht-kontaminierte Flüssigkulturen wurden in einem 60 ml-Plastikröhrchen für 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Das Sediment mit *A. actinomycetemcomitans* wurde dreimal in PBS resuspendiert und jeweils für 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Das gewaschene Sediment wurde ebenfalls auf Reinheit mittels Gramfärbung überprüft. Die gewonnenen Bakterien wurden für weiteren Untersuchungen eingefroren.

3.2.3 Gewinnung der biotinylierten *A. actinomycetemcomitans* Lektine

Theoretische Grundlagen der Affinitätschromatographie

Biologische Makromoleküle binden häufig spezifisch an andere Substanzen (Liganden). Beispiele für solche Interaktionen sind Antikörper und Antigen, Enzym und Substrat oder Enzym und Co-Enzym. Die Eigenschaft der spezifischen Bindung wird in der Affinitätschromatografie genutzt (Holtzhauer 1996). Dazu wird einer der Bindungspartner kovalent und irreversibel an eine wasserunlösliche polymere Matrix gebunden. Diese mit Liganden beladene Matrix wird in eine Säule gefüllt, auf die nachfolgend ein Substanzgemisch gegeben wird, das die zu isolierende Komponente enthält. Während die Komponente mit hoher Spezifität an den immobilisierten Liganden bindet, passieren die anderen Bestandteile des Substanzgemisches die Säule ohne Bindung. Anschließend wird die Liganden-gebundene Komponente beispielsweise durch Veränderung des pH-Wertes, der Ionenstärke oder der Temperatur bzw. durch den Zusatz von Detergenzien (z. B. Harnstoff) eluiert.

Herstellung der Muzin-Sepharose™-Säule

Es kam eine Affinitätschromatographiematrix aus Muzin zur Anwendung, da eine Bindung der Bakterien an Proteoglykane häufig beschrieben wurde (Bhat *et al.* 1997, Piotrowski *et al.* 1992, Kage 2000). Als Säulenmaterial wurde Cyanbromid-aktivierte Sepharose™ 4B (140601) verwendet. Muzin wurde als Ligand für die OMP-Bindung auf die Säule geladen. Die intrazellulären Proteine passieren die Säule ohne eine Bindung an Muzin. Zunächst wurden 2 g Cyanbromid-aktivierte Sepharose™ 4B in 20 ml 1 mmol HCl aufgelöst und in eine Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 1 mmol HCl wurde die Säule mit 1 mmol HCl aufgefüllt und stehengelassen, bis die Sepharose™ sich abgesetzt hatte. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die Säule 5 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Danach wurde 0,1 M Natriumcarbonat (Na₂CO₃), pH 8,5 auf die Säule gegeben. Die Säule wurde erneut zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe des Muzins (20 mg/ml Gel) wurde die Säule auf 10 ml mit 0,1 M Natriumcarbonat (Na₂CO₃) und 0,1 M Natriumchlorid (NaCl) aufgefüllt. Die Säule wurde 1 h rollend inkubiert, um eine homogene Mischung zu erhalten. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde die Säule mit 0,2 M Glycin (pH 8,5) aufgefüllt, 1 h bei Raumtemperatur rollend inkubiert und erneut bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Die Säule wurde nochmals mit 0,2 M Glycin aufgefüllt. Eine Zugabe von 0,01 % Natriumazid (NaN₃) ermöglichte eine Aufbewahrung der Säule bis zu ihrem Einsatz.

Vorbereiten der Säule mit *A. actinomycetemcomitans*

Nach der Lyse und dem Einengen des Volumens wurde die Säule erneut im Ultrafilter gewaschen, indem sie vier Mal mit Tris-Phosphatpuffer (TPP) zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein Röhrchen überführt und mit TPP auf 2,5 ml aufgefüllt.

Es wurden zwei Säulen mit 1,7 ml oder 2 ml Sepharose™ angefertigt. Zu jeder Säule wurden gleiche TPP-Volumina gegeben. Das Eluat wurde abgelassen. Auf die Säule mit 1,7 ml Sepharose™ wurden 0,75 ml an lysierten *A. actinomycetemcomitans*-Proteinen gegeben zu der Säule mit 2 ml Sepharose™ 1 ml. Beide Säulen wurden über Nacht im Kühlschrank rollend inkubiert. Danach erfolgte die Biotinylierung, sowohl mit als auch ohne die Affinitätschromatografie.

3.2.4 Biotinylierung

Die OMP von *A. actinomycetemcomitans* wurden mit Biotin (EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin) markiert, das an Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin bindet. Die Peroxidase katalysiert eine Farbreaktion, die photometrisch erfasst werden kann. Die Affinitätschromatografie mit der Muzin-SepharoseTM-Säule wurde durchgeführt, um extra- und intrazelluläre Proteine zu trennen.

Die Biotinylierung erfolgte unter vier verschiedenen Bedingungen:

1. Biotinylierung vor der Zellyse (nur OMP)
2. Biotinylierung nach der Zellyse
 - a) Biotinylierung des Rohextraktes (vor der Affinitätschromatografie)
 - b) Biotinylierung des Extraktes auf der Säule (während der Affinitätschromatografie)
 - c) Biotinylierung des Eluats (nach der Affinitätschromatografie)

Biotinylierung vor der Zellyse

Aliquots von 20 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) bleiben bei -20 °C für mehrere Monate stabil. Die Aliquots wurden im Kühlschrank aufbewahrt. 1 ml *A. actinomycetemcomitans*-Suspension wurde mit 100 µl Biotin vermischt und auf 10 ml mit 50 mM Natriumcarbonat-(Na₂CO₃)-Puffer pH 8,5 aufgefüllt.

Das Gemisch wurde in einem Röhrchen auf Eis für 2 h inkubiert. Um überschüssiges Biotin zu entfernen, wurden der Ansatz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet mit den Zellen wurde durch einen Schüttler vom Boden des Röhrchens abgelöst und mit dest. H₂O dreimal gewaschen.

Im Anschluss wurden die biotinylierten *A. actinomycetemcomitans* Zellen aufgeschlossen. Zu den Zellen wurden 10 ml Lysepuffer gegeben, vermischt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz dreimal zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation mit den biotinylierten OMP wurde gesammelt.

Zur Abtrennung von weiteren Zellbestandteilen in dem Lysat wurde ein 10 kDa Filter (Filtron, Ausschlussgrenze 10 kDa, Millipore Ultrafree-MC Centrifugal Filter Units, 20 min bei 2000 g) verwendet. Aufgrund ihrer Größe von > 10 kDa wurden die OMP vom Filter zurückgehalten, während kleine Bestandteile passieren konnten. Der Filter wurde vor der Verwendung mit Ammoniumcarbonat (100 mg Ammoniumcarbonat in 10 ml dest. H₂O) äquilibriert. Zur Gewährleistung der Benetzung des Ultrafilters wurden die Ansätze 10 min rotiert. Das Ammoniumcarbonat wurde anschließend durch Lysepuffer ersetzt. Der

Ansatz wurde anschließend dreimal zentrifugiert und der Überstand jeweils aufgefangen. Zur Entfernung überschüssigen Biotins wurde der Ansatz dreimal mit dest. H₂O gewaschen. Dies wurde solange wiederholt, bis der Überstand auf 1 ml eingengt werden konnte. Der Überstand wurde mit 1 ml Glykol versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Biotinylierung des Rohextraktes (vor der Affinitätschromatografie)

Bei diesem Ansatz wurden die *A. actinomycetemcomitans* Bakterien zuerst lysiert (siehe oben). Anschließend wurde das Biotin (siehe oben) dem Ansatz hinzugefügt. Der Ansatz wurde im Ultrafilter zentrifugiert, gereinigt und eingengt. Der Überstand wurde mit 1 ml Glykol versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Biotinylierung während der Affinitätschromatografie

Die Säule wurde zuerst mit Natriumcarbonat-(Na₂CO₃) -Puffer gewaschen und anschließend mit 100 µl Biotin auf Eis mit Hilfe des Schüttlers vermischt. Der Biotinylierungsvorgang dauerte 2 h. Die Säule wurde anschließend sechsmal mit jeweils 1 ml Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde mit dem Ultrafilter auf 1 ml eingengt und nach viermaligem Waschen mit dest. H₂O gereinigt. Der Überstand wurde abschließend mit 1 ml Glykol versetzt und bei -20 °C aufbewahrt.

Biotinylierung nach der Affinitätschromatografie

Die Säule wurde mit TPP gewaschen und im Anschluss sechsmal mit jeweils 1 ml Elutionspuffer eluiert. Es folgte eine Reinigung und Einengung (auf 1 ml) des Eluats mit dem Ultrafilter in der Zentrifuge.

Der Überstand wurde in 10 ml Natriumcarbonat (Na₂CO₃) pH 7,5 gelöst. Nach Zugabe von 100 µl Biotin wurde der Ansatz 2 h auf Eis inkubiert. Zur Entfernung überschüssigen Biotins wurde der Ansatz mit dest. H₂O im Ultrafilter zentrifugiert. Nach dem Einengen auf 1 ml wurde er mit 1 ml Glykol versetzt und bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.5 Gewinnung und Fraktionierung der Oligosaccharid-Fractionen

Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung in den Lektinbindungs-Inhibitionstest eingesetzten Oligosaccharide stammen aus der Molke (Glykokonjugat II). Molke wurde ausgewählt, da sie anders als Speichel bzw. Muzin in großen Mengen und leicht erhältlich

ist. Die Fraktionierung des Oligosaccharid-Gemisches erfolgte mittels HPLC. Hierzu wurde das Oligosaccharid-Gemisch hydrolysiert und im Anschluss fraktioniert.

Fraktionierung mittels *high performance liquid chromatography (HPLC)*

Das bei der Hydrolyse erhaltene Gemisch von Glykanen wurde präparativ mittels HPLC aufgetrennt. Die Fraktionierung erfolgte auf einer Dionex-Anlage.

Theoretische Grundlagen: Bei der HPLC handelt es sich um eine Säulen-Flüssigkeits-Chromatografie. In diesem Trennverfahren wird die Probenflüssigkeit unter hohem Druck über eine flüssige Phase (Eluent) in die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert. Die Säulen-Flüssigkeits-Chromatografie nutzt verschiedene Trennprinzipien (Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Ausschluss- und Affinitätschromatografie).

Eine HPLC entspricht meist einer Adsorptions- und die Verteilungs-Chromatografie. Bei der Adsorptionschromatografie werden die Probenmoleküle über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen reversibel an die stationäre Phase gebunden. Die Retentionszeit der Substanzen hängt von der Stärke dieser Wechselwirkung ab. Probesubstanzen mit unterschiedlich starken Wechselwirkungen lassen sich dadurch voneinander trennen. Bei der Verteilungschromatografie wird die individuelle Löslichkeit der Substanzen in den beiden Phasen genutzt. Bei der Normalphasen-Verteilungschromatografie ist die stationäre Phase polarer, bei der *Reversed-Phase*-Chromatografie die mobile Phase. Die *Reversed-Phase*-Chromatografie findet überwiegend bei der Auftrennung von unpolaren oder nur wenig polaren Substanzen Anwendung.

Bei der HPLC lassen sich zwei Arbeitsweisen unterscheiden. Bei dem isokratischen Verfahren bleibt die flüssige Phase in ihrer Zusammensetzung und Fließstärke während des gesamten Trennvorgangs konstant. Bei der Gradientenelution variiert die Zusammensetzung des Eluenten und die Fließmittelstärke kann gesteigert werden.

Ein HPLC-System besteht aus einer Pumpe, einem Einspritzsystem, einer Trennsäule und einem Detektor mit Auswertsystem. Durch die Verwendung von Trennpartikel mit Korngrößen von 3–10 µm lassen sich vergleichsweise hohe Trennstufenzahlen erreichen, andererseits muss aber ein relativ hoher Gegendruck erzeugt werden, um die mobile Phase durch die schmale Trennsäule (2–6 mm Durchmesser) zu transportieren. Deshalb müssen alle Teile des HPLC-Geräts ohne Totvolumen miteinander verbunden und bis ca. 300 bar druckstabil sein.

Die Probenapplikation erfolgt über eine drucklose Injektion der Probe in eine Probenschleife mit einem Vier-Wege-Ventil. Durch Umschalten des Elutionsmittelstroms

durch die Probenschleife gelangt die Probe auf die Säule. Die analytische Trennsäule besteht zumeist aus thermostabilem Edelstahl. Für die Detektion werden UV/VIS-, Fluoreszenz-Spektrometer, RI-amperometrische und Leitfähigkeits-Detektoren mit Durchflusszellen verwendet.

Stationäre und mobile Phase: Im vorliegenden Versuch bestand die stationäre Phase aus einer Säule mit porösem Graphit (PGC). Die Elutionskraft der mobilen Phase sollte während der Elution zunehmen.

Zucker lassen sich mittels optischer Methoden (z. B. UV, Fluoreszenz, Brechindex) in der HPLC nicht mit ausreichender Genauigkeit detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Variante der elektrochemischen Detektion genutzt. Bei der gepulsten Amperometrie liegt an den Elektroden der Durchflusszelle keine konstante Spannung an.

Die gepulste Amperometrie wird als Detektionsverfahren für Kohlenhydrate, Aldehyde, Amine, und Substanzen mit Thiol-(SH)-Gruppen eingesetzt. Das Prinzip basiert auf einer schnellen Änderung des Potentials an der Goldelektrode. Das Signal resultiert aus der Integration des Stroms über eine festgelegte Zeit. Der über eine bestimmte Zeit integrierte Strom wird als Ladung (Coulomb) bezeichnet. Die ermittelte Ladung wird in einem Additionsverstärker bis zu nächster Messung gespeichert.

Nach Anlage eines Messpotentials wird der Stromfluss über eine definierte Zeit gemessen. Die ermittelte Ladung ist proportional zur Menge an detektierbaren Substanzen. Durch die Reaktion können sich Reduktionsprodukte auf der Oberfläche der Elektroden ablagern. Dies lässt sich durch kurzzeitige, wechselnde, stark positive und negative Potentialfolgen verhindern, wodurch die aktive Oberfläche der Arbeitselektroden erhalten bleibt. Durch die Pulse wird das Messpotential erneut eingestellt, um die Elektroden für die nächste Messung zu äquilibrieren.

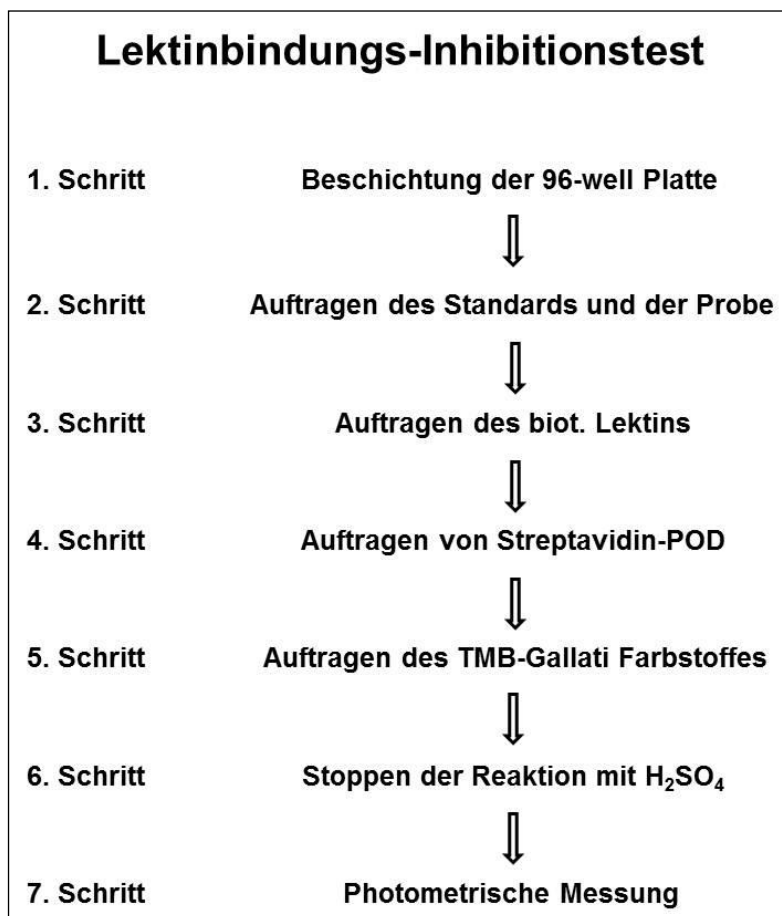
Zucker lassen sich mit dieser Methode in stark alkalischem Milieu (pH 14) oxidieren. Die Hydroxyl-(OH)-Gruppen liegen zum Teil deprotoniert vor, so dass eine Umsetzung möglich ist. Die Natronlauge (10 N) wird nach der Säule über eine separate Pumpe zudosiert (0,5 ml/min).

Fraktionssammler: Die Oxidation der Glykane und Glykoproteine bei der gepulsten Amperometrie führt zu einer Zerstörung der Zucker und verhindert somit die weitere Analyse der gesammelten Fraktionen mit dem Lektinbindung-Inhibitionstest. Aus diesem Grund wurde der Detektor entfernt und die Zudosierung von Natriumhydroxid (NaOH) unterbrochen.

