Aus dem Institut für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin
in Zusammenarbeit mit dem
Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Glykanbindungsspezifität von Lektinen kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Viviane Schüler
geboren in Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. R. Seemann

2. Prof. Dr. A. M. Schmidt-Westhausen

3. Priv.-Doz. Dr. C. Hannig

Datum der Promotion: 3. September 2010

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit gewidmet

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat.“

J. W. von Goethe

1 EINLEITUNG 9

2 LITERATURÜBERSICHT 11

2.1 ÄTIOLOGIE DER KARIES 11

2.1.1 Ätiologische Faktoren der Karies 12

2.1.2 Pellikel- und Plaquebildung 14

2.1.3 Die besondere Bedeutung der Mutans-Streptokokken 18

2.1.4 Adhäsionsmechanismen kariesrelevanter Mikroorganismen 20

2.1.5 Abwehrmechanismen der Mundhöhle 24

2.2 KARIESPRÄVENTION 29

2.2.1 Bisherige Ansätze im Bereich der Kariesprävention 29

2.2.2 Weiterführende Ansätze im Bereich der Kariesprävention 30

2.3 ZIELSETZUNG DER EIGENEN UNTERSUCHUNG 33

3 MATERIAL UND METHODE 35

3.1 GEWINNUNG BIOTINMARKIERTER BAKTERIELLER LEKTINE 36

3.1.1 Bakterielle Kultivierung 38

3.1.2 Biotinylierung der bakteriellen Oberflächenmembranproteine 40

3.1.3 Bakterielle Lyse 41

3.1.4 Filtration zur Lektingewinnung 41

3.2 BCA-TEST ZUR BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION 43

3.3 DEGLYKOSYLIERUNG DER BSA-GLYKOKONJUGATE 45

3.4 BESTIMMUNG DER BINDUNGSSPEZIFITÄT BAKTERIELLER HOMOGENATE MIT HILFE DES KOMPETITIVEN LEKTINBINDUNGS-INHIBITIONSASSAYS 46

3.4.1 ELISA-Testprinzip 46

3.4.2 Experimentelle Durchführung 49

3.4.3 Auswertung der photometrisch ermittelten Daten 53

3.5 SDS-GELELEKTROPHORESE MIT ANSCHLIEßENDER SILBERFÄRBUNG 54

3.5.1 Molekulargewichtsbestimmung der Proben mit Hilfe der SDS-PAGE 54

3.5.2 Vorbereitung der Proben 55

3.5.3 Durchführung der SDS-Gelelektrophorese 56
3.5.4 Detektion der Proteinbanden mittels Silberfärbung 57

3.6 BLOTTING ZUM NACHWEIS SPEZIFISCHER PROTEINE 58
3.6.1 Kontaktblot der zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine 58
3.6.2 Nachweis biotinylierter Proteinstrukturen 60
3.6.3 Nachweis glykosylierter, biotinylierter Proteinstrukturen 61

4 ERGEBNISSE 63

4.1 GEWINNUNG BIOTINYLIERTER OBERFLÄCHENMEMBRANPROTEINE KARIESÄTIOLOGISCH BEDEUTSAMER BAKTERIEN 63
4.1.1 Bakterielle Kultivierung 63
4.1.2 Bakterielle Aufreinigung 64

4.2 CHARAKTERISIERUNG DER GEWONNENEN BAKTERIELLEN HOMOGENATE 64
4.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung 64
4.2.2 Ermittlung der Bindungsspezifitäten der bakteriellen Homogenate mit Hilfe des Lektinbindungs-Inhibitionsassays 66
4.2.3 Darstellung des Gesamtproteins in der Gelelektrophorese 76
4.2.4 Molekulargewichtsbestimmung der im Gel dargestellten Proteine 76

4.3 CHARAKTERISIERUNG SPEZIFISCHER PROTEINE MITTELS KONTAKTBLOT 77
4.3.1 Effektivitätskontrolle 77
4.3.2 Nachweis biotinylierter Proteine 78
4.3.3 Nachweis biotinylierter Proteine mit entsprechender Bindungsspezifität 80
4.3.4 Vergleich der Proteinbanden auf glykosylierter und deglykosylierter Beschichtung 81
4.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse 83

5 DISKUSSION 85

5.1 VALIDITÄT DER LABORTECHNISCHEN UNTERSUCHUNGEN 87

5.2 METHODIK DER LABORTECHNISCHEN UNTERSUCHUNGEN 88
5.2.1 Auswahl der zu untersuchenden Bakterienspezies 88
5.2.2 Bakterielle Kultivierung & Isolation der spezifischen Oberflächenmembranproteine 89
5.2.3 Vorversuche zur Bestimmung optimaler Konzentrationen 90
5.2.4 Charakterisierung der Glykanbindungsspezifität bakterieller Lektine 90

5.2.5 Auswirkung unterschiedlicher Gelkonzentrationen 92

5.3 ERGEBNISSE DER LABORTECHNISCHEN UNTERSUCHUNGEN 93

5.3.1 Bedeutung der Deglykosylierung 93

5.3.2 Bedeutung der Bindungsspezifität 95

5.3.3 Darstellung des Gesamtproteins der bakteriellen Homogenate gegenüber den glykanspezifischen, biotinylierten Oberflächenmembranproteinen 96

5.3.4 Vergleich der Bindungsspezifität - *S. mutans* DSM 20523 vs. DSM 6178 98

5.3.5 Vergleich der Bindungsspezifität - *S. mutans* vs. *S. sobrinus* 101

5.4 SCHLUSSFOLGERUNGEN 104

5.5 PERSPEKTIVEN 105

6 ZUSAMMENFASSUNG 109

7 ABSTRACT 111

8 LITERATURVERZEICHNIS 113

9 ANHANG 127

9.1 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN 127

9.2 DANKSAGUNG 129

9.3 CURRICULUM VITAE 130

9.4 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 131

1 EINLEITUNG

Die World Health Organisation (WHO) zählt die Karies zu den häufigsten und am weitesten verbreiteten bakterienbedingten Erkrankungen des Menschen, deren Behandlung hohe Kosten im Gesundheitswesen verursacht. Fast jeder Erwachsene weltweit leidet unter Karies. Laut der Dritten Mundgesundheitsstudie (DMS III, 1997) des Instituts der Deutschen Zahnärzte verfügen nur 0,8 Prozent der 35- bis 44-Jährigen über naturgesunde Zähne [143]. Die DMS IV aus dem Jahr 2005 zeigt, dass sich dank erfolgreicher Präventionsmaßnahmen und guter zahnärztlicher Versorgung die Zahngesundheit vor allem bei Kindern und Jugendlichen deutlich verbessert hat [144]. Hierbei wird immer deutlicher eine Kariespolarisierung erkennbar, wobei der Großteil der durch Karies bedingten Krankheitslast eine verhältnismäßig kleine Personengruppe betrifft. Diese ungleiche Verteilung lässt sich in unterschiedlicher Ausprägung in allen Altersgruppen beobachten [48].

Trotz beachtlicher Reduktion der Kariesprävalenz nach Einführung wirksamer Präventionsmaßnahmen ist derzeit eine Stagnation dieses Prozesses zu beobachten. Nach aktuellen Schätzungen verursacht die Therapie der Karies in Deutschland noch immer Kosten von rund 12 Milliarden Euro/Jahr (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, www.gbe-bund.de, 2006). Aus diesem Grund handelt es sich bei Karies und Parodontitis um die wahrscheinlich kostenintensivsten bakterieninduzierten Erkrankungen, mit denen nahezu alle Menschen während ihres Lebens konfrontiert werden. Es erscheint daher zwingend erforderlich neben den sich in Anwendung befindlichen etablierten Strategien (wie Fluoridierungsmaßnahmen, Ernährungslenkung, Fissurenversiegelung) weitere Präventionsmaßnahmen zu erforschen und zu entwickeln, um die Kariesprävention weiter zu verbessern. Anstatt der bislang vorrangigen symptomatischen Therapie sollte dabei primär eine kausale Behandlung im Vordergrund stehen. Die zur Auslösung der Erkrankung führenden Faktoren sind heute allgemein bekannt.

Speicheluntersuchungen ergaben, dass bestimmte Glykokonjugate in der Lage sind, hochspezifisch an bakterielle Lektine zu binden. Sie bieten somit einen potentiellen Schutz, indem sie deren Adhärenz an Oberflächenstrukturen der Mundhöhle behindern [87, 194].

Vor diesem Hintergrund ergab sich als offene Fragestellung und Ziel der nachfolgenden Studie die Bindungsspezifität kariesätiologisch bedeutsamer Keime zu bestimmen, als Grundlage einer potentiellen Kariespräventionsmaßnahme auf dem Gebiet der antiadhäsiven Therapie.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 ÄTIOLOGIE DER KARIES

Karies ist ein multikausaler, dynamischer Prozess, bei dem es aufgrund eines gestörten Gleichgewichts zwischen De- und Remineralisation zur Zerstörung der Zahnhartsubstanz kommt (lat. *caries*: Morschheit, Fäulnis).

Historisch gesehen war die Wurmtheorie des berühmten Pariser Zahnarztes *Pierre Fauchard* im Jahr 1728 der früheste Versuch die Entstehung der Karies wissenschaftlich zu begründen [53]. Die Grundlage der heute allgemein anerkannten Theorie zur Kariesentstehung geht jedoch im Wesentlichen auf die chemisch-parasitäre Theorie nach *W. D. Miller* von 1892 zurück. Ohne die Mikroorganismen selbst genauer zu kennen, wusste er schon damals, dass diese bzw. deren Enzyme aus Kohlenhydraten der Nahrung Säuren bilden, die die Zahnhartsubstanzen demineralisieren [145]. Neben seinem veröffentlichten Buch „Die Mikroorganismen der Mundhöhle“ wurden seine in-vitro-Untersuchungen zur Erzeugung der „*künstlichen Caries*“ besonders bekannt.

Orland et al. [167, 168] konnten an keimfrei aufgezogenen Ratten zeigen, dass trotz extrem kohlenhydratreicher Diät keine Karies erzeugt werden konnte. Nach Kontamination mit kariogenen Mikroorganismen war dies jedoch möglich. Mit Hilfe weiterer Tierversuche an Ratten und Hamstern entwickelte *Keyes* ein Modell der Kariesätiologie, das mit wenigen Ergänzungen bis zum heutigen Tag Gültigkeit besitzt. *Keyes* [91] ging in seinen Überlegungen von dem Zusammenspiel dreier ätiologischer Faktoren aus – „Zahn“, „Mikroorganismen“ und dem „Substrat“ für die Mikroorganismen. *König* ergänzte 1987 den Aspekt der Zeit, da eine Zerstörung der Zahnhartsubstanzen erst nach ausreichend langen oder häufigen Säureangriffen entsteht [103]. Erst durch das gleichzeitige Vorhandensein und Zusammenwirken all dieser Faktoren ist die Entstehung einer kariösen Läsion möglich.

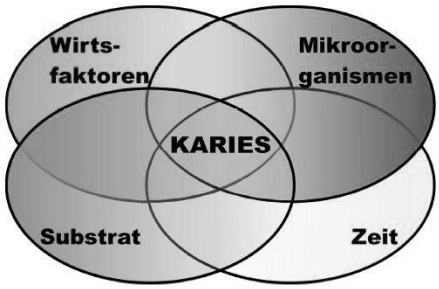


Abbildung 2-1:
Ätiologische Faktoren der Karies (nach [102])

2.1.1 ÄTIOLOGISCHE FAKTOREN DER KARIES

2.1.1.1 WIRTSFAKTOREN

Bronner verdeutlichte die Rolle des Wirts in der Ätiologie der Karies mit den Worten: *„It is paradoxical that the hardest of all tissues is so susceptible to lesions in living humans, while it is the most indestructible in the dead.“* [23].

Neben den lokalen Einflüssen im Mundraum sind auch einige genetisch bedingte Einflussgrößen ausschlaggebend für einen hohen oder niedrigen Kariesbefall. Dazu gehören die Mineralqualität des Zahnschmelzes, Zahnmorphologie und Zahnstellung, Speichelmenge und Qualität des Speichels sowie immunologische Faktoren [175, 191]. Die individuelle Bedeutung eines Faktors dieser multifaktoriellen Kariesgenese ist kaum zu evaluieren.