Alle 2 min wurden Fraktionen aufgefangen. Das Eluat der ersten 5 min wurde verworfen, da zu dieser Zeit Mono- und Disaccharide eluieren, die nicht von Interesse waren. Die Fraktionen wurden unter vermindertem Druck bei 20 mbar und 40° C schonend getrocknet. Das Lyophilisat wurde bei -20° C eingefroren.

3.2.6 Lektinbindungs-Inhibitionstest

Abbildung 13 zeigt das schematische Vorgehen beim Lektinbindungs-Inhibitionstest.



H₂SO₄ = Schwefelsäure, POD = Peroxidase, TMB = Tetramethylbenzidin

Abb. 13: Schematischer Versuchsablauf des Lektinbindungs-Inhibitionstests

Prinzip

Die Charakterisierung der biologischen Eigenschaften der Glykane in den Fraktionen erfolgte mit Hilfe des kompetitiven „Lektinbindungs-Inhibitionstests“ nach Kage *et al.* (1989). Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass die spezifische Bindung eines biotinylierten Lektins an den Glykananteil eines Festphasen-adsorbierten Moleküls durch den Zusatz des löslichen Glykans verhindert werden kann.

Das Biotin-markierte Lektin kann an ein mit Peroxidase gekoppeltes Streptavidin binden. Die Peroxidase katalysiert eine Farbreaktion. Das lösliche und farblose chromogene 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin wird durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Dieser disproportioniert in Säuren (Schwefelsäure $pH < 1$) zu einem gelben, stabilen, gut quantifizierbaren Farbstoff. Die photometrisch ermittelte Farbintensität ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Lektins.

Analyse der Bindungsaffinität zwischen dem Muzin und dem *A. actinomycetemcomitans*-Lektin

Zur Analyse des Bindungsverhaltens der Polysaccharid-Fractionen an *A. actinomycetemcomitans*-Lektine wurde zunächst die Bindung des Muzins an die isolierten Lektine überprüft, da die Beschichtung der Mikrotiter-Platte später mit dem Muzin erfolgte. Hierfür wurden die Mikrotiter-Platten mit einem Glykoprotein, das an Lektine bindet (Standard), oder mit dem Muzin in unterschiedlichen Verdünnungen beschichtet.

Bindung des vor der Zellyse biotinylierten Lektins

Vier Reihen wurden mit Muzin in einer Konzentration von $35 \mu g/ml$ in PBS (1:10) beschichtet. Pro *Well* wurden $100 \mu l$ pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur wurde die Platte durch einen Waschautomaten dreimal mit Tris-Waschpuffer (TWP) gewaschen. Die Verdünnung des Isolats erfolgte in TPP 1:3. In jedes *Well* wurden $75 \mu l$ Isolat mit entweder $25 \mu l$ Muzin oder $25 \mu l$ TPP gegeben. Die Platte wurde 30 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit TWP gewaschen und gut auf einem saugfähigen Tuch abgeklopft, um eventuelle Pufferrückstände zu beseitigen. Pro *Well* wurden $100 \mu l$ Streptavidin-Peroxidase (1:20000) zugegeben. Die Ansätze wurden eine 1 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TWP wurden $110 \mu l$ des chromogenen Substrats Tetramethylbenzidin-(TMB) -Galatti (1:100) zu jedem *Well* gegeben und im Dunkeln inkubiert, bis sich in den *Wells* eine abgestufte Blaufärbung einstellte. Mit $25 \mu l$ 4 N Schwefelsäure- (H_2SO_4) -Lösung wurde die enzymatisch katalysierte Farbreaktion gestoppt. Die Stärke der Farbreaktion war proportional zur Menge des Lektins, das an die mit Muzin beschichtete Mikrotiter-Platte gebunden hatte. Je nach der Bindungsaffinität des Lektins zum Muzin wurde die Verdünnung des Lektins für die folgenden Untersuchungen angepasst.

Bindung der biotinylierten Lektine nach Zellyse

Das erhaltene Isolat des Rohextraktes war deutlich konzentrierter als bei den anderen Ansätzen, da hier alle Lektine biotinyliert waren. Das Isolat wurde daher 1:10 verdünnt. Die Isolate der während und nach der Affinitätschromatografie biotinylierten Lektine waren geringer konzentriert und wurden deshalb nicht verdünnt.

Tab. 1: Schematische Darstellung der Aufteilung einer Mikrotiter-Platte beim Lektinbindungs-Inhibitionstest

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	MB	MB	1:10		Probe 3	Probe 5	Probe 7	Probe 9	Probe 2	Probe 4	Probe 6	Probe 8	Probe 10
B	Standard 1:3		1:100										
C	Standard 1:3		1:1000										
D	Standard 1:3		1:100000										
E	Standard 1:3		Probe 2		Probe 4	Probe 6	Probe 8	Probe 10					
F	Kontrolle (unverd.)												
G	LW	LW											
H	LW	LW											

Jede Probe wurde in vier Verdünnungen gemessen und jede Verdünnung als Doppelmessung in zwei Wells. LW = Leerwert (Probenpuffer, Negativkontrolle), MB = maximale Bindung (Positivkontrolle)

Praktisches Vorgehen

Die Konzentrationsbestimmung der Oligosaccharide bzw. die optische Dichte durch die Bindung von Oligosaccharidfraktionen zu den *A. actinomycescomitans*-Lektinen erfolgte auf 96-Well Mikrotiter-Platten. Auf einer Platte wurden Doppelmessungen von maximal 10 Proben durchgeführt. Zusätzlich wurde für jede Platte eine Standardkurve mit einer Kontrollprobe (unverdünnt) erstellt, die der internen Qualitätskontrolle diente (s. Tabelle 1).

Mit dem Lektinbindungs-Inhibitionstest wurde die Bindungsfähigkeit der 200 Oligosaccharid-Fractionen der HPLC an *A. actinomycescomitans*-Lektine untersucht und die Fraktion mit der stärksten Bindungsaffinität identifiziert.

Der Test wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte mit Doppelmessungen der Oligosaccharid-Fractionen in verschiedenen Verdünnungen durchgeführt. Der bekannte Lektin-Rezeptor ist an ein Glykoprotein (Muzin) gebunden. Die Mikrotiter-Platte wurde mit diesem beschichtet. Das Glykoprotein wurde mit den Oligosaccharid-Fractionen sowie dem Biotin-markierten Lektin inkubiert. Im Anschluss wurde Streptavidin-Peroxidase zum Ansatz gegeben, die an das Biotin bindet und eine Farbreaktion katalysiert, worüber das gebundene Lektin photometrisch bestimmt wurde. Für einen Vergleich wurde eine Standardlösung des Glykoproteins hergestellt, das als Rezeptor bekannt ist.

Jede Platte wurde mit ungewaschenem medac Muzin (110401) beschichtet. Vorher wurde das Muzin mit *Coating*-Puffer (0,1 M Natriumcarbonat (Na_2CO_3)) 1:10 verdünnt. Pro *Well* wurden 100 μl eingebracht und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit TWP durch einen Waschautomaten wurde für jede Platte eine Standardreihe erstellt. Für die Standardreihe wurde Muzin als Verdrängungs-Kohlenhydrat verwendet. In den *Wells* B-E (siehe Tabelle 1) wurde der Standard 1:3 mit TPP verdünnt. In das *Well* F wurde unverdünntes Muzin pipettiert. Im *Well* A fand eine maximale Lektinbindung statt, da hier kein gewaschenes Muzin hinzugegeben wurde. Die *Wells* H und G waren TPP-Leerwerte ohne Zugabe von Lektin und gewaschenem Muzin. Jede Oligosaccharid-Fraktion wurde in 300 μl bidestilliertem H_2O aufgelöst. Jeweils 25 μl wurden in die *Wells* pipettiert.

Da die Bindungsaffinität unbekannt war, wurden die Oligosaccharid-Fractionen zunächst unverdünnt in den Test eingesetzt. Die Platten wurden 30 min auf einem Schüttler bei 200 U/min und anschließend über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten durch den Waschautomaten mit TWP gewaschen und danach gut ausgeklopft, um sie von Pufferrückständen zu befreien.

Die Lektin-Verdünnung erfolgte 1:10 mit TPP; in jedes *Well* wurden 75 μl eingebracht. Danach schloss sich eine Inkubationsphase von 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (ca. 200 U/min) an, anschließend wurden die Platten über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden sie erneut dreimal gewaschen. Pro *Well* wurden 100 μl Streptavidin-Peroxidase (1:10000) hinzugefügt, 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und im Anschluss vier Mal im Waschautomaten gewaschen. Es folgte die Zugabe von 110 μl Tetramethylbenzidin-(TMB) -Gallati mit einer 1:100-Verdünnung zu jedem *Well* und die Inkubation der Platten in der Dunkelheit.

Der enzymatische Farbumschlag wurde mittels 50 µl einer 4 N Schwefelsäure-(H₂SO₄) - Lösung gestoppt. Die Gelbfärbung wurde photometrisch gemessen. Die Stärke der Färbung variierte in Abhängigkeit von der Bindungsstärke der Oligosaccharid-Fraktionen an die Lektine von *A. actinomycescomitans*. Fraktionen mit einer hohen Affinität zu dem Lektin verhinderten die Bindung des Lektins an den Kohlenhydrat-Anteil der mit Muzin beschichteten Platte besser als Fraktionen mit niedrigeren Affinitäten. In welcher Konzentration das gebundene Lektin in der Probe vorlag, wird als % des geläufigen Standards angegeben.

Bei den meisten unverdünnten Proben ließ sich aufgrund der hohen Konzentrationen keine abgestufte Blaufärbung erkennen. Daher wurde der Versuch mit verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:100000 bzw. 1:100000) wiederholt, bis eine abgestufte Blaufärbung zu erkennen war.

3.2.7 Quantitative Proteinanalyse

Um die Proteinkonzentration in den Proben zu ermitteln, wurde eine quantitative Proteinanalyse mit dem Bichonin-(BCA)-Reagenz durchgeführt.

Beim Durchtritt einer elektromagnetischen Strahlung (Licht) durch eine Lösung absorbieren die Moleküle in bestimmten Wellenlängenbereichen einen Teil der Strahlung. Die Absorptionsintensität einer Substanz bei einer Wellenlänge λ wird durch die Extinktion E gemessen, die als dekadischer Logarithmus des Verhältnisses der Intensität von eintretendem monochromatischem Licht (I) definiert ist.

Dem Lambert-Beerschen-Gesetz zufolge ist die Extinktion (E) der durchstrahlten Schichtdicke (d) und der molaren Konzentration (c) der absorbierenden Substanz direkt proportional.

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

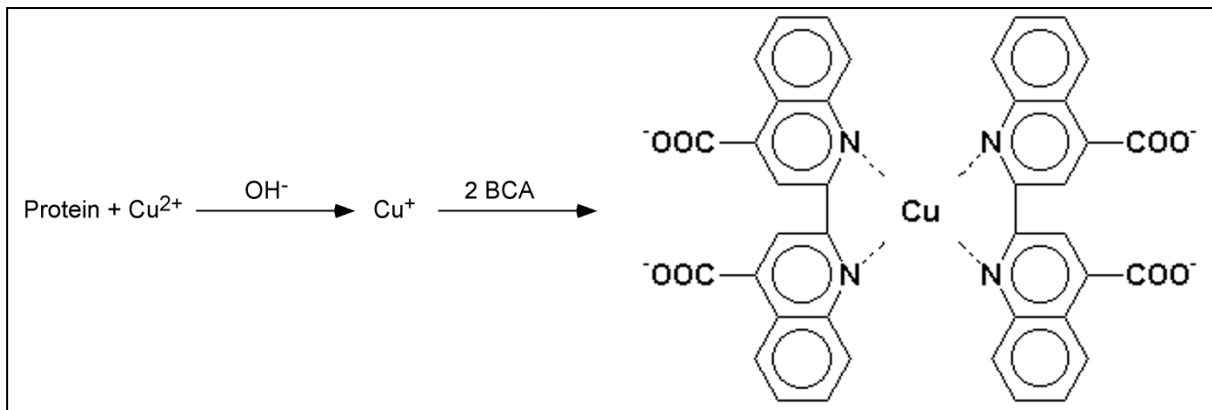
Der Extinktionskoeffizient ε ist bei einer festgelegten Wellenlänge eine stoffspezifische Konstante. Bei bekanntem Extinktionskoeffizient und konstanter Schichtdicke (in der Regel die Schichtdicke der Küvette) kann über die Messung der Extinktion die Konzentration des Stoffes bestimmt werden.

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

Aus dieser Gleichung wird deutlich, dass die Konzentration und die Extinktion in einer linearen Beziehung zueinanderstehen.

Messung der Proteinkonzentration mit dem Bichonin-(BCA)-Reagenz

Das alkalische Reagenz A hat einen pH-Wert von 12. Bei diesem pH-Wert sind alle Proteine negativ geladen und reduzieren Kupfer-III (in Reagenz B enthalten) zu Kupfer-II. Dieses bildet einen nicht löslichen (lila) Farbkomplex mit BCA (in Reagenz B enthalten). Die zugrundeliegende chemische Reaktion ist in Abbildung 14 dargestellt.



Die Proteine werden in einer alkalischen Lösung verdünnt (Reagenz A). Durch Zugabe von BCA und Kupferionen (Reagenz B) bildet sich ein lilafarbener Komplex. Je stärker die photometrisch bestimmbare Färbung, desto höher die Proteinkonzentration (Lottspeich and Engels 2006).

Abb. 14: Komplexbildung und Reduktion von Kupferionen bei der Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bichonin-(BCA)-Reagenz

Die Proteinkonzentration ist proportional zur Anzahl der reduzierten Kupferionen und gebildeten BCA-Komplexe und zur Färbung der Lösung.

Reagenz B und Reagenz A wurden im Verhältnis 1:50 gemischt. In jedes *Well* wurden 200 μl dieser Mischung pipettiert. Anschließend wurden die Platten mit Folien abgeklebt und auf einem Rüttler für 30 s inkubiert

Durchführung für Standardreihe

Die Standardreihe wurde mit dem Albumin Standard (2 mg Albumin/ml dest. H_2O) aus dem *BCA-Kit* hergestellt. Der Leerwert entsprach dem Lösungsmittel, in diesem Fall dest. H_2O . Pro *Well* wurden 25 μl Volumen pipettiert (s. Tabelle 2).

Tab. 1: Verdünnungsschema für die Standardreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bichonin-(BCA)-Reagenz

<i>Well</i>	H_2O [μl]	Bichonin (BCA) [μl]	Proteinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$)
A	0	100 aus Stammlösung	2000
B	75	225 aus Stammlösung	1500

C	200	200 aus Stammlösung	1000
D	100	100 aus B	750
E	100	100 aus C	500
F	100	100 aus E	250
G	100	100 aus F	125
H	400	100 aus G	25

Da die Proteinkonzentration in den Proben unbekannt war, wurden von den Proben ebenfalls Verdünnungsreihen erstellt. Die Proben wurden mit demselben Lösungsmittel wie die Standardreihen (dest. H₂O) verdünnt. Die nachfolgende Tabelle 3 zeigt die Erstellung der Verdünnungsreihe, pro *Well* wurden wiederum 25 µl Volumen pipettiert.

Tab. 2: Verdünnungsreihe und Pipettierschema für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben

<i>Well</i>	Verdünnung	Vorherige Verdünnung [µl]	dest. H ₂ O [µl]
A	1:1	50	0
B	1:5	10	40
C	1:25	10	40
D	1:125	10	40
E	1:625	10	40
F	1:3125	10	40
G	1:15625	10	40
H	1:78125	10	40

Die Platte wurde 120 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Farbumschlag von grünblau nach lila wurde die Proteinkonzentration am Tecan ultra 348 bei 690 nm gemessen.

3.2.8 Qualitative Proteinanalyse

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein analytisches Verfahren zur Bestimmung der molekularen Massen von Proteinen in einer Lösung. Natriumdodecylsulfat überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass ihre elektrophoretische Beweglichkeit proportional zu ihrer molekularen Masse ist. Proteine

mit geringer molekularer Masse durchwandern das Gel schneller als Proteine mit größerer molekularer Masse.

Um die molekulare Masse bestimmen zu können, wird ein Größenstandard aus einem standardisierten Proteingemisch mit bekannten molekularen Massen verwendet. Anhand der Banden des Größenstandards kann die molekulare Masse der zu untersuchenden Proteine ermittelt werden.

Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde ein 4–12 %iges Tris-Glycin-Gel mit einer Dicke von 1 mm und zehn Taschen verwendet. Die fertige Gekassette wurde aus der Verpackung entnommen und mit deionisiertem H₂O abgespült. Nach Ablösen der Folie vom Boden der Kassette und Entfernung des Kamms wurde das Gel nach Gebrauchsanweisung in die Elektrophoresekammer platziert. Die Taschen wurden vorsichtig mit Laufpuffer gefüllt, um Luftblasen zu vermeiden.

Als Proben wurden das biotinylierte Rohextrakt sowie die biotinylierten Isolate der Affinitätschromatografie verwendet (vgl. Abschnitt 3.2.3, s. Tabelle 4). Für Gel 1 wurden alle Proben 1:5 mit Probenpuffer verdünnt (20 µl Probe + 80 µl Probenpuffer). Für Gel 2 wurden alle Proben 1:10 mit Probenpuffer verdünnt (10 µl Probe + 90 µl Probenpuffer). Die mit Probenpuffer versetzten Proben wurden 2 min bei 85 °C inkubiert. Nach der Abkühlung bei Zimmertemperatur wurden 1 ml 2,6 mM Dithiothreitol (DTT) zu 100 µl denaturierter Probe zugefügt.