In Kapitel 2.1.5.1 wird explizit auf die antiadhäsive Wirkung des Speichels eingegangen. In Erklärungsmodellen der Karies werden neben diesen biologischen Faktoren auch sozioökonomische und verhaltensbezogene Faktoren, wie Erziehung, soziale Verhältnisse, Einkommenssituation und Gesundheitsverhalten einbezogen.

2.1.1.2 MIKROORGANISMEN

In der zunächst keimfreien Mundhöhle Neugeborener etabliert sich innerhalb von sehr kurzer Zeit eine komplexe mikrobielle Flora (vgl. 2.1.2.3 Die Plaqueflora). Auch *Streptococcus mutans*, der wesentliche Initiator der Karies und andere potenziell kariogene Mikroorganismen gehören bei den meisten Menschen in geringen Konzentrationen bereits in den ersten Lebensjahren unter physiologischen Bedingungen (neutraler pH-Wert, geringe kariogene Diät) dazu. *Caufield* et al. bestimmten den 19.-31. Lebensmonat als *window of infectivity* (Infektionsfenster) für die Übertragung der kariogenen Keime [30]. Diese erfolgt von Mensch zu Mensch, hauptsächlich über den Speichel der Mutter oder einer anderen Bezugsperson [120]. *S. mutans* ist erst nach Eruption des ersten Milchzahnes nachweisbar, da er nicht am desquamierenden Epithel von Zunge oder Mundschleimhaut haften kann [15].

Die Mikroorganismen finden im Mundraum geeignete Voraussetzungen in Bezug auf Feuchtigkeit, Temperatur, pH-Wert, Kohlendioxid- und Sauerstoffgehalt, wobei je nach Lokalisation diese Faktoren in ihrem Verhalten differieren können. Bis zu 10^{11} Bakterien/ml Speichel lassen sich in der Mundhöhle nachweisen. Unter physiologischen Bedingungen besitzen Menschen eine relativ stabile orale Flora, d. h. annähernd die gleichen Bakteriengattungen und Bakterienarten. Dabei besteht üblicherweise ein Gleichgewicht zwischen dem Wirt und der oralen apathogenen

Flora, an dem Speichel, externe Faktoren und bakterielle Faktoren gleichermaßen beteiligt sind. Eine kariogene Mikroflora entsteht dabei erst durch eine Verschiebung innerhalb der physiologischen Standortflora aufgrund veränderter ökologischer Verhältnisse innerhalb der Mundhöhle (ökologische Plaquehypothese), wie z. B. durch Änderung der Ernährungsgewohnheiten, Verminderung des Speichelflusses etc. [130, 131]. Dabei führt eine erhöhte kontinuierliche Verfügbarkeit fermentierbarer Kohlenhydrate zu einem erniedrigten pH-Wert innerhalb der Plaque. Auf längere Zeit wird dadurch die Vermehrung säuretoleranter und säureproduzierender Keime, wie Mutans-Streptokokken und Laktobazillen, stimuliert. Eine weitere Ansäuerung der Plaque und die Selektion kariogener Keime sind die Folge. Das Ergebnis ist die Zerstörung der bakteriellen Homöostasis der Plaque sowie ein gestörtes Gleichgewicht zwischen De- und Remineralisation zugunsten der Demineralisation, resultierend im Auftreten kariöser Läsionen.

2.1.1.3 SUBSTRAT UND ZEIT

Der Zusammenhang zwischen der nahrungsbedingten Aufnahme niedermolekularer, leicht vergärbarer Kohlenhydrate und dem Auftreten von Karies konnte in diversen tierexperimentellen [54, 167, 212] sowie in zahlreichen epidemiologischen Studien [68, 76, 134, 155, 188, 198] nachgewiesen werden. Zu den Kohlenhydraten in der Nahrung, die eine besondere Rolle bei der Kariesentstehung spielen können, gehören die Monosaccharide Glukose und Fruktose sowie die Disaccharide Saccharose, Maltose und Laktose.

Der Saccharose (Haushaltszucker) kommt in Bezug auf die Kariogenität eine besondere Bedeutung zu. Aufgrund ihrer besonderen biochemischen Eigenschaften ist sie das einzige Substrat für die Synthese extrazellulärer Polysaccharide, die die bakterielle Akkumulation kariesrelevanter Mikroorganismen begünstigt [237]. Hinzu kommt, dass es sich bei der Saccharose um die Form von Zucker handelt, die am häufigsten konsumiert wird.

Jedoch ist nicht allein die Art des Zuckers für das kariogene Potential ausschlaggebend, sondern auch dessen Konzentration und Konsistenz. *König* und *Mühlemann* belegten 1967, dass die Kariogenität des Zuckers ansteigt, je klebriger und feinkörniger dieser ist [104]. Durch das für die Mikroorganismen der Plaque entstehende Nahrungsreservoir resultiert ein länger andauernder Säureangriff auf die Zähne [84, 212]. Dabei spielt die Frequenz und Häufigkeit des Zuckerkonsums eine weitaus entscheidendere Rolle als die absolute Zuckermenge. Als klassischer Beleg dafür gilt die von *Gustafsson* et al. 1954 durchgeführte *Vipeholm-Studie*, die jedoch im Laufe der Zeit aus ethischer Sicht zunehmend kritisiert wurde [68]. Je öfter es zu zuckerhaltigen Zwischenmahlzeiten kommt, desto höher ist das Kariesrisiko. Gleiche Mengen Zucker zu den Hauptmahlzeiten resultieren in einem geringeren kariogenen Potential. Nur ausreichend lange Pausen zwischen

den einzelnen Phasen des Zuckerkonsums gewährleisten Regenerationsphasen, in denen der Speichel die Säuren neutralisieren und die angegriffene Zahnhartsubstanz remineralisieren kann.

2.1.2 PELLIKEL- UND PLAQUEBILDUNG

2.1.2.1 DIE ROLLE DES PELLIKELS

Die Besiedlung der Mundhöhle erfolgt durch die Adhäsion der Mikroorganismen an die Oberfläche der epithelialen Schleimhaut oder an die Zahnoberfläche [60]. Die Oberfläche der Zähne ist im wässrigen Milieu überwiegend negativ geladen. Kommt sie nach dem Zahndurchbruch bzw. nach einer gründlichen mechanischen Zahnreinigung mit Speichel in Kontakt, erfolgt innerhalb kürzester Zeit die Anlagerung von Ionen. Diese von *Arends* et al. als *hydration-layer* oder *Stern-layer* bezeichnete Schicht setzt sich zu ca. 90 % aus Kalziumionen und zu ca. 10 % aus Phosphationen zusammen [9]. Über die positiv geladenen Ca^{2+}-Ionen können sich eine Reihe organischer Komponenten aus dem Speichel, der Sulkusflüssigkeit und des bakteriellen Stoffwechsels anlagern [14, 16, 47]. Es kommt zur Bildung des von *Meckel* auch als *aquired pellicle* bezeichneten dünnen, organischen, azellulären Films [139]. Dieser Film bildet sich sowohl auf freiliegenden Zahnoberflächen als auch auf künstlichen Materialien. Nach 24 Stunden lässt sich eine Dicke von ca. 0,01-1 µm messen [111].

In die Reifung des Pellikels greifen weitere Bindungsmechanismen, wie kovalente Bindungen, Ionenbindungen, Ion-Dipol-Interaktionen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen ein [73, 74, 208]. So kommt es zu einer weiteren Adhäsion organischer Moleküle, sodass der Pellikel mit der Zeit an Dicke zunimmt und je nach Alter daraus eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung resultiert. Die Zusammensetzung des Pellikels wirkt dabei modifizierend auf die spätere Zusammensetzung der Plaque (adhäsionsselektive Wirkung).

Im Einzelnen besteht der Pellikel aus Proteinen (Albumin, Lysozym), Lipiden [201] und zum überwiegenden Anteil aus Glykoproteinen, wie Laktoferrin, IgA, Amylase und Speichelmuzin [117, 138]. Enzyme (Laktoperoxidasen, Lysozym, Glykosyltransferasen) zeigen auch nach Adsorption an der Zahnoberfläche noch enzymatische Aktivität [75, 171, 187].

Zu den Funktionen des Pellikels gehört die Herabsetzung der Demineralisierung der Zahnhartsubstanz. Bewirkt wird dies durch die vorhandenen Muzine und Lipide, indem sie als selektive Ionenbarriere wirken [157, 201]. Des Weiteren bildet das Schmelzoberhäutchen auf der Oberfläche der Zahnhartsubstanz eine Art Gleitfilm, der sowohl bei Artikulations- als auch Okklusionsbewegungen der Zähne vor einem gegenseitigen Abrieb schützt [158]. Neben diesen Schutz-

funktionen bilden die Pellikelbestandteile jedoch auch die Basis für die selektive Anlagerung für eine Reihe von Mikroorganismen. Speziell die Muzine erleichtern die Adhärenz der Bakterien [171]. Somit bildet die Entstehung des Pellikels die Grundlage für die initiale und dauerhafte Anlagerung plaquebildender Bakterien und der damit verbundenen möglichen Entstehung der Karies [8, 35, 59, 64, 119, 211].

2.1.2.2 PLAQUE-BILDUNG ALS VORAUSSETZUNG FÜR DIE KARIESENTSTEHUNG

Im Anschluss an die Bildung des Pellikels sind die Mikroorganismen mit Hilfe spezifischer Oberflächenrezeptoren in der Lage, sich in Form der Plaque, eines organisierten, strukturierten Belags, auf der Zahnoberfläche anzusiedeln. Die Plaquebildung ist ein wichtiger Faktor zur Bildung der für die Kariesentstehung notwendigen kritischen Säurekonzentration. Ohne Plaque entsteht keine Karies [11, 167, 168].

Während *Miller* im Jahre 1890 noch davon ausging, dass Bakterien im Speichel direkt für die Entstehung kariöser Läsionen verantwortlich sind, war *Black* bereits 1889 der Überzeugung, dass Karies nur dann entstehen kann, wenn die verursachenden Mikroorganismen klebrige Beläge zur Adhäsion an die Zahnoberfläche bilden [17]. *Black* sprach von *"gelatinous plaques by which they [microorganisms] are glued to the surfaces of the teeth"* und prägte damit den Begriff der Plaque.

Die Existenz von Kleinstlebewesen auf den Zähnen befindlicher Beläge wurde jedoch bereits 1683 von *van Leeuwenhoek* vermutet [228]. Da Bakterien zu dieser Zeit noch völlig unbekannt waren, berichtete er von einer Vielzahl morphologisch unterschiedlicher „*little animals*".

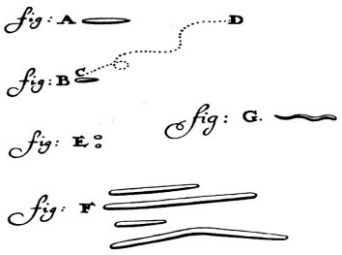


Abbildung 2-2:
Leeuwenhoeks Zeichnungen der Zahnbelagsbakterien in seinem Brief an die Royal Society of London, 1683 [170]

Socransky et al. fanden heraus, dass die menschliche Zahnplaque ca. $1{,}7 \times 10^{11}$ Mikroorganismen pro Gramm Nassgewicht enthält und revidierten so die bis dahin vorherrschende Meinung, die Plaque bestünde in erster Linie aus Speiseresten [206].

Da sich die Zahnoberfläche im Gegensatz zu den Schleimhäuten der Mundhöhle nicht ständig erneuert, können sich die Mikroorganismen auf der Zahnoberfläche ansammeln und vermehren.

Fehlende Mundhygienemaßnahmen unterstützen dabei den ungestörten Zuwachs. Bei entsprechender Substratzufuhr entsteht so eine differenzierte Zahnplaque, die in diesem Zustand nicht mehr durch die Selbstreinigungskräfte der Mundhöhle entfernbar ist.

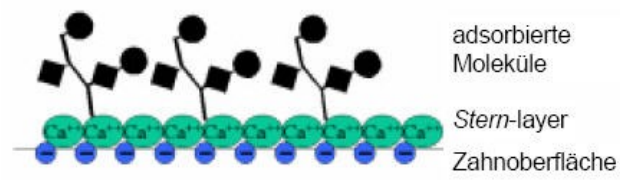


Abbildung 2-3:
Pellikelbildung
Bildung eines dünnen azellulären Films bestehend aus organischen Komponenten des Speichels, der Sulkusflüssigkeit und des bakteriellen Stoffwechsels. Die Anlagerung an die Zahnoberfläche erfolgt über die positiv geladenen Kalziumionen des Stern-layers [192].