Tab. 3: Auftragungsschema des Acrylamidgels

	Spuren											
Gel 1	Frei	1	2	3	4	M	5	6	7	frei	frei	frei
Gel 2	Frei	M	1	2	3	4	5	6	7	frei	frei	frei

M = Multimark Multi-colored Standard (Größenstandard)

Von den inkubierten Proben wurden jeweils 20 µl in die Taschen pipettiert. Von dem Größenstandard wurden 4 µl aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x Laufpuffer gefüllt (200 ml in die untere Kammer und 600 ml in die obere Kammer). Danach wurde die Kammer geschlossen und der Lauf gestartet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung bei 110 V.

Die Laufzeit betrug ca. 2 h und wurde beendet, als das Bromphenolblau den unteren Rand des Gels fast erreicht hatte. Danach wurde das Gel vorsichtig aus der Kammer entnommen und aus der Halterung gelöst.

Silberfärbung

Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde mittels Silberfärbung angefärbt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Silberreagenz wurde in 1 l dest. H₂O gelöst. Der Entwickler wurde direkt vor dem Gebrauch hergestellt: 1 Tüte Entwickler 1 wurde mit 15 mg Entwickler 2 in 200 ml dest. H₂O gelöst.

Das Gel wurde 1 h in 200 ml Fixierlösung (30 % Ethanol, 10 % Eisessig, 60 % dest. H₂O) inkubiert. Die Fixierlösung wurde entfernt, indem das Gel in eine frische 30 %ige Ethanol-Lösung überführt wurde. Zur Entfernung der Ethanol-Lösung wurde das Gel für 10 min in frisches H₂O gelegt. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Unmittelbar vor dem Färben wurden 0,7 ml einer 37 %igen Formaldehydlösung zu 200 ml Färbelösung hinzugegeben. In dieser Lösung wurde das Gel 30–40 min inkubiert. Nach Entfernung der Farblösung wurde das Gel für 30–60 s unter einem Wasserstrahl gewaschen. Unmittelbar vor dem Entwickeln wurden 0,7 ml 37 %ige Formaldehydlösung zu 200 ml Entwicklerlösung hinzugegeben. Das Gel wurde für 10 min in dieser Lösung geschwenkt. Die Reaktion wurde mit 200 ml 7,5 %iger Eisessiglösung gestoppt.

Das Gel wurde mit einer Digitalkamera fotografiert. Anhand des Größenstandards wurde das Molekulargewicht (in kDa) der Probenbanden bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1 Anzucht von *A. actinomycescomitans*

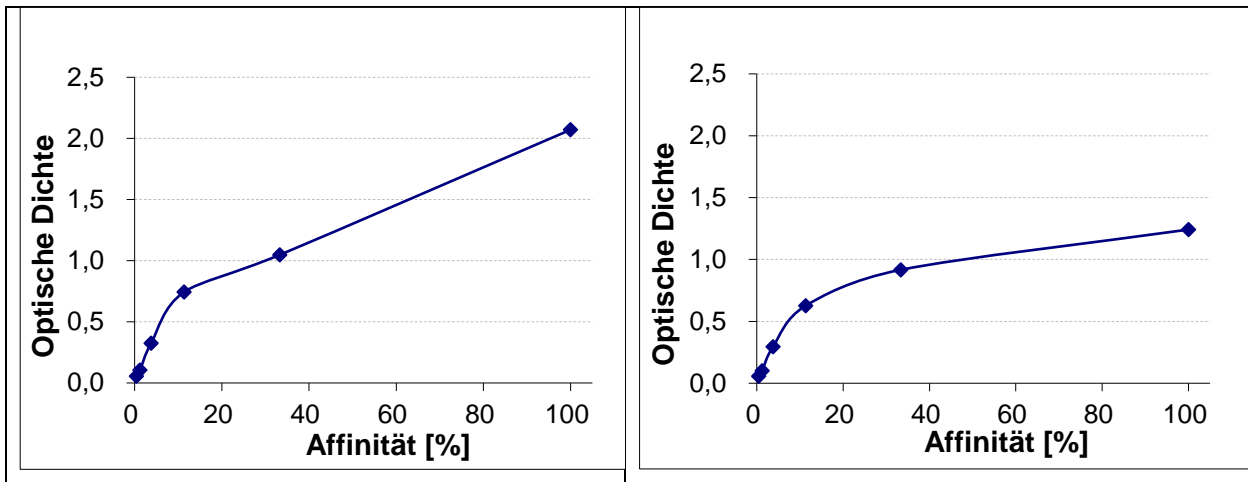
Über die Kultivierung von *A. actinomycescomitans* wurden 10 g Zellmaterial gewonnen. Durch die Gramfärbung konnte eine Kontamination mit grampositiven Keimen ausgeschlossen. Das gesammelte Zellmaterial wurde für die späteren Analysen eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

4.2 Auswahl der *A. actinomycescomitans* Lektin-Präparation für den Lektinbindungs-Inhibitionstest

Da Muzin zum Beschichten der Mikrotiter-Platten verwendet wurde, musste zunächst dessen Bindung zu den *A. actinomycescomitans* Lektinen untersucht. Die Lektine wurden durch unterschiedliche Methoden biotinyliert und extrahiert (s. Kapitel 3.2.4). Anschließend wurden die Bindung der Lektine zum Muzin mit dem Lektinbindungs-Inhibitionstest untersucht. Mit diesem Verfahren sollte die Präparationsmethode ermittelt werden, die für die Vorbereitung der *A. actinomycescomitans* Lektine für den Lektinbindungs-Inhibitionstest am besten geeignet ist.

4.2.1 Lektinbindung vom Rohextrakt zum Muzin

Die Beschichtung der Mikrotiter-Platte erfolgte mit ungewaschenem Muzin. Anschließend wurde das Rohextrakt mit den *A. actinomycescomitans* Lektinen hinzugefügt. Zu den Ansätzen wurde 25 µl TPP bzw. 25 µl gewaschenes Muzin (s. Abbildung 15) gegeben, um die Bindung der Lektine an die Mikrotiter-Platte vergleichen zu können (s. Abbildung 16). Die photometrische Messung erfolgte direkt nach dem Sichtbarwerden einer abgestuften Farbentwicklung und dem Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure (H₂SO₄).



Links: Zugabe von 25 µl Tris-Probenpuffer (TPP); rechts: Zugabe von 25 µl gewaschenem Muzin
Die einzelnen Punkte stellen die einzelnen Verdünnungen dar.

Abb. 15: Affinität des Lektins zum ungewaschenen Muzin

Um eine bessere Aussage zum Vergleich beider Kurven zu erhalten, wurden sie in einer Grafik (s. Abbildung 16) zusammengefasst.

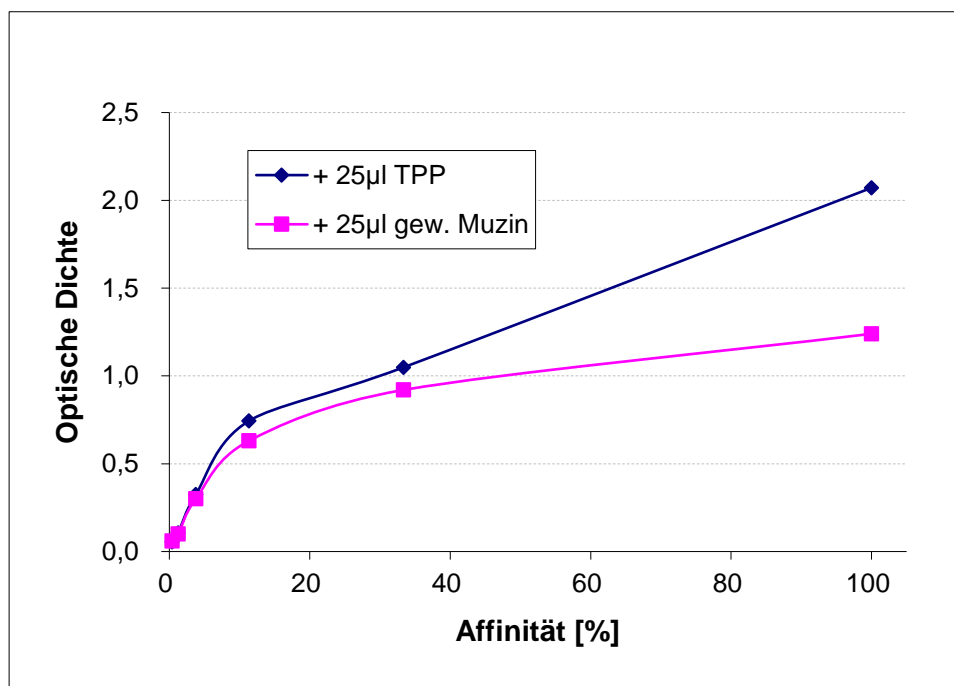


Abb. 16: Vergleich der Affinitäten vom Lektin zum Muzin bei Zugabe von Tris-Probenpuffer (TPP, blau) und gewaschenem Muzin (rosa)

Die Kurven zeigen, dass die Bindung vom Lektin stärker ist als zu TPP.

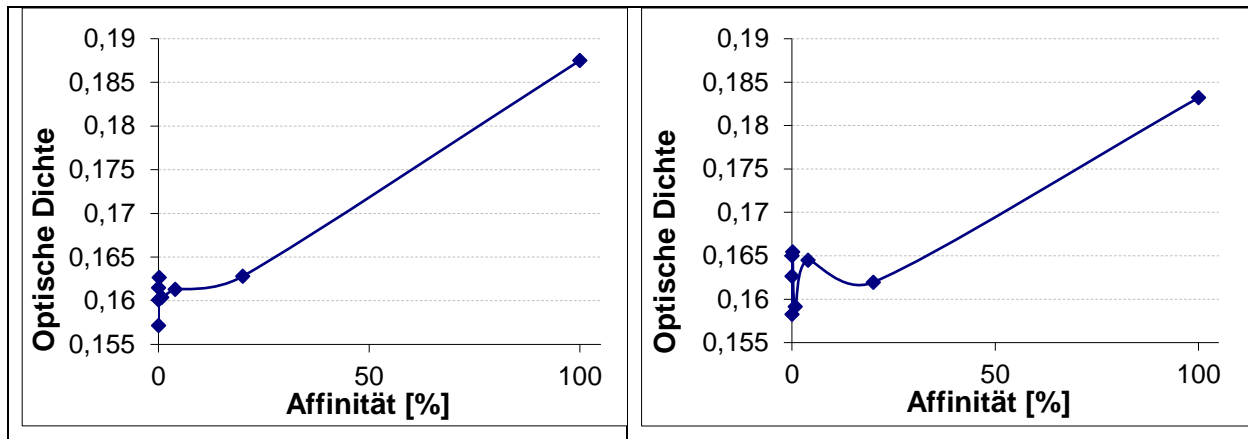
Basierend auf den Ergebnissen dieses Testes wurde die Verdünnung der Lektin-Präparation aus *A. actinomycetemcomitans* für die folgenden Untersuchungen festgelegt.

Die Kurven zeigen, dass die Bindung bei einer Verdünnung von 1:10 am stärksten war.

Somit wurde diese Verdünnung für die nachfolgenden Analysen verwendet.

4.2.2 Lektinbindungs-Inhibitionstest der Isolate während bzw. nach der Affinitätschromatografie

Die während und nach der Affinitätschromatografie biotinylierten Isolate hatten eine geringere Konzentration im Vergleich zum Rohextrakt. Deshalb wurde bei diesen Proben während des Lektinbindungs-Inhibitionstests auf eine Verdünnung verzichtet. In Abbildung 17 werden die unterschiedlich hergestellten biotinylierten Isolate verglichen.



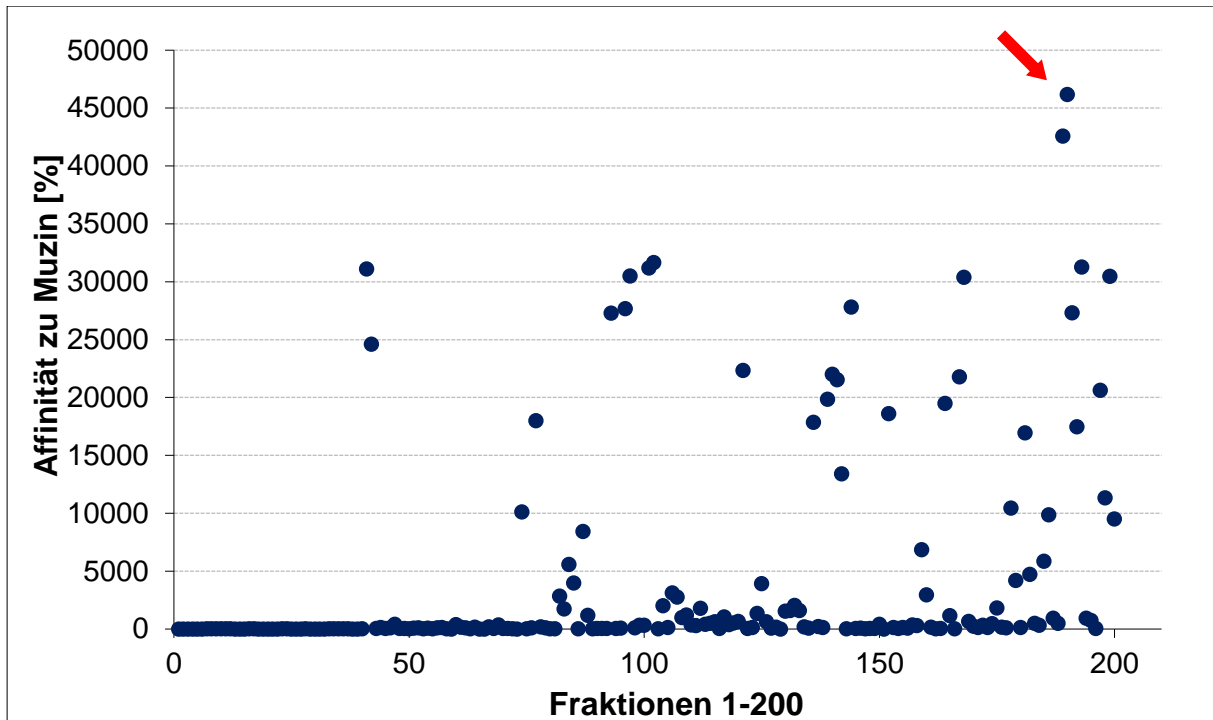
Hier wurden keine Verdünnungen verwendet, da die Lektin-Konzentration in den Isolaten zu gering war.

Abb. 17: Bindungsaffinität des während (links) bzw. nach (rechts) der Affinitätschromatografie biotinylierten Isolats

Die Kurven in Abbildung 16 zeigten im Vergleich zu den Kurven zu Abbildungen 14 und 15 eine geringere optische Dichte. Dies bestätigte die Annahme, dass im Rohextrakt eine höhere Lektin-Konzentration vorlag. Für die Analyse der Bindung des *A. actinomycescomitans*-Lektins an die Oligosaccharid-Fractionen wurde daher das Rohextrakt verwendet.

4.3 Bindung des Rohextraktes aus *A. actinomycescomitans* an die Oligosaccharid-Fractionen

Der Test wurde mit verschiedenen Verdünnungen der Oligosaccharid-Fractionen aus der Molke durchgeführt. Da die Affinität der einzelnen Fractionen zu den Lektinen aus *A. actinomycescomitans* unbekannt war, wurde der Test zunächst ohne Probenverdünnung durchgeführt. Verschiedene unverdünnte Oligosaccharid-Fractionen zeigten eine Affinität zu den Lektinen.



Die Probe 190 (gekennzeichnet mit rotem Pfeil) ist die Probe mit der stärksten Affinität.

Abb. 18: Affinität der 200 Oligosaccharid-Fraktionen in % zu den biotinylierten Lektinen aus dem Rohextrakt von *A. actinomycescomitans*

In Abhängigkeit von der Stärke der Affinität wurden die Oligosaccharid-Fraktionen 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 etc. verdünnt, um ihre Affinität eindeutig bestimmen zu können. Eine tabellarische Übersicht über die gemessenen Affinitäten ist in Tabelle 5 aufgeführt. Die Proben in der Tabelle wurden in eine Konzentrationskurve übertragen.

Die am stärksten verdünnten Proben besaßen die größte Affinität zu den *A. actinomycescomitans* Lektinen. Aus der Tabelle 5 und der Abbildung 18 wird ersichtlich, dass die Probe 190 (mit rotem Pfeil markiert) die größte Affinität zum Lektin hat. Die Proben 189, 193, 97, 199, 101, 102, 41, 168, 144, 96, 144, 191, 42, 167, 197, 140, 141, 139, 164, 192 und 181 zeigten ebenfalls hohe Affinitäten. Diese Oligosaccharid-Fraktionen sind damit für die weitere Forschung von großer Bedeutung.

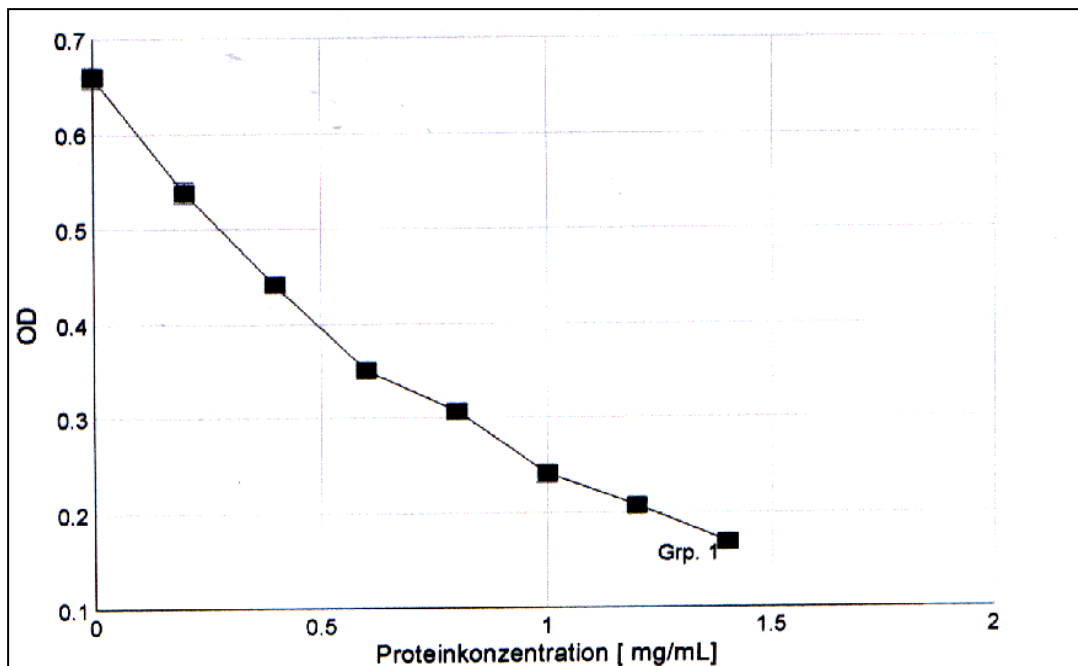
Tab. 5: Übersicht Bindungsaffinität

Fraktion	Bindungsaffinität	Fraktion	Bindungsaffinität	Fraktion	Bindungsaffinität
1	0,5166425	67	173,2	133	1594,38
2	1,1440155	68	38	134	183,7
3	0,7111595	69	359	135	82,135
4	0,105984	70	48,9	136	17850
5	3,02595	71	33,7	137	219,38
6	0,0963655	72	27,656	138	140,82
7	10,077385	73	0,56	139	19835
8	14,8075	74	10123	140	21990
9	29,765	75	20,081	141	21535,5
10	8,5478	76	95,07	142	13413
11	9,9281	77	17984	143	5,11
12	5,7497	78	176,22	144	27797
13	2,31815	79	103,99	145	35,33
14	2,37445	80	25,99	146	74
15	4,318925	81	26,628	147	13,2
16	5,97095	82	2842,95	148	47
17	5,97115	83	1732,9	149	35
18	2,1146	84	5584,7	150	409,8
19	1,33796	85	3976,7	151	0,0336
20	1,839785	86	29,0755	152	18607
21	0,837005	87	8432,1	153	121
22	1,65145	88	1173,3	154	35
23	7,0904	89	29,758	155	123
24	10,0252	90	54,84	156	75
25	4,9263	91	58,8405	157	350
26	3,6157	92	35,7658	158	288,9
27	1,3369	93	27278	159	6855,265
28	10,169	94	58,914	160	2962,7
29	1,3967	95	69,214	161	149,7
30	1,3156	96	27666	162	15,606
31	4,5517	97	30491	163	51,67
32	4,6058	98	100,57	164	19498,5
33	6,6048	99	335,85	165	1166,1
34	6,45935	100	314,89	166	29,652
35	8,878745	101	31183	167	21778
36	5,2824	102	31651	168	30378
37	5,79835	103	19,495	169	644,16
38	4,6628	104	2011,5	170	233,9
39	4,9753	105	132,547	171	130,589
40	19,1215	106	3128,1	172	318,74
41	31087	107	2753,15	173	139,32
42	24613	108	994,6	174	453
43	41,95	109	1217	175	1818,5
44	140,53	110	346,42	176	168,83
45	50,16	111	307,2	177	108,69

Fraktion	Bindungsaffinität	Fraktion	Bindungsaffinität	Fraktion	Bindungsaffinität
46	107,3	112	1800,7	178	10433,3
47	417,8	113	392,9	179	4206,6
48	51,2	114	490,3	180	141,36
49	45,06	115	637,18	181	16948
50	29,22	116	40,108	182	4720,55
51	74,3	117	1041,9	183	487,05
52	108,29	118	369,5	184	319,85
53	27	119	505,6	185	5866
54	68,8	120	650,315	186	9855,7
55	19,23	121	22326	187	934,05
56	94,8	122	49,72	188	489,2
57	117,6	123	127,125	189	42589
58	30,3	124	1357,145	190	46160,5
59	2,8	125	3912	191	27305
60	381,3	126	637,5033	192	17461
61	160,8	127	79,6675	193	31280
62	91,8	128	155	194	924,26
63	6,9	129	2,738	195	732,67
64	151,4	130	1529	196	57,52
65	2,1404	131	1591,4	197	20633
66	0,01415	132	2037,4	198	11327
				199	30462
				200	9496,2

4.4 Quantitative Proteinanalyse der Zellpräparationen aus *A. actinomycetemcomitans*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Tests ergab, dass sich die Konzentrationen der Proteine in den Isolaten, die während und nach der Affinitätschromatografie biotinyliert wurden, kaum voneinander unterschieden. Abbildung 19 zeigt die Standardkurve, die zur Ermittlung der Proteinkonzentration herangezogen wurde.



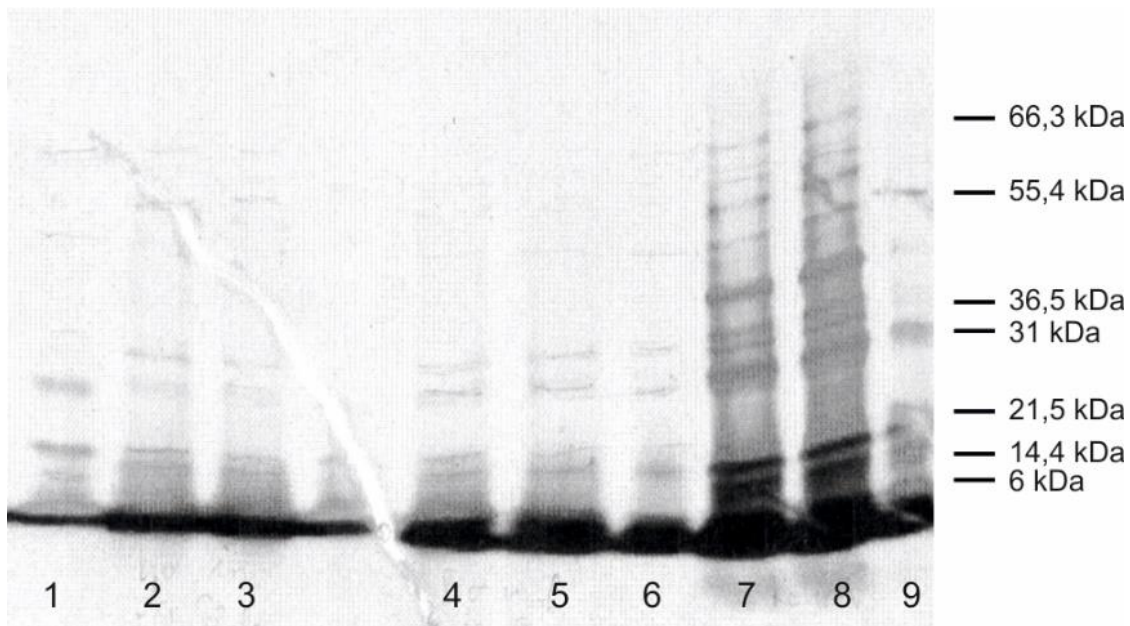
Aufgetragen ist die Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der optischen Dichte. Diese Kurve diente der Bestimmung der Proteinkonzentration in den Isolaten.

Abb. 19: Standardkurve zur Ermittlung der Proteinkonzentration in den biotinylierten Isolaten aus *A. actinomycescomitans* mittels Bichonin-(BCA)-Test

Die Konzentration der während der Affinitätschromatografie biotinylierten Proteine betrug 44,02 µl/ml und nach der Affinitätschromatografie 33,38 µg/ml. 30 µl Probe (Protein) bei 40,02 µg/ml enthielten somit insgesamt 1,32 µg Protein, wohingegen 30 µl Probe bei 33,38 µg/ml 1,00 µg Protein enthielten. Die Konzentration der Proteine im Rohextrakt war mit 769,15 µg/ml deutlich höher. 30 µl Probe bei 769,15 µg/ml enthielten 23,05 µg Protein.

4.5 Qualitative Proteinanalyse der Zellpräparationen aus *A. actinomycescomitans*

Die unterschiedlichen Präparationen der *A. actinomycescomitans* Proteine wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (s. Abbildung 20). Untersucht wurden die während der Affinitätschromatografie biotinylierten Proteine (Spuren 1–3), nach der Affinitätschromatografie biotinylierten Proteine (Spuren 4–6) sowie das biotinylierte Rohextrakt (Spuren 7–9). Das Gel wurde nach dem Lauf mit einer Silberfärbung angefärbt, um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Zur Dokumentation wurde das Gel mit einer Digitalkamera fotografiert.



Aufgetragen sind die Isolate der während der Affinitätschromatografie biotinylierten Proteine (Spuren 1–3), nach der Affinitätschromatografie biotinylierten Proteine (Spuren 4–6) sowie das biotinylierte Rohextrakt (Spuren 7–9).

Abb. 20: Proteinspektrum der Präparationen aus *A. actinomycetemcomitans* nach Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Silberfärbung

Im Rohextrakt (Spuren 7–9) wurden elf Banden (14, 16, 31, 34, 36, 46, 54, 57, 63, 64 und 66 kDa) detektiert, nach der Affinitätschromatografie (Spuren 4–6) dagegen nur noch sechs Banden (14, 16, 31, 34, 54 und 66 kDa). Im Vergleich zum Rohextrakt waren die Banden bei 36, 46, 57, 63 und 64 kDa nach der Affinitätschromatografie nicht mehr sichtbar. Die Spuren 1–3 zeigen die Banden der biotinylierten Proteine während der Affinitätschromatografie. In diesen Spuren war das Bandenmuster weitgehend identisch mit dem der Spuren nach der Affinitätschromatografie. Der einzige Unterschied zwischen den Präparationen während und nach der Affinitätschromatografie bestand in der Detektion der Bande bei 57 kDa in den Präparaten während der Affinitätschromatografie. Die folgende Tabelle 6 und Abbildung 21 zeigen das Laufverhalten der Proteinbanden in Abhängigkeit von der molekularen Masse der Proteine.

Tab. 6: Molekulare Masse (kDa) und Laufstrecke (mm) der Proteine

Laufstrecke (mm)	Molekulare Masse der Proteine (kDa)
2	200
11	116,3
15	97
22	66
27	55
35	36
40	31
49	21
56	14,4
62	6

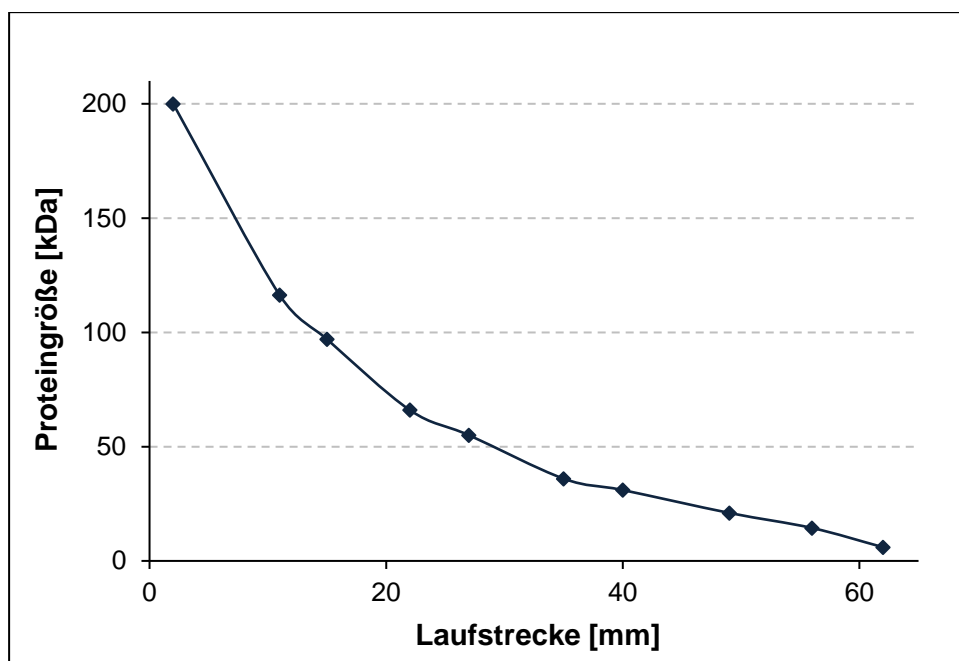


Abb. 21: Laufstrecke der Proteine (mm) in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Gelelektrophorese in Relation zu ihrem Molekulargewicht (kDa)

5. Diskussion

5.1 Parodontalbehandlung

Das Ziel einer Parodontalbehandlung ist es, die Anzahl der parodontalpathogenen Keime zu verringern (Socransky and Haffajee 1992). Grundlage der systematischen Parodontalbehandlung ist die Entfernung supra- und subgingivaler Plaques (Petersilka *et al.* 2000). Die klinischen Ergebnisse unterschiedlicher Therapien zur Behandlung einer chronischen Parodontitis (z. B. *Scaling, Root Planing*) wurden in retrospektiven Studien evaluiert. Das Ziel jeder Therapie ist die Reduktion der Sondierungstiefe und der *Attachment*-Gewinn (Berakdar *et al.* 2012). Der Behandlungserfolg hängt von der Motivation und *Compliance* der Patienten ab. Nachsorgeprogramme, die zu regelmäßiger Mundhygiene anregen und supra- und subgingivalen Beläge entfernen, sollen die erneute Etablierung pathogener Keime verhindern (Petersilka *et al.* 2000).

Parodontitis-Rezidive (subgingivale Rekolonisationen) können trotz einer aufwendigen Initialtherapie bei unzureichender Plaquekontrolle wieder auftreten. Bereits zwei Monate nach der Behandlung können die klinischen Parameter wieder auf präoperative Werte ansteigen. Auch sind Schäden an oralen Hart- und Weichgeweben diagnostizierbar, wenn die Parodontaltherapie wiederholt durch Instrumentierung erfolgt. Parodontal- und Prophylaxebehandlungen verursachen häufig Abrasionen und gingivale Rezessionen (Lussi *et al.* 1993, Lussi and Schaffner 2000). Freiliegende Wurzeloberflächen führen zudem zu hypersensiblen Zahnhälsen und stellen einen Risikofaktor für Wurzelkaries dar (Rateitschak-Plüss *et al.* 1992). Die subgingivale Keimzahl lässt sich mittels mechanischen Debridements um bis zu 99 % senken. Dabei werden jedoch parodontalpathogene Keime nicht immer wirksam genug reduziert, um die Parodontalbehandlung erfolgreich abzuschließen (Petersilka *et al.* 2000). Mögliche Ursachen sind Furkationsbereiche (Fleischer *et al.* 1989), Unregelmäßigkeiten an der Wurzeloberfläche, die Penetration von Keimen in Dentintubuli (Adriaens *et al.* 1988a, 1988b) bzw. das Eindringen von Keimen in parodontales Weichgewebe (Christersson *et al.* 1987a, 1987b). In manchen Fällen schreitet die Parodontitis trotz Parodontalbehandlung und angemessener Mundhygiene fort und führt schließlich zum Zahnverlust (Hirschfeld and Wasserman 1978, McFall 1982).

5.2 Antimikrobielle Therapie

Systemisch und lokal applizierte antimikrobielle Wirkstoffe können die mechanische Therapie ergänzen und die klinischen Behandlungsergebnisse verbessern (Herrera *et al.* 2002, Loesche 1976, Mombelli und van Winkelhoff 1997, Trombelli und Tatakis 2003, Kapoor *et al.* 2012).

Bei einer Indikation zu einer systemischen antimikrobiellen Zusatztherapie, ist eine Kombination aus Amoxizillin und Metronidazol das Mittel der Wahl (Addy und Martin 2003, Herrera *et al.* 2002). Jedoch hat eine systemische Antibiotikatherapie auch Nachteile (Slots und Ting 2000). Zu den häufigsten Problemen und Risiken von systemisch verabreichten Antibiotika zählen (Addy und Martin 2003, Zdziarski *et al.* 2003):

- Hypersensitivität und Allergie
- toxische Nebenwirkungen
- Wechselwirkungen
- Förderung bakterieller Resistenzentwicklung
- Superinfektion durch opportunistische Mikroorganismen
- unsichere *Compliance* der Patienten
- Umweltverschmutzung

Die Nebenwirkungen einzelner Antibiotikaklassen sind in der Tabelle 7 aufgelistet. Hier wird zwischen häufigen und seltenen Nebenwirkungen unterschieden.