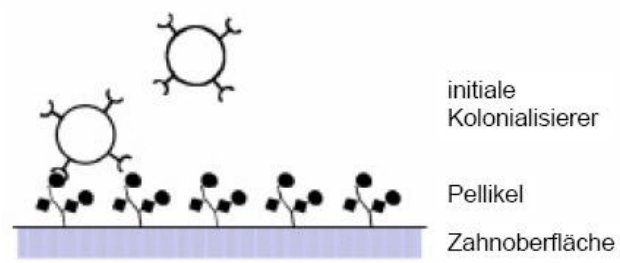


Abbildung 2-4:
Plaquebildung durch mikrobielle Adhäsion
Selektive Anlagerung der Mikroorganismen an die Strukturen innerhalb des Pellikels erfolgt über spezifische Oberflächenmembranproteine (Adhäsine) [192].

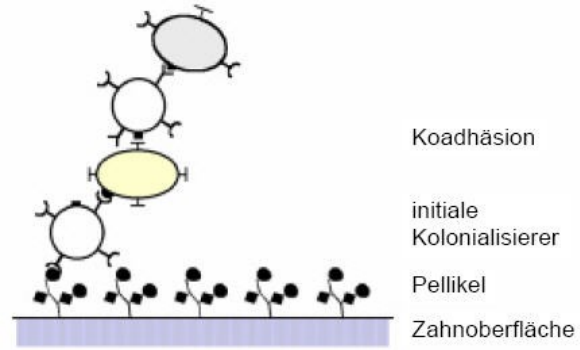


Abbildung 2-5:
Plaquereifung
Wachstum der Plaque durch bakterielle Koaggregation und Vermehrung der Mikroorganismen innerhalb des strukturierten Zahnbelags. Bildung eines komplexen Biofilms, bestehend aus Speichelbestandteilen, Mikroorganismen, deren Stoffwechselprodukte sowie Nahrungsresten [192].

Die etablierte Plaque lässt sich als komplexer Biofilm, d. h. als strukturierter, zäher, verfilzter Zahnbelag aus Speichelbestandteilen, bakteriellen Stoffwechselprodukten, Nahrungsresten und lebenden sowie toten Bakterienzellen beschreiben [103]. Es handelt sich dabei um eine Symbiose hoch organisierter, miteinander in Wechselwirkung und gegenseitiger Abhängigkeit stehender Mikroorganismen [133]. Das kariogene Potential ist dabei entscheidend abhängig vom Alter und der molekularen Zusammensetzung der Plaque.

2.1.2.3 DIE PLAQUEFLORA

In mehreren Studien zur Untersuchung der Plaqueflora konnte nachgewiesen werden, dass sich die Etablierung der Plaque in mehreren Stadien vollzieht. Dabei kommt es innerhalb weniger Tage zu einer deutlichen Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung innerhalb der Plaque.

Die frühe Plaqueflora besteht primär (ca. 90 %) aus grampositiven Kokken, speziell *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* und *Streptococcus mitis biovar 1* [160]. Deren besondere Ausstattung mit pellikelbindenden Adhäsinen erklärt ihre Rolle als Pionierkeime in der Besiedlung von Zahnoberflächen [183]. Unter den Bakterien herrscht eine hohe Selektivität und Spezifität in Bezug auf die Lokalisation der Adhärenz und den Adhärenzmechanismus (vgl. Kapitel 2.1.4). So ist *Streptococcus salivarius* als einer der häufigsten im Speichel vorkommenden Mikroorganismen interessanterweise nur in geringer Menge in der Plaqueflora enthalten. Auch *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus* machen in der Regel nur einen sehr geringen Anteil der initialen Plaqueflora aus. Speziell *S. mutans* adhäriert trotz der Möglichkeit extrazelluläre Polysaccharide zu bilden primär nur sehr wenig effizient an die Zahnoberfläche. Mit zunehmendem Alter der Plaque kommt es zu einer Verschiebung der kokkendominierten Plaque zu einer, die hauptsächlich durch grampositive Stäbchen, vor allem Aktinomyzeten, beherrscht wird [220]. Die vorbereitenden Pionierbakterien, die erst die ökologische Grundlage für andere Bakterien schaffen, sind in der reifen Plaque nicht mehr vorzufinden. Während zunächst eindeutig die grampositiven Mikroorganismen dominieren, bildet sich bei fehlender Zahnpflege nach ca. ein bis drei Tagen eine Plaqueflora aus, die zunehmend gramnegative Mikroorganismen enthält [66, 207]. Grampositive Kokken bilden dann nur noch etwas über 50 % der gesamten Mikroflora [64, 220]. Es kommt zu einem deutlichen Anstieg von Veillonellen, (hauptsächlich *V. parvula* und *V. alcalescens*). Vermehrt treten auch gramnegative Stäbchen, Fusobakterien und Filamente [122] sowie später Spirillen und Spirochäten hinzu, sodass nach ca. zwei bis drei Wochen das komplexe Bild einer etablierten Plaque erreicht ist.

Die bakterielle Adhärenz ist von einer anfänglich reversiblen, lockeren Bindung in eine irreversible, konsolidierende Bindung übergegangen [64]. Natürliche Reinigungsmechanismen reichen in diesem Stadium zur Entfernung der Plaque nicht mehr aus.

Durch ein stetes Plaquewachstum ändern sich auch die Sauerstoffbedingungen im Inneren der Plaque. Bereits neun Tage nach Beginn der Plaquebildung überwiegen fakultativ und obligat anaerobe Mikroorganismen [178]. Eine etablierte Plaque besteht aus dicht gepackten Bakterien (60-70 Vol.-%), die in einen großen Anteil amorpher, organischer Plaquematrix aus extrazellulären Polysacchariden (EPS) eingebettet sind [159]. Bei den extrazellulären Polysacchariden handelt es sich um bakterielle Stoffwechselprodukte, bestehend aus Fruktanen und Glukanen. Sie werden durch bakterielle Fruktosyl- und Glukosyltransferasen aus Saccharose synthetisiert und bilden im

Fall der Fruktane ein Reservesubstrat, im Fall der Glukane bei entsprechender glykosidischer Verknüpfung (α-1,3) eine unlösliche Matrix [103, 166].

In einer ausgereiften Plaque herrscht ein relativ stabiles Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Bakterien und ihrer Umgebung. Die Bakterien funktionieren als eine koordinierte, räumlich organisierte und metabolisch abgestimmte mikrobielle Gemeinschaft [132]. Auf diese Weise wird in der Regel die Etablierung pathogener Mikroorganismen unterdrückt. Bei Störung dieses gesunden Gleichgewichts, vor allem durch die häufige Aufnahme niedermolekularer Kohlenhydrate und der damit verbundenen Säureproduktion einzelner Mikroorganismen, können pathogene Prozesse ausgelöst werden. Das im Inneren der Plaque entstehende saure Milieu begünstigt die Entstehung einer ökologischen Nische für azidophile Mikroorganismen, wie *S. mutans* und Laktobazillen, in der sie sich optimal vermehren können. Auf diese Weise kann sich aus einer bisher physiologischen Flora eine kariogene entwickeln, die gekennzeichnet ist durch einen erhöhten Anteil kariesspezifischer Mikroorganismen [21].

2.1.3 DIE BESONDERE BEDEUTUNG DER MUTANS-STREPTOKOKKEN

Bereits 1924 gelang dem englischen Naturwissenschaftler *Clarke* die Isolation von Keimen aus kariösen Läsionen der Mundhöhle menschlicher Individuen [36]. Da bis zu diesem Zeitpunkt nur runde Streptokokken bekannt waren, hielt er sie aufgrund ihrer ovalen Form für Mutanten und wählte für die neu entdeckte Form die Artbezeichnung *mutans*, abgeleitet vom lateinischen Verb *mutare* (verändern).

Viele Forscher fanden derzeit jedoch keine Assoziation zwischen dem beschriebenen Keim und dem Auftreten kariöser Läsionen. Andere behaupteten, dass es sich bei dem bereits bekannten *Lactobacillus acidophilus* und dem neubeschriebenen *S. mutans* um den gleichen Mikroorganismus handelt [26]. Aufgrund dieser Meinungsverschiedenheiten geriet *S. mutans* zunächst in Vergessenheit. Erst viele Jahre später wurden von *Fitzgerald* und *Keyes* erneut kariesinduzierende Streptokokken beschrieben, die dem von *Clarke* beschriebenen *S. mutans* entsprachen [55]. Nach tierexperimentellen Versuchen von *Sims* erfolgte 1961 eine Neubeschreibung von *S. mutans* und die Hinterlegung des Bakterienstammes in der *National Collection of Type Cultures* in London als NCTC 10449 [200].

Im Laufe der Zeit entstanden zahlreiche Klassifizierungen innerhalb der *Streptococcus mutans*-Gruppe anhand serologischer, genetischer und biologischer Merkmale [22, 37, 124, 152, 169, 199]. So erfolgte mit Hilfe serologischer Techniken die Einteilung in neun Serotypen (a-k). Anhand verschiedener DNA-Analysen wurden die Genotypen I-IV festgelegt und die Unterscheidung der Biotypen I-V resultierte aufgrund von speziellen Stoffwechseleigenschaften der Mikro-

organismen. Die Literatur macht jedoch deutlich, dass die unterschiedlichen Klassifikationen in keiner eindeutigen Beziehung zueinander dargestellt werden können [71, 124].

Auf Grundlage der genetischen Heterogenität wurden zunächst vier verschiedene *Streptococcus mutans*-Arten unterschieden [37], drei weitere folgten im Laufe der Zeit [13, 39, 233]. Dabei orientierte sich die Namensgebung der Bakterien primär an den ursprünglichen Isolationsquellen [38]. Die Arten *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. ferus*, *S. macacae* und *S. downei* werden heute alle unter dem Namen der Mutans-Streptokokken zusammengefasst [40]. Definitionsgemäß handelt es sich dabei um Streptokokken, die in der Plaque nachgewiesen werden können, in der Lage sind Mannitol und Sorbitol zu verstoffwechseln, in Anwesenheit von Saccharose extrazelluläre Polysaccharide synthetisieren können und die, mit Ausnahme von S. ferus, im Tiermodell Karies induzieren können [124].

Die kariesätiologisch bedeutsamsten Arten der Mutans-Streptokokken beim Menschen sind *S. mutans* und *S. sobrinus*. Während *S. mutans* mit 70-100 % und *S. sobrinus* mit < 30 % am häufigsten in der kariogenen Plaque anzutreffen sind, kommen *S. cricetus* und *S. rattus* nur extrem selten vor (*S. ferus*, *S. macacae* und *S. downei* spielen in der humanen Plaque keine Rolle) [124]. Sowohl in zahlreichen Tierexperimenten [55, 92] als auch in diversen klinischen Studien [107, 108, 123, 124] konnte gezeigt werden, dass es sich bei *S. mutans* (Serotyp c) um die Spezies handelt, die nachweislich am häufigsten von den über 1000 im Mund vorzufindenden Bakterienspezies mit Karies korreliert [7].