Tab. 7: Nebenwirkungen von drei Antibiotikaklassen

Antibiotikum	häufige Nebenwirkungen	seltene Nebenwirkungen
Penizilline	<ul style="list-style-type: none"> • Hypersensitivität (Hautausschlag) 5 % • Durchfall 5 % • Übelkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Hypersensitivität • anaphylaktischer Schock • pseudomembranöse Kolitis
Imidazole (Metronidazol)	<ul style="list-style-type: none"> • Übelkeit, Erbrechen 12 %, • Durchfall, Antabus-Effekt • metabolischer Geschmack 	<ul style="list-style-type: none"> • periphere Neuropathie
Tetrazykline	<ul style="list-style-type: none"> • Photosensitivität, Durchfall • Beeinträchtigung oraler Kontrazeptiva 	<ul style="list-style-type: none"> • Candidiasis • Nephrotoxizität

Die Nebenwirkungen sind nach ihrer Häufigkeit in absteigender Reihenfolge geordnet. Die Inzidenz ist – wenn bekannt – in % angegeben (Mombelli und van Winkelhoff 1997, Slots und Ting 2000).

5.3 Medizinische Bedeutung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Grundlagen für neue Therapieoptionen der Parodontitis zu entwickeln, um die dargestellten Nebenwirkungen der etablierten Therapieformen zu vermeiden.

Bei der Adhärenz von Pathogenen an biologische Oberflächen spielen Glykanbindende OMP (Lektine) der Pathogene eine große Rolle. OMPs binden an den Glykananteil von zellulären Membranglykoproteinen (Gibbons and Houte 1975, Kage 2000, Albert *et al.* 2009). Im Mundraum kann diese Bindung kompetitiv durch sezernierte, im Speichel gelöste Glykane blockiert werden, was die bakterielle Besiedelung der Oberflächen einschränkt oder möglicherweise verhindert. Damit gehören Glykane zu den wichtigsten Schutzfaktoren der Mundhöhle (Kage *et al.* 1989, 1995, 2000).

Untersuchungen an Schulkindern zeigten Unterschiede im Glykanmuster der Speichel-Glykokonjugate. Bei Kindern mit erhöhtem Kariesrisiko war eine bestimmte Oligosaccharid-Struktur deutlich weniger vorhanden. Diese Struktur ähnelte dem Rezeptor auf der Zahnoberfläche für den kariogenen *S. mutans*. Diese Befunde belegen

die Bedeutung der löslichen Oligosaccharide für die Inhibition der Adhärenz kariogener Bakterien und der Vermeidung von Karies (Seemann *et al.* 2001).

Als Bestandteil hochspezifischer Rezeptoren sind Oligosaccharide an der Infiltration von Viren, Bakterien oder Parasiten in die Zelle beteiligt (Buschiazzo *et al.* 2002, Ofek and Doyle 1994). Eine Maskierung der Glykokonjugate kann die Besiedlung unterbinden (Reuter and Gabius 1996, Schachter and Williams 1982).

Aufgrund der Bedeutung von Oligosacchariden als Bestandteil von Rezeptoren für Pathogene soll in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit der Verhinderung der Adhäsion des Bakteriums *A. actinomycetemcomitans* durch Oligosaccharid-Fractionen untersucht werden.

5.4 Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Serotyp b)

Der fakultativ pathogene Mikroorganismus *A. actinomycetemcomitans* ist Teil der humanen physiologischen Mundflora, kommt aber auch bei anderen Säugetieren vor. *A. actinomycetemcomitans* kommt sowohl bei parodontal gesunden Menschen als auch bei Personen mit parodontalen Erkrankungen vor. Der Keim verfügt über zahlreiche Pathogenitätsmechanismen, die parodontale Krankheiten initiieren (Fine *et al.* 2007).

A. actinomycetemcomitans gehört zur klinisch wichtigen HACEK-Gruppe (*Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus aphrophilus*, and *Haemophilus paraphrophilus*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* und *Kingella kingae*) (Westling and Vondracek 2008). Das Bakterium spielt eine Rolle bei der Pathogenese von Endokarditiden (Vandepitte *et al.* 1977, Grace *et al.* 1988, Berbari *et al.* 1997), Sepsen, Sinusitiden, chronischen Bronchitiden, Pneumonien, Osteomyelitiden (Antony *et al.* 2009, Patel *et al.* 2004, Sharma *et al.* 2017), Harnwegsinfektionen sowie von Kiefer-, Schilddrüsen-, Haut- und Gehirnabszessen (Klinger 1912, Martin *et al.* 1967, Rahamat-Langendoen *et al.* 2011).

Auch die Schlüsselrolle von *A. actinomycetemcomitans* bei der LAP ist unumstritten. Unter den sieben durch die Struktur der Lipopolysaccharide determinierten Serotypen (a-g) ist der Serotyp b bei parodontalen Erkrankungen die dominante Form (Watanabe *et al.* 1989).

Laut Yang *et al.* (2004) dominiert der Serotyp b bei Kindern unter 18 Jahren und Patienten zwischen 19 und 35 Jahren eindeutig. Dieser Serotyp wurde häufiger bei der aggressiven Parodontitis als bei der Erwachsenenparodontitis diagnostiziert (Fine *et al.* 2007). Eine

andere Studie fand den Serotyp b sowohl bei der chronischen als auch bei der aggressiven Parodontitis, Serotypen a und d fehlten dagegen (Suprith *et al.* 2018). Bei der LAP zählt *A. actinomycescomitans* zu den häufigsten Keimen der Mundflora und ist laut Erkenntnissen der vergangenen Jahre an der Pathogenese der LAP beteiligt. Bei mehr als 90 % der LAP-Patienten kommt der Keim vor (Asikainen 1986, Ebersole *et al.* 1982 und 1994, Listgarten *et al.* 1981, Suprith *et al.* 2018). Daher wurde der Serotyp b auch für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

Zu den konventionellen Behandlungsmethoden von mit *A. actinomycescomitans* befallenen Zähnen zählen *Scaling*, Kürettage, sowie lokale und systemische Antibiotikagabe (Mandell *et al.* 1986). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Grundlagenversuche für eine alternative Therapiestrategie, die auf der Bindung von Mikroorganismen an Glykanstrukturen der Zahn- oder Schleimhautoberfläche (Gibbons and Houte 1975) und auf der Möglichkeit der kompetitiven Hemmung dieser Bindung durch lösliche Glykane (Kage *et al.* 1989, 1995) beruht, durchgeführt werden. Im zu untersuchenden Fall kommt es zu einer Bindung zwischen den extrahierten Proteinen von *A. actinomycescomitans* und den aus der Molke extrahierten Oligosacchariden. Derzeit fehlen Studien zum Einfluss der OMP bei *A. actinomycescomitans* auf die LAP-Entstehung insbesondere unter Beteiligung der aus der Molke extrahierten Oligosacchariden.

5.4.1 Kultur von *A. actinomycescomitans*

Die Kultivierung von *A. actinomycescomitans* ist vergleichsweise anspruchsvoll, was die Diagnostik erschwert (Sreenivasan *et al.* 1993). *A. actinomycescomitans* ist ein kleines, kokkoides, unbewegliches und gramnegativ Stäbchen. Es bildet keine Sporen und gilt als fakultativ anaerob, mikroaerophil und capnophil. Zur Kultivierung des Bakteriums wurde mit dem Malachite-Green-Bacitracin-(MGB)-Medium ein selektives Medium entwickelt. Bei der Kultivierung von *A. actinomycescomitans* aus der subgingivalen Plaque traten früher häufig Kontaminationen meist mit *Haemophilus aphrophilus* auf. Durch die Zugabe von 128 µg/ml Bacitracin, 8 µg/ml Malachite-Green (antibakterieller Triphenylfarbstoff) zu 40 mg/l Trypticase Soy Agar und 5 % defibriniertes Schafsblut ließ sich die Reinheit der *A. actinomycescomitans*-Kulturen um 80 % steigern (Holm 1954). Weiter wurde ein selektives Medium mit niedrigerem Bacitracin-Level und ohne Malachite-Green entwickelt. Die Zugabe von Bacitracin oder auch Vancomycin dient der Hemmung des Wachstums anderer Mikroorganismen, wie oralen

Streptokokken (z. B. *Streptokokkus mitis*). Da in der vorliegenden Arbeit ein isolierter Stamm von *A. actinomycetemcomitans* eingesetzt wurde, konnte auf ein Selektivmedium verzichtet werden. *A. actinomycetemcomitans* wurde konserviert in lyophilisierter Form geliefert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte unter 5 % CO₂, um ein ausreichendes Wachstum zu gewährleisten (Holm 1954, Stalons *et al.* 1974).

A. actinomycetemcomitans wurde in suspendierter Form auf Kochblut-Agar ausgestrichen. Die Bakterien wurden in einem gasdicht verschließbaren Topf inkubiert. Durch die Farbcodestreifen wurde die anaerobe Atmosphäre in dem Behälter kontrolliert. In den Brutschränken wurde die Temperatur exakt auf 37 °C eingestellt.

5.4.2 Reinheitskontrolle

Kontaminationen wurden durch eine makroskopische und mikroskopische Kontrolle ausgeschlossen. Die Reinheit der Kulturen wurde vor der Ernte der Kulturen jeweils mikroskopisch überprüft. Durch die Gramfärbung konnte eine Kontamination mit grampositiven Keimen ausgeschlossen werden.

5.5 Biotinylierung

5.5.1 Biotinylierung vor der Lyse

Die Methode der Biotinylierung von nicht-lysierten Zellen hatte den Vorteil, dass nur die OMP biotinyliert wurden. Nachteilig war jedoch der große Verbrauch von Biotin. Da nicht sichergestellt werden konnte, dass alle OMP in Kontakt mit dem Biotin kamen, war nicht auszuschließen, dass einige Proteine nicht biotinyliert wurden. Daher wurde auf den Einsatz der nicht-lysierten, biotinylierten *A. actinomycetemcomitans* Zellen in den Lektinbindungs-Inhibitionstest verzichtet.

5.5.2 Biotinylierung nach der Lyse

Rohextrakt

Der Vorteil dieser Methode war, dass in diesen Ansätzen alle OMP verlustfrei analysiert werden konnten. Nachteilig war jedoch das Vorhandensein der intrazellulären Proteine, die bei der Adhäsion keine Rolle spielen. Eine Affinität der intrazellulären Proteine zu den angebotenen Kohlenhydrat-Strukturen konnte beim Lektinbindungs-Inhibitionstest

ebenfalls ausgeschlossen werden. Aufgrund der ausreichenden Menge wurde das Rohextrakt für die weiteren Analysen verwendet.

Biotinylierung während und nach der Affinitätschromatographie

Diese Methode diente der Isolierung der OMP aus dem Rohextrakt. Für die Affinitätschromatographie wurde eine Matrix aus Muzin verwendet, da die Bindung von *A. actinomycetemcomitans* an Proteoglykane bereits häufig beschrieben wurde (Kage 2000). Durch das verwendete Verfahren wurden OMP von den intrazellulären Proteinen, die für die Adhäsion keine Rolle spielen, getrennt. Die Biotinylierung erfolgte während und nach der Affinitätschromatografie.

Die Proteinkonzentration (Lektine) war nach den Ergebnissen des Lektinbindungs-Inhibitionstests in diesen Ansätzen sehr gering. Der wahrscheinlichste Grund ist eine geringe Ausbeute von Lektinen nach der Affinitätschromatografie mit der Muzin-Sepharose™-Säule. Daher wurden diese Ansätze für die weiteren Untersuchungen (qualitative und quantitative Proteinbestimmungen) nicht verwendet.

5.6 Lektinbindungs-Inhibitionstest

Die Speichelmuzine spielen bei oralen Abwehrmechanismen eine große Rolle (Köttgen *et al.* 1992). Kage *et al.* (1995) prägten den Begriff „*first line of defence*“ für diesen Mechanismus.

Zur Bestimmung der an dem Abwehrmechanismus beteiligten Glykane des Speichels bietet sich der Lektinbindungs-Inhibitionstest (Kage *et al.* 1995) an, der stark vereinfacht die bakterielle Adhäsion an orale Oberflächen simuliert. Mit dem Test lässt sich die Bindung zwischen Lektinen und Glykanen qualitativ und quantitativ erfassen. Zudem erlaubt er einen Konzentrationsnachweis bis in den Mikrogrammbereich mit hoher Sensitivität (Drews 2006). In der durchgeführten Arbeit fand der Lektinbindungs-Inhibitionstest als ein funktionelles Analyseverfahren zur Konzentrationsmessung der Glykokonjugate Anwendung.

Um eine ausreichende Pipettierqualität sicherzustellen und Fehler bei der Erstellung von Verdünnungsreihen zu minimieren, wurden alle Messungen doppelt ausgeführt. Um eine potenzielle unspezifische Bindung zu berücksichtigen, wurde auf jeder Mikrotiter-Platte parallel ein Leerwert ermittelt. Dazu wurde anstelle der Oligosaccharid-Probe oder des Standards Verdünnungspuffer in das entsprechende *Well* gegeben. Für die Bestimmung

der Bindungsaffinität der *A. actinomycetemcomitans* Lektine wurden die Oligosaccharid-Fractionen zunächst unverdünnt als Doppelbestimmung eingesetzt. Oligosaccharid-Fractionen, die keine messbare Affinität aufwiesen, wurden entsprechend verdünnt. Die Probe Nummer 190 wies unter den 200 Proben die größte Affinität auf. In zukünftigen Studien sollte diese Oligosaccharid-Fraktion weiter untersucht werden, um die Spezifität der *A. actinomycetemcomitans* Lektine zu identifizieren.

5.7 Quantitative Proteinanalyse

Die Menge an biotinylierten OMP nach der Affinitätschromatographie war niedrig. Die quantitative Bestimmung der OMP mittels BCA-Tests ergab einen Wert von 44,02 µg/ml bzw. 33,38 µg/ml (für die Biotinylierung während und nach der Affinitätschromatographie). Eine Ursache für die geringe Konzentration könnte sein, dass wichtige Proteine bei der Affinitätschromatographie verloren gegangen waren.

Beim Rohextrakt war die Konzentration an Gesamtprotein deutlich höher, nämlich 769,15 µg/m. Hier sind alle Proteine der Keimzelle enthalten (intra- und extrazelluläre Proteine). Es gab zwei Gründe für die Entscheidung, den Rohextrakt bei der Durchführung der Versuche einzusetzen. Einmal ist davon auszugehen, dass alle Oberflächenproteine ohne Verlust bei der Bindung (Oberflächenproteine zu Molken-Oligosacchariden) untersucht wurden. Auf der anderen Seite war die Menge der extrahierten Oberflächenproteine durch die Affinitätschromatographie so gering, dass sie für Durchführung der Versuche nicht ausreichen wird. Daher wurde der Rohextrakt für die weiteren Analysen eingesetzt.

5.8 Qualitative Proteinanalyse

OMP von *A. actinomycetemcomitans* wurden in mehreren Studien identifiziert (Asakawa *et al.* 2003). Ein wärmemodifizierbares OmpA-ähnliches Protein mit 35 kDa und 346 Aminosäuren (auch bekannt als Omp29 und Omp34) ist das am häufigsten vorkommende Oberflächenprotein von *A. actinomycetemcomitans* und ein Hauptbestandteil von Vesikeln der äußeren Membran (Mikihoto *et al.* 2011, Kato *et al.* 2002, Lindholm *et al.* 2018). Es spielt eine besondere Rolle beim Eintritt in die Epithelzellen der Gingiva (Kajiya *et al.* 2011).

Askawa konnte beim Stamm Y4 6 OMP mit Molekulargewicht 100, 64, 39, 29, 18 und 16 (in kDa) isolieren. Er stellte fest, dass OMP 100 eine Rolle bei der Serumresistenz spielt (Asakawa *et al.* 2003). Watabe *et al.* (1989) beschrieben OMP mit Molekulargewicht 19, 24, 29, 35, 40 und 70 in kDa. KoKeguchi *et al.* (1991) hatte die Proteine 30 kDa, 36 kDa, 37 kDa und 39 kDa gefunden. Haase *et al.* (1999) zeigten beim Stamm 283 zwei OMP mit einem Molekulargewicht von 43 und 20 kDa.

Komatsuzawa isolierte Omp100, Omp64, Omp39, Omp29, Omp18 and Omp16 (Komatsuzawa *et al.* 2002).

Llama-Palacios *et al.* (2017) hatten während des Wachstums von *A. actinomycetemcomitans* über 87 Proteine isoliert. Lediglich 13 davon wurden als OMP identifiziert.

Die anderen könnten hauptsächlich Proteine, die am Metabolismus, an der Biosynthese und Transport beteiligt sein (Llama-Palacios *et al.* 2017).