Aufgrund der Vielzahl seiner Virulenzfaktoren spielt *S. mutans* bei der Kariesentstehung eine herausragende Rolle [55]. *S. mutans* besitzt im Vergleich zu anderen Mikroorganismen einen sehr schnellen Zuckermetabolismus, über den in Anwesenheit von Zucker (Saccharose) große Mengen organischer Säuren [44, 156, 217] und extrazelluläre Polysaccharide (Glukane) [83] synthetisiert werden können. Besonders die Produktion der am stärksten apatitauflösenden Milchsäure ist bei der Kariesentstehung und -progression von großer Bedeutung [156]. Die Bildung der klebrigen, wasserunlöslichen, extrazellulären Polysaccharide (Mutane) ermöglicht den Plaquebakterien eine bessere Adhäsion an der Zahnoberfläche und somit die Etablierung einer adhäsiven und hochgradig kariogenen Plaque. Des Weiteren können einige Mutans-Serotypen auch intrazelluläre Polysaccharide in Form von Speicherkohlenhydraten bilden und so auch in Zeiten geringer Substratzufuhr Säure produzieren. Zu dieser azidogenen Eigenschaft der Mikroorganismen kommt die Säuretoleranz, die es *S. mutans* im Gegensatz zu anderen oralen Keimen erlaubt, auch unter sauren Bedingungen (pH < 5) in der Plaque weiterhin zu existieren und aufgrund seiner weiterhin funktionsfähigen Zuckertransportsysteme sogar in diesem Milieu organische Säuren zu bilden. *S. sobrinus* gilt als der stärkste Säurebildner unter den Mutans-Streptokokken. Da diese Eigenschaft auch typisch für Laktobazillen ist, werden sie als Indikator für eine aktive Karies

angesehen. Während insbesondere die Mutans-Streptokokken eine wichtige Rolle bei der Initiation und Progression der koronalen Karies spielen, kommt den Laktobazillen eine stärkere Bedeutung für die Progredienz fortgeschrittener Läsionen zu [19, 124].

2.1.4 ADHÄSIONSMECHANISMEN KARIESRELEVANTER MIKROORGANISMEN

Die Adhäsion bakterieller Mikroorganismen gilt als Grundvoraussetzung für die Kolonisation in Umgebungen, die einem steten Flüssigkeitsstrom ausgesetzt sind. Sie stellt somit einen wichtigen Virulenzfaktor für die Entstehung von Karies und Parodontitis dar [64]. So ist die Adhäsion eine der initialen Stufen des „infektiösen" Prozesses [161]. Für die Entstehung der Karies ist die bakterielle Adhäsion sowohl bei der Bindung an den Pellikel als auch beim Aufbau der Plaque von zentraler Bedeutung. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Bakterien über eine Reihe von unspezifischen und spezifischen Mechanismen an ihren Wirt adhärieren können. Dabei ist die bakterielle Besiedlung von Zahnoberflächen neben einer passiven Retention in makroskopisch oder mikroskopisch sichtbaren Zahnvertiefungen und -unregelmäßigkeiten in erster Linie von komplexen Adhäsionsphänomenen gekennzeichnet [49].

Mikroorganismen können initial durch physiko-chemische Vorgänge adhärieren. Bei diesen unspezifischen Kräften handelt es sich ab einem Abstand von 50 nm zwischen dem Bakterium und der entsprechenden Oberfläche, um die sogenannten Van-der-Waals-Kräfte [28, 209]. Bei weiterer Annäherung spielen elektrostatische Kräfte [173] sowie, bei weniger als 2 nm Distanz, hydrophobe und sterische Wechselwirkungen eine Rolle [3]. Das Ausmaß des Abstands zwischen Mikroorganismus und Oberfläche hängt vom aktuellen pH-Wert und der Kationenkonzentration ab. Mit sinkendem pH-Wert oder steigender Kationenkonzentration vermindert sich entsprechend der Abstand.

Diese unspezifischen Wechselwirkungen reichen jedoch für eine dauerhafte Adhäsion der Mikroorganismen als Voraussetzung für eine Plaquebildung nicht aus [28, 60, 209]. Eine spezifische Adhäsion der Bakterien erfolgt über die äußere Schicht (Glykokalyx) und den aus Proteinen bestehenden Fortsätzen (Pili) [24]. Mit Hilfe der Pili gelingt den Bakterien der Übergang zur irreversiblen Adhäsion, indem sie in der Phase der reversiblen Anlagerung den durchschnittlichen Abstand von ca. 10 nm zwischen ihnen und der Zahnoberfläche überbrücken können [60]. Eine dauerhafte Adhäsion kann an Rezeptoren der Pellikeloberfläche, durch Wechselwirkungen zwischen den Bakterien oder an Strukturen innerhalb der Plaque erfolgen [28, 60, 85, 101, 109, 110, 234].

Auf molekularer Ebene spielen neben Protein-Protein-Wechselwirkungen vor allem lektinvermittelte Bindungen an Glykane der Wirtsoberfläche eine entscheidende Rolle [163, 195]. Mit Hilfe hochspezifischer Bindungsproteine auf der bakteriellen Membranoberfläche, sogenannter Adhäsine (meist Lektine mit kohlenhydratbindenden Rezeptoren), sind die Mikroorganismen in der

Lage, spezifisch an Rezeptoren des Wirts zu binden [59]. Man geht davon aus, dass bakterielle Adhäsine mehrere Bindungsdomänen besitzen und somit die Beteiligung mehrerer Bindungsarten an der Adhäsion ermöglichen.

Von verschiedenen Plaquebakterien konnten Adhäsine bereits lokalisiert und ihre Aminosäurestruktur bestimmt werden [2, 89, 163]. Bei dem fibrillären Protein AgI/II mit einem Molekulargewicht von ca. 185 kDa handelt es sich um ein Adhäsin von *S. mutans*. AgI/II ist auch bekannt als SAI/II (englischer Sprachgebrauch), MSL-1, IF [109], P1 [56], Protein B [180, 182], PAc [164] oder SR [4]. AgI/II von *S. mutans* zeigt strukturelle Gemeinsamkeiten mit dem für *S. sobrinus* identifizierten Oberflächenadhäsin SpaA. Während *S. mutans* jedoch an spezifische im Pellikel oder oberflächlich auf adhärenten Mikroorganismen fixierte Speichelproteinrezeptoren bindet, adhäriert *S. sobrinus* vornehmlich an pellikelgebundene Glykane [70]. Die Lokalisation der Bindungsdomäne innerhalb des AgI/II ist bisher nicht endgültig geklärt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass AgI/II-defekte *S. mutans*-Mutanten nur in geringem Ausmaß an experimentell erzeugte Pellikel auf Hydroxylapatit adhärieren [100]. Des Weiteren lässt sich durch freies AgI/II kompetitiv die Adhäsion von *S. mutans* verhindern [100, 149]. Sowohl dieser Versuch als auch viele weitere Untersuchungen zeigen, dass auch bei der Bindung von Mutans-Streptokokken an die Zahnoberfläche Adhäsionsmoleküle von entscheidender Bedeutung sind [8, 35, 60, 93]. Die Adhäsion kann dabei durch verschiedene Speichelkomponenten vermittelt werden. Dazu gehören die prolinreichen Proteine (PRP) [63], Saliva-Agglutinin (SAG) [109, 112] und Proteine aus der Muzin-Fraktion submandibulären-sublingualen Speichels [93].

Des Weiteren produziert *S. mutans*, wie bereits erwähnt, extrazelluläre Glukanstrukturen mit Hilfe von drei bekannten Glukosyltransferasen (GTFB, GTFC und GTFD). Dabei synthetisieren GTFB und GTFC wasserunlösliche Glukane mit α-1,3-glykosidischer Bindung und GTFD wasserlösliche Glukane mit α-1,6-glykosidischer Bindung [215]. Über die α-1,3-glykosidische Bindung sind die bakteriellen Enzyme in der Lage Kohlenhydratanteile auf der Bakterienoberfläche mit denen auf der Pellikeloberfläche bzw. mit sich in der Plaque befindlichen Kohlenhydraten zu verknüpfen. So trägt auch dieser als *sucrose-dependent adherence* bezeichnete Prozess entscheidend zur Adhäsion des Keims an der Zahnoberfläche bei [166].

Eine Vielzahl weiterer Studien gibt Hinweise auf die Spezifität und Selektivität dieser Adhäsionsmechanismen [60, 227]. So können unterschiedliche Bakterien in ganz spezifischen Bereichen der Mundhöhle nachgewiesen werden. *S. salivarius* dominiert beispielsweise mit ca. 45 % aller Streptokokken im Speichel, bildet allerdings nur 3,4 % der Streptokokken auf der Zahnoberfläche. *S. sanguis* besitzt hingegen einen Anteil von 16,5 % im Speichel und 55,6 % auf der Zahnoberfläche [227]. Dieser Tropismus ist nur durch das Vorhandensein spezifischer Bindungsmechanismen erklärbar.

Unter der Selektivität versteht man die Fähigkeit der Bakterien an bestimmte Moleküle erst nach deren Konformationsänderung zu binden. So können zum Beispiel einige Subspezies der Bakterienstämme *Actinomyces*, *Bacteroides* und *Streptococcus mutans* erst dann an prolinreiche Proteine (PRPs) des Speichels binden, wenn eine Konformationsänderung dieser Glykoproteine durch die Adsorption an Hydroxylapatit stattgefunden hat. Offensichtlich können Rezeptoren durch die Adsorption zerstört oder andere, bisher versteckte Rezeptoren (sogenannte Kryptitope) aktiviert werden [60]. So sind die Bakterien mit einem Mechanismus ausgestattet, der es ihnen ermöglicht, sich erst dann an die Speichelproteine zu binden, wenn diese ihnen eine Beziehung zur Zahnoberfläche gewährleisten können. Erhöhte Enzymkonzentrationen von Proteasen und Neuraminidasen, verbunden mit schlechter Mundhygiene oder verursacht durch die Bakterien selbst, können ebenfalls Kryptitope in Erscheinung treten lassen und somit auf das Geschehen der bakteriellen Kolonisation Einfluss nehmen [60].

Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass sich verschiedene Bakterien ökologische Vorteile schaffen, indem sie sogenannte biooberflächenaktive Substanzen ausscheiden, die andere Bakterien an der Adhäsion hindern [28].

Des Weiteren spielt auch bei den interbakteriellen Wechselwirkungen die lektinvermittelte Adhäsion eine entscheidende Rolle [101, 110, 234]. Aus bisherigen Untersuchungen geht hervor, dass Mutans-Streptokokken über verschiedene Adhäsionsmechanismen verfügen, mit denen sie an Plaquebakterien binden können. Neben Rezeptoren der verschiedenen Bakterien sind auch hier Speichelglykoproteine an der Koaggregation der Bakterien beteiligt.

2.1.4.1 DIE LEKTINVERMITTELTE ADHÄSION

Laut Definition handelt es sich bei Lektinen um kohlenhydratbindende Proteine oder Glykoproteine nicht immunologischer Herkunft, die gegenüber gebundenen Kohlenhydraten keine enzymatische Aktivität aufweisen [1, 97, 98, 125]. Der Begriff *Lektin* (lat. *legere*: auswählen) wurde 1954 von *Boyd* und *Shapleigh* geprägt [226]. Lektine kommen bei Viren, Bakteriophagen, anderen Mikroorganismen, aber auch bei Pflanzen, Avertebraten und Vertebraten in gelöster Form oder als Membranbestandteile vor [32, 95, 121]. Als erstes Lektin wurde das Ricin des Wunderbaumes (Ricinus communis) vor mehr als 120 Jahren von *Hermann Stillmark* in Estland entdeckt [57]. Nachdem den Lektinen zunächst keine weitere Bedeutung geschenkt wurde, konnten in den letzten zwei Jahrzehnten mehr als 500 Lektine strukturell nachgewiesen werden [197].

Beim Menschen sind sie als Zellbestandteile je nach Lokalisation an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt. Dazu gehören z. B. die Qualitätskontrolle der Proteinsynthese, die Organisation der zellulären Plasmamembran und der transmembranäre Stofftransport, die zellu-

läre Signalerkennung und Signaltransduktion sowie die Apoptose und Zelllyse [105]. Auf Bakterienoberflächen befinden sich Lektine häufig als Bestandteil von Pili, den aus Proteinen bestehenden fadenförmigen Fortsätzen [50, 195, 196]. Den Bakterien dienen sie in Form von Oberflächenmembranproteinen zur Adhäsion an Wirtsrezeptoren. Häufig werden sie auch als Adhäsine oder Agglutinine bezeichnet [163]. Außerdem befinden sich Lektine auf Malignomzellen und bestimmen damit deren Affinität zu bestimmten Organen [58, 197].

Als Lektinrezeptoren dienen Oligosaccharide (Glykane) allein sowie die in Glykoproteinen, Polysacchariden oder Glykolipiden integrierten Oligosaccharide [225]. Die Lektin-Kohlenhydrat-Bindung ist dabei ausgesprochen spezifisch, da die Lektine mit einer hohen Affinität an Oligosaccharide binden können. Die Glykanspezifität der Lektine ergibt sich aus ihrer chemischen Struktur [197]. Sie kann sich bei verschiedenen Bakterien erheblich voneinander unterscheiden. Am Beispiel von *Escherichia coli* konnten auch innerhalb von Subspezies wesentliche Unterschiede in der Spezifität der Glykanbindung nachgewiesen werden [126]. Das hohe Maß an Variabilität der Lektinrezeptoren resultiert aus der großen Anzahl verschiedenster, sie bildender Kohlenhydratmoleküle (Galaktose, Mannose, Fukose, N-Acetyl-Galaktosamin, N-Acetyl-Glukosamin, Sialinsäure) und der Art ihrer glykosidischen Bindung. Sowohl für *S. mutans* als auch für *S. sobrinus* konnten verschiedene glykanbindende Proteine (*gbps* = *glycan binding proteins*) mit Hilfe der Affinitätschromatographie nachgewiesen werden [12, 203]. Obwohl die biologische Bedeutung dieser Proteine noch nicht vollständig geklärt ist, konnte in mehreren Studien durch den Einsatz *gbp*-defekter Mutanten deren entscheidender Einfluss bei der Biofilmformation aufgezeigt werden [127].

Wie bereits erwähnt, spielt sowohl bei der bakteriellen Adhäsion an die Rezeptoren des Pellikels bzw. an Strukturen innerhalb der Plaque als auch bei der Adhäsion oraler Mikroorganismen untereinander die Lektinbindung eine wichtige Rolle [65, 101, 110, 161, 234]. Die Protein-Kohlenhydrat-Bindung kommt dabei hauptsächlich zwischen den bakteriellen Lektinen und den Glykanstrukturen der Speichelglykoproteine zustande. So unterstützt das 400 kDa schwere *Saliva* Agglutinin, adsorbiert an Hydroxylapatitoberflächen, die Adhäsion von *S. mutans* [29]. Bei der interbakteriellen Koaggregation, der rezeptorvermittelten Adhäsion zwischen verschiedenen Bakterien [101], kann *S. mutans* zum Beispiel über Speichelglykoproteine an *S. sanguis* und *A. viscosus* binden [110]. Die von *Lamont* et al. beobachtete Adhäsion von *S. mutans* an diese Erstbesiedler der Zahnoberfläche wurde ebenfalls durch *Saliva* Agglutinin vermittelt [109, 182].

Neben der lektinvermittelten Bindung an die Zahnoberfläche kann auf die gleiche Art und Weise auch eine Adhäsion an die Schleimhaut des Wirtsorganismus hergestellt werden. Somit ist die lektinvermittelte Adhäsion möglicherweise auch für die Entstehung von entzündlichen Erkrankungen des Parodontalapparates von großer Bedeutung [64]. Da die Fähigkeit zur lektinvermit-

telten Adhäsion einen wichtigen Virulenzfaktor sowohl für kariesrelevante als auch für parodontalpathogene Bakterien darstellt, gewinnt die Untersuchung der Lektine zunehmend an Bedeutung.

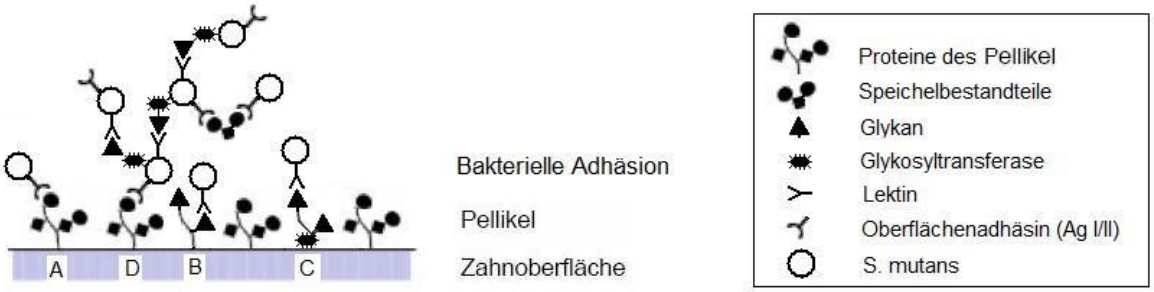


Abbildung 2-6: *Bakterielle Adhäsionsmechanismen von S. mutans (Schema modifiziert nach [70])*
A) Adhäsion über Oberflächenadhäsine (z. B. AgI/II) an Pellikel-Proteine
B) Adhäsion über Lektine an direkt an der Zahnoberfläche adhärierte Glykane
C) Adhäsion über Lektine an über eine Glykosyltransferase-Kopplung adhärierte Glykane
D) Entstehung eines pathogenen Biofilms durch Akkumulation von S. mutans über Lektin und Oberflächenadhäsine (z. B. Ag I/II) an Glykane, Glykosyltransferasen und Speichelkomponenten

2.1.5 ABWEHRMECHANISMEN DER MUNDHÖHLE

Der menschliche Organismus ist durch den Einsatz sogenannter *host defence*-Faktoren in der Lage, sich bis zu einem gewissen Grad gegen eindringende oder in erhöhter Menge auftretender Mikroorganismen zu schützen und somit das Ausmaß der bakteriell induzierten Erkrankung eigenständig zu modifizieren. Die der Protektion und Abwehr dienenden körpereigenen Produkte werden mittels des Sulkusfluids [33] und vor allem des Speichels [232] in die Mundhöhle transportiert.

Die kariesprotektive Bedeutung des Speichels wird durch das klinische Bild der Xerostomie, Mukoviszidose oder Immunsuppression infolge krankhafter Hypofunktion der Speicheldrüsen mit verringerter Speichelflussrate deutlich. Mehrere Studien belegen die verstärkte orale Besiedlung durch *S. mutans* und *Candida albicans* [86, 165] und die damit verbundene frühzeitige, stärker ausgeprägte Manifestation von Karies und Parodontopathien [153].

Neben der rein mechanischen Spülwirkung des Speichels deckt er durch seine komplexen Inhaltsstoffe vielseitige, den Mundraum schützende Aufgabenbereiche ab. Aufgrund seiner Glykoprotein-, Bikarbonat- und Phosphatbestandteile reguliert er die Homöostase der Mundhöhle. pH-Wert-Schwankungen können so bis zu einem gewissen Grad durch die Säure-Neutralisation ausgeglichen und auf einem pH-Wert von ca. 6,7 (Ruhespeichel) konstant gehalten werden, ohne dabei den kritischen pH-Wert, bei dem es zur Auflösung der Zahnhartsubstanz

kommt, zu unterschreiten. Dabei ist die Pufferkapazität umso größer, je höher die Speichelsekretionsrate ist [103]. Die Pufferwirkung basiert dabei vor allem auf zwei bekannten Systemen mit folgender chemischer Reaktionsgleichung:

Bikarbonat-Puffer	$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$
Phosphat-Puffer	$H_2PO_4^- \leftrightarrow HPO_4^{2-} + H^+$

Der bakteriell bedingten Demineralisation des zu ca. 97 % aus Hydroxylapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) bestehenden Zahnschmelzes wirken Kalzium- und Phosphationen aus dem Speichel entgegen. Mit Hilfe der Speichelproteine Cystatin, Histatin, Statherin sowie PRPs, die intrapellikulär das Überangebot von Kalzium- und Phosphationen in Lösung halten, ist eine Remineralisation des Zahnschmelzes und die Aufrechterhaltung des unter physiologischen Bedingungen bestehenden Mineralisationsgleichgewichts ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \leftrightarrow 10\ Ca^{2+} + 6\ PO_4^{3-} + 2\ OH^-$) in der Mundhöhle möglich [78, 157].

Fluoridionen (F^-) im Speichel wirken protektiv auf die Zahnhartsubstanz, indem sie das dynamische Gleichgewicht zwischen De- und Remineralisation in Richtung Remineralisation verschieben [219]. Des Weiteren zeigt Fluorid in Form von Flusssäure (HF) antibakterielle Eigenschaften, indem es in der Lage ist, in die Bakterienzellen einzudringen und in dissoziierter Form durch eine Übersäuerung des bakteriellen Zytoplasmas eine unspezifische Hemmung verschiedener bakterieller Enzyme zu bewirken [72].

Weitere unspezifische antibakterielle Schutzfaktoren stellen die Glykoproteine Peroxidase und Laktoferrin sowie das Protein Lysozym dar. Die besonders auf orale Streptokokken wirkende Toxizität der Speichel-Peroxidase [221] beruht auf der Fähigkeit, in Anwesenheit des dem aeroben bakteriellen Stoffwechsel entstammenden Wasserstoffperoxids (H_2O_2), Thiocyanat (SCN^-) aus dem Speichel zu Hypothiocyanat ($OSCN^-$) zu oxidieren. Das entstandene Hypothiocyanat behindert den mikroorganischen Metabolismus, indem es Enzyme der Glykolyse und des Kohlenhydrattransports und folglich die Säureproduktion sowie die H_2O_2-Bildung hemmt [185]. Laktoferrin ist in zahlreichen Sekreten zu finden und wird von Drüsenzellen sowie polymorphkernigen Leukozyten synthetisiert [24]. Seine bakteriostatischen Eigenschaften basieren auf der Fähigkeit, die für einige Mikroorganismen zum Wachstum essentiellen Eisenionen (Fe^{3+}) im Speichel zu binden [25]. Lysozym hat eine begrenzt bakterizide Wirkung, indem es die β-1,4-Bindung zwischen N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetylmuraminsäure des Mureins (Zellwandbestandteil) grampositiver Bakterien hydrolytisch spalten und damit die vollständige Auflösung der Bakterien herbeiführen kann [24].

Zum spezifischen sekretorischen Immunsystem des Speichels gehören, wie in anderen Körperflüssigkeiten auch, alle Immunglobulinklassen. Jedoch zeigen die, den antigenspezifischen Schutz vermittelnden Antikörpertypen im Vergleich zu Blutserum und Sulkusfluid ein differierendes prozentuales Verhältnis [179].

	IgG	IgM	IgA
Speichel	14	2	194
Serum	12500	800	2200
Sulkusfluid	3500	250	1100

Tabelle 2-1: *Konzentration der Immunglobulinklassen in µg/ml* [179]

Von den im Gesamtspeichel vorhandenen Immunglobulinen stammt nur das Immunglobulin A aus dem Speicheldrüsensekret. IgG und IgM gelangen in kleinen Mengen neben polymorphkernigen und mononukleären Leukozyten als entzündliches Exsudat über das aus dem gingivalen Saum austretende Sulkusfluid in den Speichel. IgD und IgE sind aufgrund ihrer geringen Konzentration in der Regel nicht nachweisbar.

Mestecky prägte 1987 den Begriff des Mukosa-assoziierten Immunsystems (MALT, *mucosa associated lymphoid tissue*) /sekretorischen Immunsystems, welches sich aus sekretorischem Speichel-IgA (s-IgA), Lymphozyten und Plasmazellen zusammensetzt [141]. Im Zusammenspiel ist es in der Lage, die Schleimhautoberfläche vor löslichen Antigenen und der Adhäsion von Mikroorganismen zu schützen [223]. *Hajishengallis* et al. zeigten in Laborversuchen, dass durch spezifisches IgA gegen das Oberflächenadhäsin AgI/II von *S. mutans* dessen Adhäsion an *saliva coated hydroxyapatite* (S-HA) gehemmt werden konnte [69]. Auch am Menschen konnte eine Steigerung der sekretorischen Antikörperproduktion gegen *S. mutans* durch die Verabreichung von Antigenen angeregt werden [31, 142, 202]. Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass hohe s-IgA-Werte mit einem niedrigen Kariesbefall korrelieren können, zeigen Untersuchungen zur gezielten Produktion gegen *S. mutans*-gerichtete sekretorische IgA-Antikörper zum Teil sehr widersprüchliche Ergebnisse [106, 190, 204]. Einen möglichen Erklärungsversuch liefert das immunologische Konzept der *Low-/High-zone*-Toleranz. *Zinkernagel* konnte zeigen, dass die Reaktion des sekretorischen Immunsystems von der Dosis, der Lokalisation und dem Zeitpunkt der Antigenapplikation abhängt [238]. Während Antigene, die das lymphatische Gewebe der Speicheldrüsen nicht in ausreichend hoher Dosis und für einen ausreichend langen Zeitraum erreichen, immunologisch ignoriert werden *(Low-zone*-Toleranz), können Antigene, die in sehr hohen Dosen und mit einer sehr langen Verweildauer einwirken infolge einer immunologischen Desensibilisierung die Aktivität des Immunsystems blockieren *(High-zone*-Toleranz). Die Bestimmung der Antigen-

Exposition sowie die Quantifizierung der immunologischen Toleranz spielen demnach bei der spezifischen Immunabwehr eine entscheidende Rolle.