In unserer Studie konnten beim Rohextrakt im Vergleich zu den durch Chromatographie isolierten Proteinen deutlich mehr Proteinbanden dargestellt werden, da hier vergleichsweise alle Proteine ohne Verlust gewonnen werden konnten. Hier konnten insgesamt 10 verschiedene Banden (14, 16, 31, 34, 36, 46, 54, 57, 63 und 66 Angaben in kDa) festgestellt werden

Der Unterschied in der Grösse und Vielfalt beim isolierten OMP in unserer Studie im Vergleich zu anderen Studien könnte durch die genetische Heterogenität zwischen den *A. actinomycetemcomitans*-Stämmen bedingt sein, die seit langem bekannt ist (Kittichotirat *et al.* 2016).

6. Schlussfolgerung

A. actinomycescomitans spielt für die Pathogenese der LAP und weiterer Erkrankungen eine Schlüsselrolle. Die klinische Relevanz ist auch an der Anzahl der Studien, die diesen Keim untersuchen, erkennbar. In der Mundhöhle binden Mikroorganismen an Glykokonjugate sowohl der oralen Schleimhautoberflächen als auch des Speichels. Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Bindung der OMP von *A. actinomycescomitans* an diese Glykokonjugate, die aus der Molke stammen.

Die vorliegenden Daten belegen, dass die Oberflächen-Lektine von *A. actinomycescomitans* an den Kohlenhydrat-Anteil von Glykokonjugaten binden können. Mit dem Lektinbindungs-Inhibitionstest wurde die Bindung der *A. actinomycescomitans* Lektine an 200 Oligosaccharid-Fractionen aus der Molke untersucht. Die Fraktion 190 wies die stärkste Bindungsaffinität zu den *A. actinomycescomitans* Lektinen auf. Diese Fraktion sollte in weiteren Studien näher charakterisiert werden.

6.1 Perspektiven

Die in der vorliegenden Arbeit erstmals bestätigte Bindung der OMP von *A. actinomycescomitans* an Oligosaccharid-Fractionen der Molke sollte in Folgestudien weiter analysiert werden. Insbesondere sollte die Struktur der Oligosaccharide aufgeklärt werden, um die Glykan-Spezifität der Lektine zu identifizieren.

Im oralen System wirken Speichelglykokonjugate protektiv, da sie mit den Glykokonjugaten der oralen Schleimhautoberflächen um die Bindung an den Lektinen der Mikroorganismen konkurrieren, und somit einen Adhäsionsschutz bieten. Bei Veränderungen der Speichel-Komponenten oder einer Reduzierung des Speichels steigt daher das Risiko für infektiöse Erkrankungen. Für die Prävention von Parodontitis ist es daher von großer Bedeutung, die Struktur der an der spezifischen Bindung beteiligten Glykokonjugate zu identifizieren.

Laut der aktuellen Datenlage weisen Muzine und ihre Glykananteile, und somit die Oligosaccharide aus der Molke, keine negativen Effekte für den Organismus auf. Damit wäre der therapeutische Einsatz dieser Substanzen zur Behandlung von Infektionen und Entzündungen der Mundschleimhaut möglich (Drews 2006). Ein weiteres mögliches

Einsatzgebiet mit zunehmender Relevanz ist die orale Prophylaxe. Spezifische, lösliche Glykanen könnten insbesondere bei Patienten mit einem hohen Risiko für Karies und Parodontitis eingesetzt werden. Die in der vorliegenden Studie identifizierte Oligosaccharid-Fraktion 190 könnte in diesem Kontext ein erfolgversprechender Kandidat für die Entwicklung eines therapeutisch einsetzbaren Glykans sein.

7. Literaturverzeichnis

- Aas J. A., Paster B. J., Stokes L. N., Olsen I., Dewhirst F. E. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5721–5732. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.
- Abdellatif, H. M. and Burt, B. A. (1987) An epidemiological investigation into the relative importance of age and oral hygiene status as determinants of periodontitis. *J Dent Res.* 1987 Jan;66(1):13-8. doi: 10.1177/00220345870660010201.
- Åberg, C. H., Kelk, P. and Johansson, A. (2015) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. *Virulence.*2015;6(3):188-195. doi: 10.4161/21505594. 2014.982428.
- Acquier, A. B., De Couto Pita, A. K., Busch, L. and Sánchez, G. A. (2017) Parameters of oxidative stress in saliva from patients with aggressive and chronic periodontitis. *Redox Rep.* 2017 May;22(3):119-126. doi: 10.1080/13510002.2016.1198104.
- Addy, M. and Martin, M. V. (2003) Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. *Oral Dis.* 2003;9 Suppl 1:38-44. doi: 10.1034/j.1601-0825.9.s1.7.x.
- Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. (1988a) Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol.* 1988 Apr;59(4):222-230. doi: 10.1902/jop.1988.59.4.222.
- Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. (1988b) Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol.* 1988 Aug;59(8):493-503. doi: 10.1902/jop.1988.59.8.493.
- Africa, C. W., Parker, J. R. and Reddy, J. (1985) Bacteriological studies of subgingival plaque in a periodontitis-resistant population. I. Darkfield microscopic studies. *J Periodontal Res.* 1985 Jan;20(1):1-7. doi: 10.1111/j.1600-0765.1985.tb00403.x.
- Alaluusua, S., Asikainen, S. and Lai, C. H. (1991) Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol.* 1991 Mar;62(3):207-10. doi: 10.1902/jop.1991.62.3.207.
- Albert M. Wu., Lisowska E, Duk M, Yang Z (2009) Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj J.* 2009 Nov;26(8):899-913. doi: 10.1007/s10719-008-9119-7.
- Antony, B., Thomas, S., Chandrashekar, S. C., Kumar, M. S. and Kumar, V. (2009) Osteomyelitis of the mandible due to *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009 52(1), 115-116.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4(1), 1-6.
- Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Goncalves RB, Izumi S, Fujiwara T, Nakano Y, Suzuki N, Uchida Y, Ouhara K, Shiba H, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M. (2003) Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol.* 2003 Nov;50(4):1125-39. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03748.x.

- Asikainen, S. (1986) Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and spirochetes in relation to age in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 1986 Sep;57(9):537-541. doi: 10.1902/jop.1986.57.9.537.
- Baer, P. N. (1971) The case for periodontosis as a clinical entity. *J Periodontol.* 42(8), 516-520. <https://doi.org/10.1902/jop.1971.42.8.516>.
- Belibasakis G.N., Maula T., Bao K., Lindholm M., Bostanci N., Oscarsson J., Ihalin R., Johansson A. (2019) Virulence and Pathogenicity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens.* 2019:222. doi: 10.3390/pathogens8040222.
- Belibasakis, G., Johansson, A., Wang, Y., Claesson, R., Chen, C., Asikainen, S. and Kalfas S. (2002) Inhibited proliferation of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: Involvement of the cytolethal distending toxin. *Eur J Oral Sci.* 110(5), 366-373.
- Berakdar, M., Callaway, A., Eddin M. F., Roß, A. and Willershausen, B. (2012) Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. *Head Face Med.* 2012 Apr 5;8:12. doi: 10.1186/1746-160X-8-12.8, 12.
- Berbari EF, Cockerill FR 3rd, Steckelberg JM. (1997) Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. *Mayo Clin Proc.* 1997 Jun;72(6):532-542. doi: 10.4065/72.6.532.
- Bernardi A, Jiménez-Barbero J, Casnati A, De Castro C, Darbre T, Fieschi F, Finne J, Funken H, Jaeger KE, Lahmann M, Lindhorst TK, Marradi M, Messner P, Molinaro A, Murphy PV, Nativi C, Oscarson S, Penadés S, Peri F, Pieters RJ, Renaudet O, Reymond JL, Richichi B, Rojo J, Sansone F, Schäffer C, Turnbull WB, Velasco-Torrijos T, Vidal S, Vincent S, Wennekes T, Zuilhof H, Imberty A. (2015) Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents. *Chem Soc Rev.* 2013 Jun 7;42(11):4709-27. doi: 10.1039/c2cs35408j.
- Bhogal, P.S., Slakeski, N. and Reynolds, E.C. (1991) A cell-associated protein complex of *Porphyromonas gingivalis* W50 composed of Arg- and Lys-specific cysteine proteinases and adhesins. *Microbiology* 143:2485-2495. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-7-2485>.
- Blix I. J., H R Preus H R., Olsen I. (1990) Invasive growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on solid medium (TSBV). *Acta Odontol Scand.* 1990 Oct;48(5):313-8. doi: 10.3109/00016359009033622.
- Bode L., (2012) Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology.* 22:1147–1162. doi: 10.1093/glycob/cws074.
- Boyd WC, Shapleigh E. (1954) Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science.* 1954 Mar 26;119(3091):419. doi: 10.1126/science.119.3091.419.
- Breuer, H. (1992) dtv - Atlas zur Chemie II. Organische Chemie und Kunststoffe. 5. Auflage, München, dtv-Verlagsgesellschaft. 422ff.
- Brigido, J. A., daSilveira, V. R. S., Rego, R. O. and Nogueira, N. A. P. (2014) Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals: review of literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014;19(2), e184-e191. DOI: 10.4317/medoral.19304.
- Brooks, S.A, Leathem, A.J.C and Schumacher, U (1997) Lectin histochemistry: a concise practical handbook, *FEBS Letters*, 415, doi: 10.1016/S0014-5793(97)01138-1.

- Brown, C. M., Hancock, E. B., O'Leary, T. J., Miller, C. H. and Sheldrake, M. A. (1991) A microbiological comparison of young adults based on relative amounts of subgingival calculus. *J Periodontol.* 62(10), 591-597. <https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.10.591>.
- Bueno, L. C., Mayer, M. P. and DiRienzo, J. M. (1998) Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. *J Periodontol.* 1998 Sep;69(9):998-1007. doi: 10.1902/jop.1998.69.9.998.
- Buschiazzo A, Amaya MF, Cremona ML, Frasca AC, Alzari PM. (2002) The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. *Mol Cell.* 2002 Oct;10(4):757-768. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00680-9.
- Busscher, H. J. and van der Mei, H. C. (1997) Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res.* 1997 Apr;11(1):24-32. doi: 10.1177/08959374970110011301.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M. and Tonetti, M. S. (2018) A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018 Jun;45 Suppl 20:S1-S8. doi: 10.1111/jcpe.12935.
- Chen, P. B., Davern, L. B., Neiders, M. E., Reynolds, H. S. and Zambon J. J. (1991) Analysis of in vitro lymphoproliferative responses and antibody formation following subcutaneous injection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Wolinella recta* in a murine model. *Oral Microbiol Immunol.* 1991 Feb;6(1):12-16. doi: 10.1111/j.1399-302x.1991.tb00445.x.
- Christersson, L. A., Albin, B., Zambon, J. J., Wikesjö, U. M. and Genco, R. J. (1987a) Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J Periodontol.* 1987 Aug;58(8):529-539. doi: 10.1902/jop.1987.58.8.529.
- Christersson, L. A., Wikesjö, U. M., Albin, B., Zambon, J. J. and Genco, R. J. (1987b) Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. *J Periodontol.* 1987 Aug;58(8):540-545. doi: 10.1902/jop.1987.58.8.540.
- Christersson, L. A. and Zambon, J. J. (1993) Suppression of subgingival *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol.* 1993 Jul;20(6):395-401. doi: 10.1111/j.1600-051x.1993.tb00379.x.
- Costa, F. O., Cota, L. O., Lages, E. J., Cyrino, R. M., Oliveira, A. M., Oliveira, P. A. and Cortelli, J. R. (2013) Associations of duration of smoking cessation and cumulative smoking exposure with periodontitis. *J Oral Sci.* 2013 Sep;55(3):245-53. doi: 10.2334/josnusd.55.245.
- Coutinho D, Karibasappa SN, Mehta DS (2018) Royal jelly antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *J. Interdiscip. Res.* 2018; 8:18–22.
- Craft K.M., Townsend S.D. (2019) Mother Knows Best: Deciphering the Antibacterial Properties of Human Milk Oligosaccharides. *Acc. Chem. Res.* 2019; 52:760–768. doi: 10.1021/acs.accounts.8b00630.

- Dahlen D., Basic A., Bylund J. (2019) Importance of Virulence Factors for the Persistence of Oral Bacteria in the Inflamed Gingival Crevice and in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *J Clin Med.* 2019 Aug 29;8(9):1339. doi: 10.3390/jcm8091339.
- David R. Danforth, Gaoyan Tang-Siegel, Teresa Ruiz, and Keith P. Mintz (2019) A Nonfimbrial Adhesin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Mediates Biofilm Biogenesis. *Infect Immun.* 2019 Jan; 87(1): e00704-18. Published online 2018 Dec 19. Prepublished online 2018 Oct 8. doi: 10.1128/IAI.00704-18.
- Dawes C, Jenkins GN, Tonge CH 1963 The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth. *British Dental Journal*, 115 (1963), pp. 65-68.
- Dekker, J. and Strous, G. J. (1990) Covalent oligomerization of rat gastric mucin occurs in the rough endoplasmic reticulum, is N-glycosylation-dependent, and precedes initial O-glycosylation. *J Biol Chem.* 265(30), 18116-18122.
- Deinzer, R., Förster, P., Fuck, L., Herforth, A., Stiller-Winkler, R. and Idel, H. (1999) Increase of crevicular interleukin 1 β under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. *J Clin Periodontol.* 1999 Jan;26(1):1-8. doi: 10.1034/j.1600-051x.1999.260101.x.
- Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (1987) Neue verbesserte Nomenklatur für die Parodontopathien. *Dtsch Zahnärztl Z.* 42, 851.
- Dietrich, T., Walter, C., Oluwagbemigun, K., Bergmann, M., Pischon, T., Pischon, N. and Boeing, H. (2015) Smoking, smoking cessation, and risk of tooth loss: The EPIC-Potsdam study. *J Dent Res.* 2015 Oct;94(10):1369-1375. doi: 10.1177/0022034515598961.
- DiRienzo, J. M., Cornell, S., Kazoroski, L. and Slots, J. (1990) Probe-specific DNA fingerprinting applied to the epidemiology of localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1990 Apr;5(2):49-56. doi: 10.1111/j.1399-302x.1990.tb00227.x.
- DiRienzo, J. M., Slots, J., Sixou, M., Sol, M. A., Harmon, R. and McKay, T. L. (1994) Specific genetic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun.* 1994 Aug;62(8):3058-65. doi: 10.1128/IAI.62.8.3058-3065.1994.
- DIXON, H. Defining a lectin. *Nature* 292, 192 (1981). <https://doi.org/10.1038/292192e0>.
- Drews, J. (2006) Konzentration Lektin-spezifischer Speichelglykane im Verlauf einer experimentellen Gingivitis. Zahnmedizinische Dissertation, Zentrum für Zahnmedizin Campus Virchow-Klinikum der Medizinischen Fakultät der Charité, Berlin <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/drews-jessica-2005-10-26/METADATA/abstract.php?id=26648>. Accessed October 23, 2016.
- Ebersole, J. L., Taubman, M. A., Smith, D. J., Genco, R. J. and Frey, D. E. (1982) Human immune responses to oral micro-organisms. I. Association of localized juvenile periodontitis (LJP) with serum antibody responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Clin Exp Immunol.* 1982 Jan;47(1):43-52.
- Ebersole, J. L., Cappelli, D. and Sandoval, M. N. (1994) Subgingival distribution of *A. actinomycetemcomitans* in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1994 Feb;21(2):65-75. doi: 10.1111/j.1600-051x.1994.tb00282.x.
- Eger T., Zoller L., Muller H. P., Hoffmann S., Lobinsky D. (1996) Potential diagnostic value of sampling oral mucosal surfaces for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in

- young adults. Eur J Oral Sci. 1996 Apr;104(2 (Pt 1)):112-117. doi: 10.1111/j.1600-0722.1996.tb00054.x.
- Ehmke, B., Schmidt, H., Beikler, T., Kopp, C., Karch, H., Klaiber, B. and Flemmig, T. F. (1999) Clonal infection with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* following periodontal therapy. J Dent Res. 1999;78(9):1518-1524. doi:10.1177/00220345990780090601.
- Elisa Jurianz (2019) Parodontitisein Risikofaktor für die Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide. https://opendata.unihalle.de/bitstream/1981185920/25527/1/Dissertation_%20Elisa_Jurianz_01.10.19.pdf.
- Emani S, Gunjiganur G, Mehta D. Determination of the antibacterial activity of simvastatin against periodontal pathogens, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. Contemp. Clin. Dent. 2014; 5:377–382. doi: 10.4103/0976-237X.137959.
- Faïs T, Delmas J, Serres A, Bonnet R, Dalmasso G. Impact of CDT Toxin on Human Diseases. Toxins (Basel). 2016 Jul 15;8(7):220. doi: 10.3390/toxins8070220.
- Fine D, Velliyagounder K, Furgang D, Kaplan J. 2005 The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates. Infect Immun 73:1947–1953. doi:10.1128/IAI.73.4.1947-1953.2005.
- Fine, D. H., Markowitz, K., Furgang, D., Fairlie, K., Ferrandiz, J., Nasri, C., McKiernan, M. and Gunsolley, J. (2007) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. J Clin Microbiol. 2007 Dec;45(12):3859-69. doi: 10.1128/JCM.00653-07.
- Fine, D. H., Patil, A.G. and Velusamy, S. K. (2019) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) under the radar: myths and misunderstandings of Aa and its role in aggressive periodontitis. Front Immunol. 2019 Apr 16;10:728. doi: 10.3389/fimmu.2019.00728. eCollection 2019.
- Fives-Taylor, P, Meyer, D, Mintz, K (1995) Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. Adv Dent Res 1995 Feb;9(1):55-62. doi: 10.1177/08959374950090011001.
- Fleischer HC, Mellonig JT, Brayer WK, Gray JL, Barnett JD. (1989) Scaling and root planing efficacy in multirrooted teeth. J Periodontol. 1989 Jul;60(7):402-409. doi: 10.1902/jop.1989.60.7.402.
- Frias, J., Olle, E. and Alsina, M. (2001) Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. Infect Immun. 2001 May;69(5):3431-3434. doi: 10.1128/IAI.69.5.3431-3434.2001.
- Gibbons, R. J. and Houte, J. V. (1975) Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annu Rev Microbiol. 1975;29:19-44. doi: 10.1146/annurev.mi.29.100175.000315.
- Gmür, R. and Baehni, P. C. (1997) Serum immunoglobulin G responses to various *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in a young ethnographically heterogeneous periodontitis patient group. Oral Microbiol Immunol. 1997 Feb;12(1):1-10. doi: 10.1111/j.1399-302x.1997.tb00360.x.
- Goldstein, I. and Poretz, R. (2012) Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein I.