2.1.5.1 ANTIADHÄSIVE WIRKUNG DES SPEICHELS

Zu den Glykokonjugaten gehören prinzipiell zwei Arten: Glykoproteine und Glykolipide. Der stets vorhandene kovalent gebundene Kohlenhydrat- bzw. Glykananteil dieser Moleküle kann sowohl in seiner Dimension von Monosacchariden bis zu Polysacchariden als auch in der Art seiner glykosidischen Verknüpfung variieren. Bei verknüpften Polysacchariden handelt es sich meist um verzweigte Heteroglykane, die aus verschiedenen Monosacchariden (häufig Glukose, Galaktose, Mannose, Fukose, N-Acetylhexosamin, Neuraminsäure) zusammengesetzt sind [172].

Im Speichel dominieren die Glykoproteine, die je nach Ausmaß der Glykosylierung dem Sekret seinen serösen bzw. mukösen Charakter verleihen. Je nach Art der Verbindung zwischen dem Protein- und Kohlenhydratanteil unterscheidet man O- und N-glykosidisch gebundene Glykoproteine. Im mukösen Sekret der Glandulae submandibulares und sublinguales sowie der meisten kleinen Speicheldrüsen dominieren hohe Anteile an O-Glykanen. Sie enthalten charakteristischerweise keine Mannose. Die Kopplung des Glykananteils an das Protein erfolgt über Serin oder Threonin. Demgegenüber zeichnet sich das seröse Sekret der Glandula parotidea durch N-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydratreste über Asparagin mit hohen Konzentrationen von Mannose, endständiger Fukose- und Sialinsäureresten sowie wenigen oder keinen N-Acetyl-Galaktosaminen aus [222]. Muköse Glykoproteine sind im Vergleich zu den serösen Glykoproteinen stärker glykosyliert. Sie können einen Glykananteil von bis zu 90 % besitzen [116]. Insgesamt bilden die Muzine als muköse Glykoproteine und die prolinreichen Proteine (PRP) als seröse Glykoproteine den Hauptanteil der 60 g Speichelglykoproteine, die pro Tag durchschnittlich sezerniert werden.

Aufgrund einer möglichen unterschiedlichen glykosidischen Verknüpfung zwischen dem Protein- und Glykananteil werden die Muzine in zwei Untergruppen unterteilt: die MG1 = *high-molecular-weight mucin glycoprotein* mit O-glykosidischen Bindungen und die MG2 = *low-molecular-weight mucin glycoprotein* mit O- und einem geringen Anteil an N-glykosidischen Bindungen. Tabelle 2-2 stellt die unterschiedlichen Eigenschaften von MG1, MG2 und PRP aufgrund der strukturellen Variabilität vergleichend dar.

	PRP *prolinreiches Protein*	**MG1** *high-molecular-weight mucin glycoprotein*	**MG2** *low-molecular-weight mucin glycoprotein*
Proteinanteil [%]	60	15	30
Glykananteil [%]	30	78	68
Größe des Glykananteils	14 Monosaccharide	4-16 Monosaccharide	2-7 Monosaccharide
Anzahl der Glykanketten	6	46	170
Art der glykosidischen Bindung	GlcNAc-Asn	GalNAc-Thr/Ser	GalNAc-Thr/Ser & (GlcNAc-Asn)
Molekulargewicht [kDa]	39	$< 10^3$	200-250

Tabelle 2-2: *Vergleich der Eigenschaften der mukösen MG1- und MG2- sowie der serösen PRP-Speichelglykoproteine aufgrund der strukturellen Variabilität* [116]

Insgesamt differieren die Glykokonjugate in ihren terminalen und inneren Glykanstrukturen, in der Anzahl, der Art und der Reihenfolge der Monosaccharide innerhalb eines Glykans sowie in der Art der Glykan-Aminosäure-Verknüpfung. Aufgrund ihrer daraus resultierenden großen Variabilität und ihrem ubiquitären Vorkommen in nahezu allen Lebensformen sind sie in der Lage, die unterschiedlichsten Funktionen zu erfüllen, teilweise mit sich überlappenden Funktionsbereichen. Tabelle 2-3 stellt einige Funktionsmöglichkeiten beispielhafter Glykoproteine im menschlichen Körper dar.

Funktion	**Glykoprotein**
Enzym	Ribonuklease B, Prothrombin, β-D-Glukoronidase
Transport	Ceoruloplasmin, Transferrin
Hormon	Thyroglobulin, Erythropoetin, Chorongonadotropin
Immunsystem	γ-Globulin (besonders s-IgA), Blutgruppensubstanzen, HL-Antigene
Plasma & Körpersekrete	Fibrinogen, Mukus

Tabelle 2-3: *Glykoproteine und ihre Funktion* [147]

Den Glykoproteinen des Speichels werden sowohl unspezifische als auch spezifische Abwehrmechanismen zugeschrieben. Der unspezifische Schutz durch muköse Glykokonjugate beruht wahrscheinlich auf ihren mechanischen Eigenschaften [18]. Das auf den Glykananteil der Glykoproteine zurückzuführende spezifische Abwehrsystem basiert hingegen auf einer Abhängigkeit zwischen Oligosacchariden und Lektinen [87]. In zahlreichen Studien konnten die verschiedensten

spezifischen Kopplungen zwischen bestimmten bakteriellen Lektinen und einzelnen Glykanen beschrieben werden [41, 42, 61, 65, 69, 94, 118, 193].

Die für die bakterielle Lektinbindung erforderlichen Glykane sind genetisch determiniert. Sie befinden sich auf allen Zelloberflächen, im exokrinen Sekret und sind Bestandteil des Pellikels bzw. der bakteriellen Plaque [177]. Während sie so einerseits als Bestandteil des Pellikels einen Gleitfilm bilden [5] bzw. eine Art Schutzbarriere auf allen Mukosaoberflächen, stellen sie gleichzeitig das Substrat für die Interaktion mit Bakterien dar [116]. Die Rolle der Lektine bei der Adhäsion an Oberflächen der Mundhöhle wurde bereits in Kapitel 2.1.4.1 dargestellt.

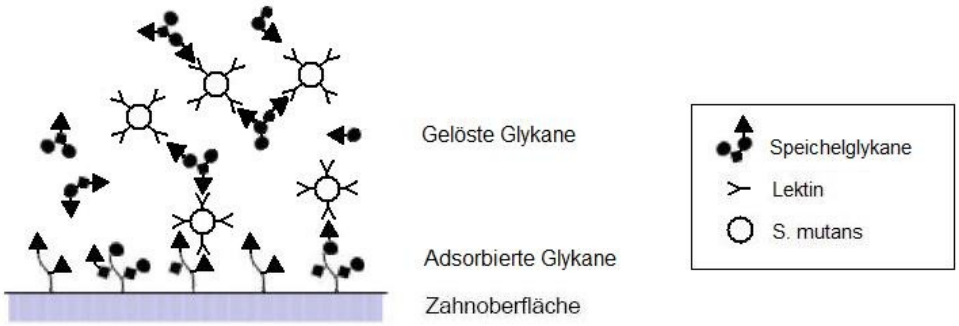


Abbildung 2-7: *Glykane des Speichels vermitteln in adhärierter Form als Bestandteil des Pellikels die Adhäsion von Bakterien; in gelöster Form sind sie in der Lage, die bakteriellen Lektine kompetitiv zu inhibieren*

Die Bindung zwischen Glykanen und bakteriellen Lektinen ist inhibierbar [62, 87]. So können auch Bindungen bakterieller Lektine an oberflächengebundene Kohlenhydrate durch im Speichel gelöste Oligosaccharide oder Glykokonjugate kompetitiv gehemmt werden [65]. Auf die Möglichkeit der Inhibition dieser lektinvermittelten Adhäsion durch den Einsatz spezifischer Glykanstrukturen im Sinne einer antiadhäsiven Therapie wird in Kapitel 2.2.2.1 näher eingegangen.

2.2 KARIESPRÄVENTION

2.2.1 BISHERIGE ANSÄTZE IM BEREICH DER KARIESPRÄVENTION

Es existiert bereits eine Vielzahl etablierter Maßnahmen zur Kariesprävention. Orientiert man sich an dem von *König* im Jahr 1987 entwickelten Modell, so zählen all die Methoden zu den sinnvollen Maßnahmen der Kariesprävention, die entweder die ätiologischen Faktoren „Substrat“, „Zeit“ und „Mikroorganismen“ beeinflussen oder jene, die die Abwehrfaktoren des Wirts stärken. Maßnahmen zur individualprophylaktischen Plaquekontrolle durch intensive Mundhygieneinstruktionen, die Ernährungslenkung, regelmäßige Fluoridierungsmaßnahmen und auch

Fissurenversiegelungen bilden Eckpfeiler in der derzeitigen Kariesprophylaxe [96]. Durch die konsequente Einführung dieser Präventionsmaßnahmen konnte ein kontinuierlicher Rückgang der Kariesprävalenz (*caries decline*) erfolgen [51, 136]. Anhand neuerer Studien ist jedoch zu erkennen, dass die anfänglich zu beobachtenden Erfolge stagnieren [135]. Man stößt mit den bislang eingesetzten Präventionsstrategien an ihre Grenzen. Ansätze neuer potentieller Präventionsstrategien bilden daher die Grundlage für einen weiteren notwendigen Schritt in der Kariesprävention.

2.2.2 WEITERFÜHRENDE ANSÄTZE IM BEREICH DER KARIESPRÄVENTION

Eine Vielzahl wissenschaftlicher Studien beschäftigt sich mit der Untersuchung der sogenannten Probiotischen oder Replacement-Therapie, deren Ziel die selektive und dauerhafte Verdrängung eines pathogenen Keims durch einen gentechnisch modifizierten, apathogenen Keim darstellt, der in der Lage ist, den Ausbruch der Krankheit zu verhindern. Erste klinische Versuche zeigten sehr zuverlässige Ergebnisse ohne jegliches Auftreten von Nebenwirkungen [80, 82]. Schwierigkeiten ergeben sich bei der Einführung des Mutanten in die Mundhöhle bereits *S. mutans*-infizierter Individuen [216]. Die Fähigkeit des gentechnisch modifizierten Keims das antibakteriell wirksame Peptid Mutacin zu bilden, verschafft ihm jedoch durch die Inhibition des Wachstums aller anderen Mutans-Streptokokken einen entscheidenden Selektionsvorteil [81]. Langzeitstudien sowie erste Anwendungen bei menschlichen Individuen zur Absicherung der gentechnischen Stabilität des Mutanten und seiner kontrollierten Ausbreitung ohne die Begünstigung anderer pathogener Mikroorganismen stehen noch aus. Trotz gewisser ethischer und ökologischer Bedenken bietet diese Strategie einen interessanten Ansatz zur Kariesprävention.

Ähnliche Fragen stellen sich beim Einsatz „probiotischer“ Antibiotika. *Eckert* et al. entwickelten antimikrobiell wirksame synthetische Peptide (STAMPs = *specifically (or selectively) targeted antimicrobial peptides*), bestehend aus einem Spezies-spezifischen Zielpeptid und einem antimikrobiellen Peptid mit weitem Spektrum zur gezielten Eliminierung von *S. mutans* bei gleichzeitiger Erhaltung der apathogenen Standortflora [46]. Erste klinische Studien befinden sich in derzeitiger Anwendung.

Einen weiteren Ansatzpunkt bezüglich einer potentiell zukünftigen Präventionsstrategie bildet die Kariesimmunisierung, wobei erste Immunisierungsversuche bereits in den frühen 70er Jahren durchaus erfolgreich verliefen. Durch die Injektion abgetöteter Zellen von *S. mutans* konnte die Besiedlung der Zahnoberfläche mit *S. mutans* und die nachfolgende Kariesentwicklung reduziert werden [20, 113]. Allerdings erscheint gerade der Versuch dieser aktiven Immunisierung gegen die als primär nicht lebensbedrohlich einzustufende Erkrankung Karies aus ethischen Gründen und aufgrund der Gefahr nicht auszuschließender Kreuzreaktionen [146] als nicht unproblematisch und

damit nach Risikoabwägung für den breiten Einsatz als nur wenig geeignet. Aktuelle Studien beschäftigen sich mit einer entsprechenden Stimulation des mukosalen Immunsystems in der Mundhöhle durch vorwiegend intranasale oder tonsilläre Applikation von Antigenen gegen die für die bakterielle Kolonisation und Akkumulation wichtigen Bestandteile, wie das Oberflächenadhäsin AgI/II, die Glykosyltransferasen und die glykanbindenden Proteine (Lektine) [218]. Die damit erzielte Produktion gegen *S. mutans*-gerichtete sekretorische IgA-Antikörper im Speichel ist jedoch sehr variabel und oftmals nur gering ausgeprägt. Weitere Studien sind daher erforderlich, um die für eine mukosale Immunisierung gegen *S. mutans* optimal geeignete Vakzine zu entwickeln und den resultierenden kariespräventiven Effekt bei menschlichen Probanden abzusichern [181].

Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer passiven Immunisierung anhand einer topischen Applikation von Antikörpern, die mit den molekularen Mechanismen der bakteriellen Adhärenz interferieren. Unerwünschte systemische Nebenwirkungen ließen sich bislang nicht feststellen [99, 128]. Nachteilig stellt sich hier jedoch die fehlende Immunreaktion des Menschen und die damit verbundene, auf nur wenige Monate beschränkte Wirkungsdauer dar [129]. Auch bei dem Versuch einer Kariesimmunisierung sind die ökologischen Bedenken bezüglich der Konsequenzen durch die Verschiebung der Zusammensetzung der oralen bakteriellen Mikroflora nicht zu unterschätzen.

2.2.2.1 ANTIADHÄSIVE THERAPIE

Eine weitaus weniger kritisch zu betrachtende Möglichkeit der Beeinflussung des Kariesgeschehens resultiert aus der Wechselwirkung zwischen bakteriellen Oberflächenproteinen vom Lektintyp und den an diese bindenden Oligosaccharidstrukturen. Da die Bindung von pathogenen Mikroorganismen mittels mikrobieller Adhäsine (Lektine) an Rezeptormoleküle des Wirtsorganismus einen entscheidenden Schritt in der Entwicklung einer Infektion darstellt [60], zielt diese Therapie darauf ab, die Adhäsion am Wirkort zu inhibieren, um somit den Ausbruch der Krankheit zu verhindern [90]. Allerdings wurde auf dem Gebiet der antiadhäsiven Therapie in Bezug auf eine mögliche Kariesreduktion bisher nur wenig wissenschaftliche Forschung betrieben.

Wie in Kapitel 2.1.5.1 bereits diskutiert, wird den natürlich im Speichel sezernierten Glykanstrukturen eine gewisse Schutzfunktion zugesprochen. In ausreichender Konzentration zur Verfügung stehend, sind sie in der Lage, die lektinvermittelte Adhäsion pathogener Keime an oberflächengebundene Kohlenhydrate kompetitiv zu inhibieren [66, 117, 161]. Eine Besiedlung der oralen Oberfläche über die bakteriellen Lektine ist somit nur eingeschränkt bzw. nicht mehr

möglich [65]. Von *Kage* et al. wurde diese Form des Oberflächenschutzes als Oligosaccharid-Lektin-abhängiges Abwehrsystem bezeichnet [87].

In einer Studie untersuchten *Seemann* et al. den Speichel Berliner Schüler bezüglich dessen Gehalt an bestimmten Glykanstrukturen [194]. Es zeigten sich signifikante Unterschiede im Glykanmuster des Speichels zwischen Kindern mit hohem und niedrigem Kariesrisiko. Im Gegensatz zum Speichel von Kindern mit hoher Karies- bzw. bakterieller Aktivität konnte im Speichel kariesfreier Kinder eine höhere Konzentration an β-D-Galaktosyl-Reste-tragenden Glykanen nachgewiesen werden. Unter dem Aspekt, dass die Adhäsion von *S. mutans* durch diese Glykane behindert wird, wäre eine Korrelation zwischen dem Glykangehalt und der Kariesinzidenz denkbar.

Eine weiterführende Studie beschäftigte sich mit der Frage nach einer erhöhten Produktion dieser spezifischen Glykokonjugate bei einer Zunahme der Exposition gegenüber pathogenen Mikroorganismen im Mundraum [43]. Auf die ansteigende Bakterienzahl reagieren die Speicheldrüsen mit einer reflektorischen Steigerung der Mukusproduktion im Sinne einer mengen- und konzentrationsmäßig veränderten Sekretion. Die sich darstellenden Verschiebungen der prozentualen Anteile der untersuchten lektinspezifischen Rezeptoren sprechen für einen bakteriellen Einfluss auf die Glykokonjugatsynthese bzw. für eine Reaktion des Organismus auf eine bakterielle intraorale Veränderung. In diesem Zusammenhang kann durch diese *first line of defence* von einer frühzeitigen, dem verzögert einsetzenden Immunsystem vorgeschalteten, antibakteriellen Abwehr des Körpers ausgegangen werden [87]. Im Gegensatz zur Antigen-spezifischen sekretorischen Immunabwehr (s-IgA) ist beim Oligosaccharid-Lektin-abhängigen Schutz keine Erstimmunisierung notwendig. Um diese Erkenntnisse gezielt im Rahmen der Kariesprophylaxe auszunutzen, könnte die Zufuhr spezifischer Glykanstrukturen die Etablierung kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien auf der Zahnoberfläche erschweren.

In anderen Bereichen der Medizin, wie z. B. bei Infektionen des Urogenitaltraktes mit *Escherichia coli*, *Heliobacter pylori* oder Viren erfolgte bereits nach Bestimmung der Adhäsinspezifität des Pathogens [162] der Einsatz entsprechender Strategien [10, 150, 213]. Möglicherweise eröffnet die Verwendung von Proteoglykangemischen, die einer Adhäsion von Keimen entgegenwirken, die Möglichkeit der kostengünstigen Produktion ausreichender Mengen antiadhäsiver Substanzen, die zur Bekämpfung bakterieller Infektionen auch an anderer Stelle eingesetzt werden können [90]. Dieser Ausblick gewinnt insbesondere vor dem Hintergrund zunehmender Resistenzen gegenüber Antibiotika [77] an Bedeutung, da aufgrund des Wirkmechanismus rein antiadhäsiv wirkender Substanzen keine Resistenzbildungen oder andere Nebenwirkungen zu erwarten sind.

So ließ sich die Bindung von *S. mutans* an *saliva-coated hydroxyapatite* (S-HA) durch verschiedene Glykanstrukturen inhibieren [34, 65, 114, 117, 193]. Dabei scheint der Galaktose eine besondere

Bedeutung bei der Besiedlung der Zahnoberflächen zuzukommen [65, 114, 151]. Ein aus Preiselbeersaft gewonnenes *high-molecular-weight non-dialysable material* (NDM) mit einem hohen Oligosaccharidanteil besitzt antiadhäsive Eigenschaften gegenüber einer Reihe von Bakterien [27, 210, 224, 229, 230, 236]. Durch die Behinderung der interbakteriellen Koaggregation [229] und über die Inhibition der für den Aufbau der Matrix aus extrazellulären Polysacchariden notwendigen Glykosyl- und Fruktosyltransferasen [210] gelang mit Hilfe des Extraktes eine signifikante Reduktion von *S. mutans* im Speichel.

Da am Kariesgeschehen verschiedene pathogene Bakterien beteiligt sind und aufgrund der Tatsache, dass die meisten Pathogene verschiedene Adhäsine besitzen, deren Aktivität von den aktuellen Lebensbedingungen abhängt, müssen die pathogenen Bakterien zunächst genauer bezüglich ihrer Bindungsspezifität charakterisiert werden. Studien zur genauen Charakterisierung der Glykanbindungsspezifität kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien liegen derzeit noch nicht vor, stellen jedoch im Zusammenhang mit der antiadhäsiven Therapie einen interessanten Ansatz bezüglich einer potentiellen Präventionsstrategie im Bereich der Kariesprävention dar.

2.3 ZIELSETZUNG DER EIGENEN UNTERSUCHUNG

Aus der Literaturrecherche geht deutlich hervor, dass den Glykokonjugaten bei der bakteriellen Adhäsion pathogener Mikroorganismen an Rezeptoren der Mundhöhle eine zentrale Bedeutung zukommt. Neben ihrer adhäsionsvermittelnden Funktion sind sie in der Lage, die lektinvermittelte Bindungsfähigkeit pathogener Keime an oberflächengebundene Kohlenhydrate kompetitiv zu inhibieren. Da die bakterielle Adhäsion den ersten Schritt bei der Besiedlung der Zahnoberfläche darstellt, spielt dieser antiadhäsive Mechanismus in Anbetracht einer möglichen Kariespräventionsstrategie eine besondere Rolle. Basierend auf der Kenntnis der genauen Lektinspezifität pathogener Keime, sollte es möglich sein, durch Supplementierung der passenden Glykanstruktur die Adhäsion gezielt zu unterbinden, ohne die residente apathogene Standortflora zu beeinflussen.

Vor dem Hintergrund der besonderen Bedeutung der Mutans-Streptokokken im Kariesgeschehen, sollen die Oberflächenmembranproteine (Lektine) der beiden kariesätiologisch bedeutsamsten Bakterienarten *S. mutans* und *S. sobrinus* isoliert und auf biochemischer Ebene untersucht werden, um sie bezüglich ihrer Glykanbindungsspezifität zu charakterisieren. Das Vorhandensein bislang festgestellter Bindungsspezifitäten der Mutans-Streptokokken soll verifiziert, eventuell weitere Bindungsspezifitäten identifiziert und Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten innerhalb zweier *S. mutans*-Subspezies sowie zwischen *S. mutans* und *S. sobrinus* sollen evaluiert werden.

Ziel dabei war die Etablierung eines begrenzt aufwendigen Verfahrens mit möglichst standardisierten Routine-Methoden zur einfachen, schnellen und reproduzierbaren Analyse bakterieller Oberflächenmembranproteine auf biochemischer Ebene.

Für die vorliegende Arbeit ließen sich daraus folgende konkrete Fragestellungen ableiten:

1) Können die bisher beschriebenen Bindungsspezifitäten der Mutans-Streptokokken bestätigt werden?

   Hypothese: Es ist anzunehmen, dass *S. mutans* Oberflächenmembranproteine mit einer Galaktosyl-Spezifität aufweist.

2) Sind die Lektine der bakteriellen Membranoberfläche der Mutans-Streptokokken jeweils spezifisch für eine einzige Glykanstruktur oder können weitere Bindungsspezifitäten identifiziert werden?

   Hypothese: Der Nachweis antiadhäsiver Eigenschaften verschiedener Glykanstrukturen ist sehr wahrscheinlich.

3) Welche Aussagen können bezüglich der Bindungsspezifität beim Vergleich von *S. mutans*-Subtypen und *S. sobrinus* gemacht werden?

   Hypothese: Es ist zu erwarten, dass die unterschiedlichen Arten der Mutans-Streptokokken verschiedene Spezifitäten bezüglich der Bindung von Glykanstrukturen aufweisen.