- J, eds. *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Amsterdam, Elsevier.33ff.
- Grace CJ, Levitz RE, Katz-Pollak H, Brettman LR. (1988) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* prosthetic valve endocarditis. *Rev Infect Dis*. 1988 Sep-Oct;10(5):922-929. doi: 10.1093/clinids/10.5.922.
- Green, L. W., Tryon, W. W., Marks, B. and Huryn, J. (1986) Periodontal disease as a function of life events stress. *J Human Stress*. 1986 Spring;12(1):32-6. doi: 10.1080/0097840X.1986.9936764.
- Haab BB, Klamer Z. (2020) Advances in Tools to Determine the Glycan-Binding Specificities of Lectins and Antibodies. *Mol Cell Proteomics*. 2020;19(2):224-232. doi:10.1074/mcp.R119.001836.
- Haase, E. M., Zmuda, J. L. and Scannapieco, F. A. (1999) Identification and molecular analysis of rough-colony-specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 67(6), 2901-2908. doi: 10.1128/IAI.67.6.2901-2908.1999.
- Haber, J., Wattles, J., Crowley, M., Mandell, R., Joshipura, K. and Kent, R. L. (1993) Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol*. 1993 Jan;64(1):16-23. doi: 10.1902/jop.1993.64.1.16.
- Hägewald, S., Bernimoulin, J. P., Köttgen, E. and Kage, A. (2000) Total IgA and *Porphyromonas gingivalis*-reactive IgA in the saliva of patients with generalised early-onset periodontitis. *Eur J Oral Sci*. 2000 Apr;108(2):147-153. doi: 10.1034/j.1600-0722.2000.00743.x.
- Hägewald, S., Bernimoulin, J. P., Köttgen, E. and Kage, A. (2002) Salivary IgA subclasses and bacteria-reactive IgA in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 2002 Oct;37(5):333-339. doi: 10.1034/j.1600-0765.2002.00337.x.
- Haltiwanger, R. S. and Lowe, J. B. (2004) Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* 2004;73:491-537. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074043.
- Hannig, C. and Hannig, M. (2009) The oral cavity – a key system to understand substratum dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig*. 2009 Jun;13(2):123-139. doi: 10.1007/s00784-008-0243-3.
- Haubek, D., Ennibi, O. K., Abdellaoui, L., Benzarti, N. and Poulsen, S. (2002) Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol*. 29(7), 657-660. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.2002.290711.x>.
- Haubek, D., Havemose-Poulsen, A. and Westergaard, J. (2006) Aggressive periodontitis in a 16-year-old Ghanaian adolescent, the original source of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain HK1651 - a 10-year follow up. *Int J Paediatr Dent*. 2006 Sep;16(5):370-375. doi: 10.1111/j.1365-263X.2006.00735.x.
- Haubek, D., Ennibi, O. K., Poulsen, K., Vaeth, M., Poulsen, S. and Kilian, M. (2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*. 2008 Jan 19;371(9608):237-42. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60135-X.

- Haubek D., Johansson A. 2014 Pathogenicity of the highly leukotoxiic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its geographic dissemination and role in aggressive periodontitis. *J. Oral Microbiol.* 2014;1–22. doi: 10.3402/jom.v6.23980.
- Haunfelder, D. Parodontologie. In: *Praxis der Zahnheilkunde*. 2. Auflage. München-Wien-Baltimore: Urban und Schwarzenberg.
- Henderson, B., Ward, J. M. and Ready, D. (2010) *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontol* 2000. 2010 Oct;54(1):78-105. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00331.x.
- Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. and Roldán, S. (2002) A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2002;29 Suppl 3:136-59; discussion 160-1622. doi: 10.1034/j.1600-051x.29.s3.8.x.
- Hirschfeld L, Wasserman B. (1978) A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol.* 1978 May;49(5):225-237. doi: 10.1902/jop.1978.49.5.225.
- Holm, P. (1954) The influence of carbon dioxide on the growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Bacterium actinomycetemcomitans* Klinger 1912). *Acta Pathol Microbiol Scand.* 34(3), 235-248.
- Holtzhauer, Martin (1996) *Methoden in der Proteinanalytik*. Springer-Verlag S.40-45. <https://books.google.de/books?id=UV7zBQAAQBAJ&pg=PA40&dq=affinit%C3%A4tschromatographie+von+oligosacchariden&hl=de&sa=X&ved=2ahUKEwj40YvIoOvtAhXIGewKHai9BW8Q6AEwAHoECAUQAQ#v=onepage&q=affinit%C3%A4tschromatographie%20von%20oligosacchariden&f=false>.
- Inouye, T., H. Ohta, S. Kokeguchi, K. Fukui, and K. Kato (1990) Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett.* 1990 May;57(1-2):13-17. doi: 10.1016/0378-1097(90)90405-f.
- Jancke, M. (2002) *Speichelglykane als Adhäsionsfaktoren bei rasch fortschreitender Parodontitis*. <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/jancke-mathias-2002-01-21/HTML/index.html>. Accessed April 9, 2016.
- Johansson, A., Claesson, R., Hanstrom, L., Sandstrom G. and Kalfas, S. (2000) Polymorphonuclear leukocyte degranulation induced by leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 2000 Apr;35(2):85-92. doi: 10.1034/j.1600-0765.2000.035002085.x.
- Kage, A. (Habilitationsschrift 2000) *Glykanseitenketten als humorale Schutzfaktoren in der Mundhöhle-Pathobiochemie und klinische Relevanz*. S.49.
- Kage, A., Weitzel, D. and Köttgen, E. (1989) Novel competitive lectin-binding assay for quantitative characterization of glycoconjugate using different peroxidase-labeled lectins. *J Clin Chem Clin Biochem.* 27, 701-702.
- Kage, A., Fimme, S., Bernimoulin, J. P., Hägewald, S., Nitschke, I., Kage, R. and Köttgen, E. (1995) Oligosaccharides in mucosal host defense: model, method, and first data. *Adv Exp Med Biol.* 1995;371B:1177-1182. PMID: 7502779.
- Kaplan, A. H., Weber, D. J., Oddone, E. Z. and Perfect, J. R. (1989) Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: 15 cases and review. *Rev Infect Dis.* Jan-Feb 1989;11(1):46-63. doi: 10.1093/clinids/11.1.46.

- Kaplan, J. B., Schreiner, H. C., Furgang, D. and Fine, D. H. (2002) Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr; 40(4): 1181–1187. doi: 10.1128/JCM.40.4.1181-1187.2002.
- Kapoor A, Malhotra R, Grover V, Grover D. (2012) Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Dent Res J (Isfahan).* 2012 Sep;9(5):505-515. doi: 10.4103/1735-3327.104866.
- Kaslick, R. S., West, T. L., Singh, S.M. and Chasen, A. I. (1980) Serum immunoglobulins in periodontosis patients. *J Periodontol.* 1980 Jun;51(6):343-344. doi: 10.1902/jop.1980.51.6.343.
- Kato S, Kowashi Y, Demuth DR (2002) Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog.* 2002 Jan;32(1):1-13. doi: 10.1006/mpat.2001.0474.
- Ketterl, W. *Praxis der Zahnheilkunde Bd. 4: Parodontologie Gebundene Ausgabe – 1. Februar 1990 von W. Ketterl (Herausgeber).*
- Kim, T. S., Frank, P., Eick, S. and Kim, C. K. (2009) Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patient with different ethnic backgrounds. *J Periodontol.* 2009 Dec;80(12):2020-2027. doi: 10.1902/jop.2009.090241.
- Kittichotirat, W., Bumgarner, R. E., Chen, C. (2016) Evolutionary Divergence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of dental research*, 95(1), 94–101. <https://doi.org/10.1177/0022034515608163>.
- Klinger, R. (1912) Untersuchungen über menschliche Aktinomykose. *Zbl f Bakt I Orig.* 62, 198.
- Klock, K. S. and Haugejorden, O. (1991) Primary reasons for extraction of permanent teeth in Norway: changes from 1968 to 1988. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1991 Dec;19(6):336-341. doi: 10.1111/j.1600-0528.1991.tb00183.x.
- Kobata, A. and Takasaki, S., (1991) Structure and biosynthesis of cell surface carbohydrates. In: *Cell Surface Carbohydrates and Cell Development*. Boca Raton, Florida, CRC-Press 1-25.
- Kocourek J. Historical Background. In: Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein I. J, (1986) *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Orlando, San Diego: Academic Press. 1-32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-449945-4.50006-3>.
- Kocourek, J. and Horejsi, V. (1981) Defining a lectin. *Nature* 290, 188.
- Kokeguchi S, Kato K, Nishimura F, Kurihara H, Murayama Y. (1991) Isolation and partial characterization of a 39 kDa major outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. *FEMS Microbiol Lett.* 1991 Jan 1;61(1):85-9. doi: 10.1016/0378-1097(91)90018-6.
- Köttgen, E., Hell, B., Kage, A. and Tauber, R. (1992) Lectin specificity and binding characteristics of human C-reactive protein. *J Immunol.* 1992 Jul;149(2), 445-453.
- Kolenbrander, P. E. (2000) Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:413-437. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.413.

- Komatsuzawa H, Kawai T, Wilson ME, Taubman MA, Sugai M, Suginaka H. (1999) Cloning of the gene encoding the Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype b OmpA-like outer membrane protein. *Infect Immun.* 1999 Feb;67(2):942-5. doi: 10.1128/IAI.67.2.942-945.1999.
- Komatsuzawa H, Asakawa R, Kawai T, Ochiai K, Fujiwara T, Taubman MA, Ohara M, Kurihara H, Sugai M. (2002) Identification of six major outer membrane proteins from Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Gene.* 2002 Apr 17;288(1-2):195-201. doi: 10.1016/s0378-1119(02)00500-0.
- König KG. *Atiologie der Karies, insbesondere die Rolle von Zuckern [Etiology of caries with emphasis on the role of sugars]. Dtsch Zahnarztl Z.* 1987 Oct;42(10 Suppl 1):S20-9. German. PMID: 3483704.
- Kornfed, R. and Kornfed, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 1985;54:631-64. doi: 10.1146/annurev.bi.54.070185.003215.
- Laine, M. L., Jepsen, S. and Loos, B. G. (2014) Progress in the identification of genetic factors in periodontitis. *Curr Oral Health Rep.* 1, 272-278 (2014). <https://doi.org/10.1007/s40496-014-0037-4>.
- Lehner, T., Wilton, J. M., Ivanyi, L. and Manson, J. D. (1974) Immunological aspects of juvenile periodontitis (periodontosis). *J Periodontal Res.* 1974;9(5):261-72. doi: 10.1111/j.1600-0765.1974.tb00681.x.
- Levine, M. J., Herzberg, M. C., Levine, M. S., Ellison, S. A., Stinson, M. W., Li, H. C. and van Dyke, T. (1978) Specificity of salivary-bacterial interactions: role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with Streptococcus sanguis and Streptococcus mutans. *Infect Immun.* 1978 Jan;19(1):107-115. doi: 10.1128/IAI.19.1.107-115.1978.
- Liljemark, W. F., Bloomquist, C. G., Fenner, L. J., Antonelli, P. J. and Coulter, C. M. (1989) Effect of neuraminidase on the adherence to salivary pellicle of streptococcus sanguis and streptococcus mitis. *Caries Res.* 23(3), 141-145. DOI:10.1159/000261167
- Lindhe, J. and Nyman, S. (1975) The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *J Clin Periodontol.* 1975 Apr;2(2):67-79. doi: 10.1111/j.1600-051x.1975.tb01727.x.
- Lindholm M, Min Aung K, Nyunt Wai S, Oscarsson J. (2018) Role of OmpA1 and OmpA2 in Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Aggregatibacter aphrophilus serum resistance. *J Oral Microbiol.* 2018 Oct 26;11(1):1536192. doi: 10.1080/20002297.2018.1536192.
- Lindhorst, T. K. (2000) Wenn Zucker-Attrappen Bakterien zum Narren halten. *Spektrum der Wissenschaft.* 3, 16-20. <https://www.spektrum.de/magazin/wenn-zucker-attrappen-bakterien-zum-narren-halten/826211>.
- Lindhorst TK, Dubber M. (2015) Octopus glycosides: multivalent molecular platforms for testing carbohydrate recognition and bacterial adhesion. *Carbohydr Res.* 2015 Feb 11;403:90-7. doi: 10.1016/j.carres.2014.06.032.
- Ling, T. Y., Sims, T. J., Chen, H. A., Whitney, C. W., Moncla, B. J., Engel, L. D., Page, R. C. (1993) Titer and subclass distribution of serum IgG antibody reactive with Actinobacillus actinomycetemcomitans in localized juvenile periodontitis. *J Clin Immunol.* 13(2), 101-112. <https://doi.org/10.1007/BF00919266>.

- Listgarten, M.A., Lai, C.-H. and Evian, C.I. (1981), Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 8: 155-164. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1981.tb02027.x>.
- Llama-Palacios A, Potupa O, Sánchez MC, Figuero E, Herrera D, Sanz M (2017) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Growth in Biofilm versus Planktonic State: Differential Expression of Proteins. *J Proteome Res*. 2017 Sep 1;16(9):3158-3167. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00127. Epub 2017 Jul 28. PMID: 28707473.
- Llorente, M.A. and Griffiths, G. S. (2006) Periodontal status among relatives of aggressive periodontitis-patients and reliability of family history report. *J Clin Periodontol*. 2006 Feb;33(2):121-125. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00887.x.
- Loe, H., Theilade, E. and Jensen, S. B. (1965) Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* May-Jun 1965; 36:177-87. doi: 10.1902/jop.1965.36.3.177.
- Loesche WJ. (1976) Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev*. 1976; 9:65-107.
- Lottspeich, F. and Engels, J. W. (2006) *Bioanalytik*, 2. Auflage. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lussi, A. and Schaffner, M. (2000) Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res*. 2000 Mar-Apr;34(2):182-187. doi: 10.1159/000016587.34(2), 182-187.
- Lussi AR, Schaffner M, Hotz P, Suter P. (1993) Epidemiology and risk factors of wedge-shaped defects in a Swiss population. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin = Revue Mensuelle Suisse D'odonto-stomatologie = Rivista Mensile Svizzera di Odontologia e Stomatologia*. 1993 ;103(3):276-280.
- Mandell, R. L., Tripodi, L. S., Savitt, E., Goodson, J. M. and Socransky, S. S. (1986) The effect of treatment on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1986 Feb;57(2):94-9. doi: 10.1902/jop.1986.57.2.94.
- Manocha, M. S. and Chen, Y. (1990) Specificity of attachment of fungal parasites to their hosts. *Can J Microbiol*. 36(2), 69-76. <https://doi.org/10.1139/m90-014>.
- Marsh, P. D. (2006) Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6, S14 (2006). <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14>.
- Marsh, P.D. and Bradshaw, D. J. (1995) Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*. 1995 Sep;15(3):169-175. doi: 10.1007/BF01569822.
- Martin, B. F., Derby, B. M., Budzilovich, G. N. and Ransohoff, J. (1967) Brain abscess due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Neurology*. 1967 Sep;17(9):833-837. doi: 10.1212/wnl.17.9.833.
- McFall WT Jr. (1982) Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease. A long-term study. *J Periodontol*. 1982 Sep;53(9):539-549. doi: 10.1902/jop.1982.53.9.539.
- Meckel, A. H. (1968) The nature and importance of organic deposits on dental enamel. *Caries Res* 1968;2(2):104-14. doi: 10.1159/000259549.
- Meyer, D.H. and Fives-Taylor, P. M. (1993) Evidence that extracellular components function in adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun*. 61(11), 4933–4936. doi:10.1128/IAI.61.11.4933-4936.1993.

- Meyer DH, Fives-Taylor PM. (1994) Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun.* 1994 Mar;62(3):928-935. doi: 10.1128/IAI.62.3.928-935.1994.
- Mikihito K, Komatsuzawa H, Papantonakis A, Seki M, Makihira S, Ouhara K, Kusumoto Y, Murakami S, Taubman MA, Kawai T. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Omp29 is associated with bacterial entry to gingival epithelial cells by F-actin rearrangement. *PLoS One.* 2011 Apr 29;6(4):e18287. doi: 10.1371/journal.pone.0018287.
- Mintz KP. (2004). Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. *Microbiology* 150:2677–2688. doi:10.1099/mic.0.27110-0.
- Mintz, K. P., and Fives-Taylor, P. M. (1994). Adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a human oral cell line. *Infection and immunity*, 62(9), 3672–3678. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.9.3672-3678>.
- Mombelli, A. and van Winkelhoff, A. J. (1997) The systemic use of antibiotics in periodontal therapy. In: Lang, N. P. and Karring T., eds. *Proceedings of the 2nd European Workshop on Periodontology*. Berlin, Quintessence. 38-77.
- Morozov V., Hansman G., Hanisch F.G., Schrotten H., Kunz C. 2018, Human milk oligosaccharides as promising antivirals. *Mol. Nutr. Food Res.* 62:e1700679. doi: 10.1002/mnfr.201700679.
- Musilova S., Rada V., Vlkova E., Bunesova V. 2014, Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Benef. Microbes.* 5:273–283. doi: 10.3920/BM2013.0080.
- Niels Nørskov-Lauritsen, Rolf Claesson, Anne Birkeholm Jensen, Carola Höglund Åberg, and Dorte Haubek (2019), *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*: Clinical Significance of a Pathobiont Subjected to Ample Changes in Classification and Nomenclature. *Pathogens.* 2019 Dec; 8(4): 243. doi: 10.3390/pathogens8040243.
- Niels Nørskov-Lauritsen, N. and Kilian, M. (2006) Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006 Sep;56(Pt 9):2135-2146. doi: 10.1099/ijs.0.64207-0.
- Nieminen, A., Kari, K. and Saxén, L. (1993) Specific antibodies against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in serum and saliva of patients with advanced periodontitis. *Scand J Dent Res.* 1993 Aug;101(4):196-201. doi: 10.1111/j.1600-0722.1993.tb01104.x.
- Nisengard, R. J., Newman, M. G. and Zambon, J. J. (1988) Periodontal disease. In: Newman, G. and Nisengard, R. J., eds. *Oral microbiology and immunology*. Philadelphia, W.B. Saunders Co.
- O'Connell, P. J., Gerkis, V. and d'Apice, A. J. (1991) Variable O-glycosylation of CD13 (aminopeptidase N). *J Biol Chem.* 266(7), 4593-4597.
- Ofek, I. and Doyle, R. (1994) *Bacterial adhesion to cells and tissues*. Heidelberg, Springer. 1-15, 321-512. <https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=FHXSBw>

AAQBAJ&oi=fnd&pg=PP7&dq=Ofek,+I.+and+Doyle,+R.+(1994)+Bacterial+adhesion+to+cells+and+tissues.+Heidelberg,+Springer.+1-15,+321-512.&ots=3uMu0O_8M5&sig=agz5ilHUIEoXpQYdjXDaHzlJtJw#v=onepage&q&f=false

- Ofek I, Hasty DL, Sharon N. (2003) Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003 Oct 15;38(3):181-191. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00228-1.
- Ofek, I., Mirelman, D. and Sharon, N. (1977) Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265(5595), 623-625.
- Oscarsson J, Claesson R, Lindholm M, Höglund Åberg C, Johansson A. (2019) Tools of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* to Evade the Host Response. *J Clin Med.* 2019;8(7):1079. Published 2019 Jul 22. doi:10.3390/jcm8071079.
- Patel, S. M., Mo, J. H., Walker, M. T., Adley, B. and Noskin, G. A. (2004) Epidural abscess and osteomyelitis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004 Dec;50(4):283-5. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.08.005.
- Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. (2000) Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol* 2000.2002;28:56-71. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280103.x.
- Petit, M. D., Van Steenberghe, T. J., De Graaff, J. and Van der Velden, U. (1993) Transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families of adult periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 1993 Sep;28(5):335-345. doi: 10.1111/j.1600-0765.1993.tb01077.x.
- Philstrom, B. L., Michalowicz, B. S. and Johnson, N. W. (2005) Periodontal diseases. *Lancet.* 366(9499), 1809-1820. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8).
- Poulsen, K., Theilade, E., Lally, E. T., Demuth, D. R. and Kilian, M. (1994) Population structure of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a framework for studies of disease-associated properties. *Microbiology (Reading).* 1994 Aug;140 (Pt 8):2049-2060. doi: 10.1099/13500872-140-8-2049.
- Preshaw PM. Detection and diagnosis of periodontal conditions amenable to prevention. *BMC Oral Health.* 2015;15: S5. doi: 10.1186/1472-6831-15-S1-S5.
- Quirynen, M. and Bollen, C. M. (1995) The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995 Jan;22(1):1-14. doi: 10.1111/j.1600-051x.1995.tb01765.x.
- Rahamat-Langendoen, J.C., van Vonderen, M.G.A., Engström, L.J., Manson, W.L., van Winkelhoff, A.J. and Mooi-Kokenberg, E.A.N.M. (2011), Brain abscess associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: case report and review of literature. *Journal of Clinical Periodontology*, 38: 702-706. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01737.x>.
- Rams TE, Slots J. (1991) *Candida* biotypes in human adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1991 Jun;6(3):191-192. doi: 10.1111/j.1399-302x.1991.tb00476.x.
- Rateitschak-Plüss EM, Schwarz JP, Guggenheim R, Düggelin M, Rateitschak KH. (1992) Non-surgical periodontal treatment: where are the limits? An SEM study. *J Clin Periodontol.* 1992 Apr;19(4):240-244. doi: 10.1111/j.1600-051x.1992.tb00460.x.

- Reuter G, Gabius HJ. (1996) Sialic acids structure-analysis-metabolism-occurrence-recognition. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1996 Jun;377(6):325-342. doi: 10.1515/bchm3.1996.377.6.325.
- Rieth P. (1988) Morphology and plaque accumulation. *Oral-prophylaxe*. 1988 Nov;10(4):152-160.
- Rose M C: Charakterisation of human tracheobronchial mucin glycoprotein. *Methods in Enzymology*. 1989, 179, S.3 – 17.
- Rose JE, Meyer DH, Fives-Taylor PM. 2003. Aae, an autotransporter involved in adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun* 71:2384–2393. doi:10.1128/IAI.71.5.2384-2393.2003.
- Rosan, B. and Lamont, R. J. (2000) Dental plaque formation. *Microbes Infect*. 2000 Nov ;2(13) :1599-1607. Doi : 10.1016/s1286-4579(00)01316-2.
- Ruiz T, Lenox C, Radermacher M, Mintz KP. Novel surface structures are associated with the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. *Infect Immun*. 2006 Nov;74(11):6163-6170. doi: 10.1128/IAI.00857-06.
- Schachter, H. and Williams, D. (1982) Biosynthesis of Mucus Glycoproteins. In: Chantler, E., ed. *Mucus in Health and Disease - II. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Heidelberg, Springer. 3-28.
- Sharma, K., Mudgil, P., Whitehall, J. S., & Gosbell, I. (2017). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* osteomyelitis in a 12 year old boy: case report emphasizing the importance of tissue culture, and review of literature. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0186-0>.
- Scheie, A. A. (1994) Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res*. 1994 Jul;8(2):246-253. doi: 10.1177/08959374940080021801.
- Schüler V, Lussi A, Kage A, Seemann R. (2012) Glycan-binding specificities of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* lectin-like adhesins. *Clin Oral Invest*. 2012 Jun;16(3):789-96. doi: 10.1007/s00784-011-0568-1.
- Seemann R, Zimmer S, Bizhang M, Kage A (2001) Differences in the Salivary Glycan Pattern between Children with High and Low Caries Susceptibility. *Caries Res* 2001;35:156-161. doi: 10.1159/000047448
- Selvig, K. A. (1970) Attachment of plaque and calculus to tooth surfaces. *J Periodontal Res*. 1970;5(1):8-18. doi: 10.1111/j.1600-0765.1970.tb01832.x.
- Shaddox L, Wiedey J, Bimstein E, Magnuson I, Clare-Salzler M, Aukhil I (2010). Hyper-responsive phenotype in localized aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89:143–8. doi: 10.1177/0022034509353397.
- Sharon N. (1977) Lectins. *Sci Am*. 1977 Jun;236(6):108-16, 118-9. doi: 10.1038/scientificamerican0677-108.
- Sharon N. (1987) Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Lett*. 1987 Jun 15;217(2):145-157. doi: 10.1016/0014-5793(87)80654-3.
- Sharon N, Eshdat Y, Silverblatt FJ, Ofek I. (1981) Bacterial adherence to cell surface sugars. *Ciba Foundation Symposium*. 1981 ;80:119-141. doi: 10.1002/9780470720639.ch9.

- Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, Hernández M, Gamonal J. (2015) Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci.* 2015 May-Jun;23(3):329-355. doi: 10.1590/1678-775720140259.
- Simmonds, R. S., Tompkins, G. R. and George, R. J. (2000) Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: a review of recent advances. *N Z Dent J.* 2000 Jun;96(424):44-49.
- Slomiany BL, Piotrowski J, Czajkowski A, Shovlin FE, Slomiany A. (1993) Differential expression of salivary mucin bacterial aggregating activity with caries status. *The International Journal of Biochemistry.* 1993 Jun;25(6):935-940. DOI: 10.1016/0020-711x(93)90250-i.
- Slots, J. (1976) The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res.* 1976 Jan;84(1):1-10. doi: 10.1111/j.1600-0722.1976.tb00454.x.
- Slots, J., Reynolds, H. S. and Genco, R. J. (1980) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun.* 29(3), 1013-1020.
- Slots, J. (1982) Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol.* 1982 Apr;15(4):606-609. doi: 10.1128/JCM.15.4.606-609.1982.
- Slots, J. and Rosling, B. G. (1983) Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol.* 1983 Sep;10(5):465-486. doi: 10.1111/j.1600-051x.1983.tb02179.x.
- Slots, J. and Ting, M. (2002) Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 28, 106-176. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280106.x.
- Smith, M. M., Schlesinger, S., Lindstrom, J. and Merlie, J. P. (1986) The effects of inhibiting oligosaccharide trimming by 1-deoxynojirimycin on the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 261(31), 14825-14832.
- Socransky, S. S. (1977) Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. *J Periodontol.* 1977 Sep;48(9):497-504. doi: 10.1902/jop.1977.48.9.497.
- Socransky, S. S. (1979) Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1979 Dec;6(7):16-21. doi: 10.1111/j.1600-051x.1979.tb02114.x.
- Socransky, S. S. and Haffajee, A. D. (1992) The bacterial etiology of destructive periodontal disease: *J Periodontol* 1992 Apr;63(4 Suppl):322-31. doi: 10.1902/jop.1992.63.4s.322.
- Socransky, S. S. and Haffajee, A.D. (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000.* 1994 Jun; 5:7-25. doi: 10.1111/j.1600 0757. 1994. tb00016.x.
- Sood A, Gerlits OO, Ji Y, Bovin NV, Coates L, Woods RJ. (2018) Defining the Specificity of Carbohydrate-Protein Interactions by Quantifying Functional Group Contributions. *J Chem Inf Model.* 2018;58(9):1889-1901. doi:10.1021/acs.jcim.8b00120.
- Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM. Factors influencing the growth and viability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol.* 1993 Dec;8(6):361-369. doi: 10.1111/j.1399-302x.1993.tb00612.x.

- Stalons DR, Thornsberry C, Dowell VR Jr. (1974) Effect of culture medium and carbon dioxide concentration on growth of anaerobic bacteria commonly encountered in clinical specimens. *Appl Microbiol.* 1974 Jun;27(6):1098-104.
- Stillmark, H. (1988) Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. <https://dspace.ut.ee/bitstream/handle/10062/2332/stillmark.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Stryer, L. (1994) *Biochemie*. 5. Auflage, Heidelberg, Spektrum. 345-363.
- Sumner JB, Howell SF (1936). Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J Bacteriol.* 1936;32(2):227-237. doi:10.1128/JB.32.2.227-237.1936.
- Süleyman Yazar, Ülfet Çetinkaya, Berna Hamamcı, Arzu Alkan, Yıldırım Şişman, Çağrı Esen, Melike Kolay (2016) Investigation of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in Periodontitis or Gingivitis Patients in Kayseri Türkiye: *Parazitoloj Derg* 2016 Mar;40(1):17-21. doi: 10.5152/tpd.2016.4351.
- Suprith, S. S., Setty, S., Bhat, K. and Thakur, S. (2018) Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and assessment of leukotoxin in periodontal disease: A clinico-microbiological study. *J Indian Soc Periodontol.* 2018 Jun; 22(3), 201-208. doi: 10.4103/jisp.jisp_36_18.
- Tanner A C R: Is the specific plaquehypothesis still tenable?. Hrsg.: Guggenheim B: *Peridontologie today*. Karger, Basel, 1988.
- Tenovuo J. (1989) Nonimmunoglobulin defense factors in human saliva. Hrsg.: Tenovuo J: *Human saliva: Clinical chemistry and microbiology*. Band 2. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1989.
- Theilade, E. (1986) The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1986 Nov;13(10):905-911. doi: 10.1111/j.1600-051x.1986.tb01425.x.
- Theilade, E., Theilade, J. and Mikkelsen, L. (1982) Microbiological studies early dento-gingival plaque on teeth and Mylar strips in humans. *J Periodontal Res.* 1982 Jan;17(1):12-25. doi: 10.1111/j.1600-0765.1982.tb01127.x.
- Tonetti, M. S. and Mombelli, A. (1999) Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol.* 4(1), 39-52. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.39>.
- Tonetti, M. S., Greenwell, H. and Kornman K. S. (2018) Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 89(Suppl. 1), S159-S172. doi: 10.1002/JPER.18-0006.
- Trombelli, L. and Tatakis D. N. (2003) Periodontal diseases: current and future indications for local antimicrobial therapy. *Oral Dis.* 2003;9 Suppl 1:11-5. doi: 10.1034/j.1601-0825.9.s1.3.x.
- Uhlenbruck G, Gross R, Koch OM, Lee CK; 1983; 'Die Bedeutung von Lektinen für den Adhäsionsmechanismus von Bakterien'; *Dtsch Ärzteblatt* 1983; 80(5): 27-32; <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=132585>.
- Vandepitte J, De Geest H, Jousten P. (1977) Subacute bacterial endocarditis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Report of a case with a review of the

- literature. *Journal of Clinical Pathology*. 1977 Sep;30(9):842-846. DOI: 10.1136/jcp.30.9.842.
- Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. Volume 3, Issue 2, April 1993, Pages 97–130, <https://doi.org/10.1093/glycob/3.2.97>.
- Vega, B. A., Belinka, B. A. Jr. and Kachlany, S. C. (2019) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin (LtxA.; Leukothera[®]): Mechanisms of action and therapeutic applications. *Toxins (Basel)*. 11(9), 489. doi: 10.3390/toxins11090489.
- Watanabe, H., Marsh, P. D. and Ivanyi, L. (1989) Antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* identified by immunoblotting with sera from patients with localized human juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis. *Arch Oral Biol*. 1989;34(8):649-656. doi: 10.1016/0003-9969(89)90020-4.
- Westling, K. and Vondracek, M. (2008) *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans* (HACEK) identified by PCR/16S rRNA sequence analysis from the heart valve in a patient with blood culture negative endocarditis. *Scand J Infect Dis*. 2008;40(11-12):981-983. doi: 10.1080/00365540802325922.
- Xie, H., Cook, G. S., Costerton, J. W., Bruce, G., Rose, T. M. and Lamont, R. J. (2000) Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol*. 2000 Dec; 182(24):7067-7069. doi: 10.1128/jb.182.24.7067-7069.2000.
- Yang, H. W., Asikainen, S., Doğan, B., Suda, R. and Lai, C. H. (2004) Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol* 2004 Apr;75(4):592-9. doi: 10.1902/jop.2004.75.4.592.
- Zambon, J. J. (1985) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1985 Jan;12(1):1-20. doi: 10.1111/j.1600-051x.1985.tb01348.x.
- Zdziarski P, Simon K, Majda J. (2003) Overuse of high stability antibiotics and its consequences in public and environmental health. *Acta Microbiol Pol*. 2003;52(1):5-13. PMID: 12916723.

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kamal Louh, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Isolierung von Oberflächenproteinen des Bakterienstammes *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* (DSM 11123) und Adhäsion an Kohlenhydrate, Englisch: Isolation of surface proteins of the bacterial strain *Aggregatibacter (Actinobacillus) Actinomycetemcomitans* (DSM 11123) and adhesion to carbohydrates, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9. Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

10. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Promotion unterstützt und mir auf unterschiedliche Art geholfen haben:

- Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Hägewald für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit
- Herrn Dr. Andreas Kage für seine Hilfe bei der praktischen Durchführung der Laborarbeiten und für die kompetente und freundliche Einweisung in die Labortätigkeit
- Prof. Dr. Jean-Pierre Bernimoulin als Chef und ‚Seele‘ der Abteilung der Parodontologie
- dem Robert Koch-Institut für die freundliche Einweisung bei der Anzucht von *A. actinomycetemcomitans*
- meiner Frau Boran und meinen Kindern für die dauerhafte Motivation bei der Fertigstellung dieser Arbeit