3 MATERIAL UND METHODE

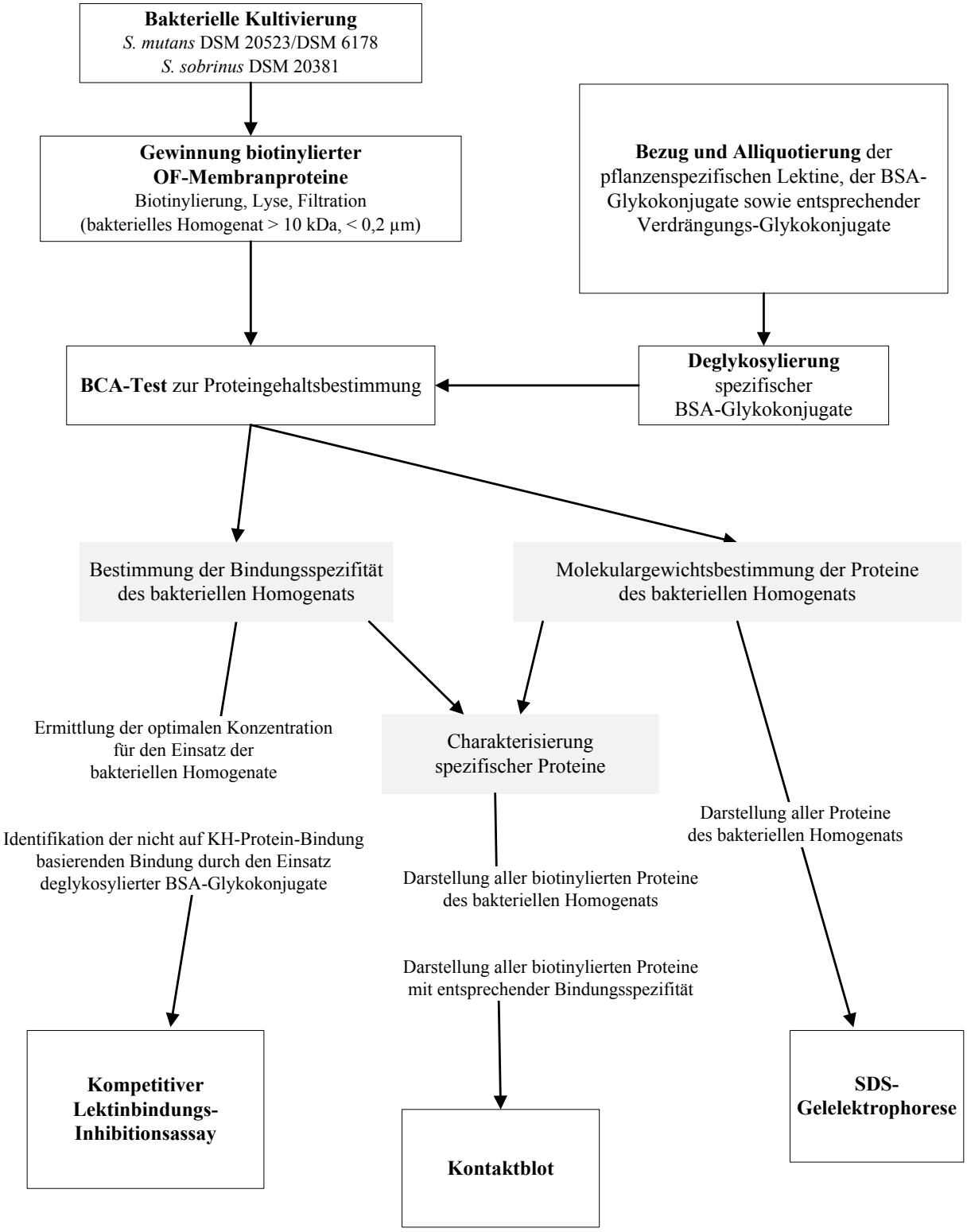


Abbildung 3-1: *Analysenstrategie zur Charakterisierung bakterieller Lektine*

Die dargestellte Abbildung gibt zunächst einen Überblick über die eingesetzten Verfahren und deren zeitliche Abfolge. All die zur Anwendung gekommenen Materialien und Lösungen sind in den jeweiligen Kapiteln detailliert dargestellt.

3.1 GEWINNUNG BIOTINMARKIERTER BAKTERIELLER LEKTINE

Für die Gewinnung biotinmarkierter bakterieller Lektine waren eine Reihe von Aufbereitungs- und Filtrationsschritte notwendig. Zunächst mussten die zu untersuchenden Bakterien in ausreichendem Maße unter entsprechenden Bedingungen kultiviert werden. In der sich anschließenden Biotinylierung, Lyse und Filtration der gewonnenen Bakterien wurden deren bakterielle Oberflächenmembranproteine biotinmarkiert und in Form eines bakteriellen Homogenats > 10 kDa, < 0,2 µl isoliert.

Abbildung 3-2 verdeutlicht schematisch den Ablauf zur Gewinnung biotinmarkierter Oberflächenmembranproteine der Keime *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 sowie *S. sobrinus* DSM 20381.

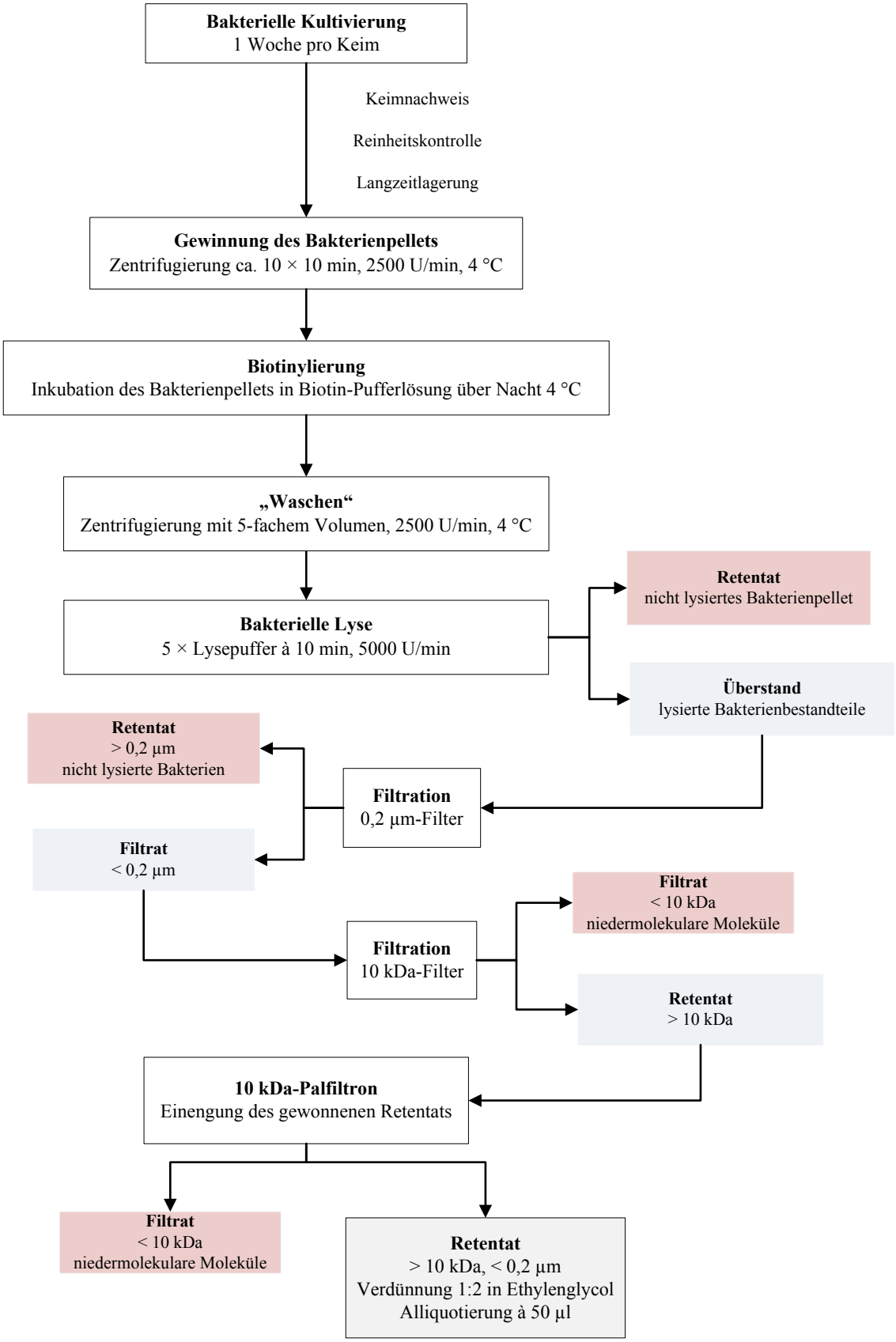


Abbildung 3-2: *Schematischer Ablauf zur Gewinnung biotinmarkierter bakterieller Oberflächenmembranproteine > 10 kDa, < 0,2 µm*

3.1.1 BAKTERIELLE KULTIVIERUNG

Beide *Streptococcus mutans*-Arten (DSM 20523 und 6178) sowie *Streptococcus sobrinus* (DSM 20381) wurden in lyophilisierter Form von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, D-Braunschweig) bezogen. Laut Herstellerangaben wurden die drei Keime aus dem Dentin kariöser Zähne isoliert. Es handelt sich um die zwei kariesätiologisch bedeutsamsten humanpathogenen Arten, wobei *S. mutans* zu 70-100 % und *S. sobrinus* zu < 30 % in der kariogenen Plaque anzutreffen ist [124].

Die bakterielle Kultivierung verlief über einen Zeitraum von drei Wochen im Institut für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin im Charité Campus Virchow-Klinikum. Für jede der drei fakultativ anaeroben grampositiven Kokken herrschten dabei die gleichen Anzuchtsbedingungen: jeder Keim wurde separat unter sterilen, mikroaerophilen Verhältnissen auf universellem Nährmedium (CASO-Bouillon, heipha, D-Eppelheim) im Zeitrahmen von einer Woche im Brutschrank (Incucell 222, MMM Medcenter, D-Gräfelfing) bei 37 °C aufgezogen. Zur Verhinderung der Ausbildung eines Bodensatzes wurden die Bakterien unter leichtem Schütteln bei 50 U/min (Rüttler MTS 4, IKA, D-Staufen) inkubiert.

Bestandteile	Zusammensetzung pro l	Kommentar
Caseinpepton	17,0 g	Lieferant essentieller Aminosäuren, niedermolekularer Peptide & löslicher Proteine (Stickstoffquelle, wachstumsfördernde Wirkung)
Sojamehlpepton	3,0 g	
Glukose	2,5 g	Kohlenstoff- und Energielieferant
K_2HPO_4	2,5 g	Puffereigenschaften (Schutz vor zu starker Säuerung)
NaCl	5,0 g	Regulation osmotischer Verhältnisse

Tabelle 3-1: *Zusammensetzung des Nährmediums (CASO-Bouillon, pH 7,3 ± 0,2; heipha Produktinfo)*

Die bakterielle Kultivierung vollzog sich etappenweise: nach initialer Aufnahme des bakteriellen Lyophilisates in 10 ml der nährstoffreichen Trypticase-Soja-Bouillon wurden nach 48-stündiger Inkubation weitere 200 ml Bouillon hinzugefügt, die wiederum nach weiteren zwei Tagen nach Homogenisierung auf insgesamt 5 Liter CASO-Bouillon (5 Ansätze à 1000 ml) aufgeteilt wurde. Nach abschließender dreitägiger Inkubation bei 37 °C wurde das Wachstum der Zellen im späten Stadium der exponentiellen Wachstumsphase gestoppt. Eine fortlaufende Inkubation der Bakterien im Brutschrank über die exponentielle Phase hinaus würde unter anderem zu einer sukzessiven Zerstörung der Oberflächenmembranproteine führen und schließlich im Tod der Bakterienzelle enden. Zur Bestimmung der aktuellen Wachstumsphase erfolgten in Bezug auf einen Leerwert (ursprüngliche CASO-Bouillon) in regelmäßigen Abständen photometrische

Messungen bei einer Wellenlänge von 600 nm (Novaspec II Visible Spectrophometer, Biochrom, UK-Cambridge).

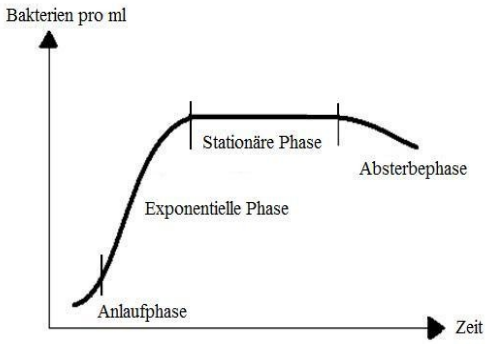


Abbildung 3-3: *Bakterielle Wachstumsphasen*
Anlaufphase: Aktivierung des bakteriellen Stoffwechsels, Enzymsynthese, Beginn der Zellteilungen;
Exponentielle Phase: Vorliegen einer konstanten maximalen Teilungsrate;
Stationäre Phase: Stagnation des Wachstums aufgrund eines mangelnden Nährstoffangebots, zusätzliche Hemmung durch bakterielle Stoffwechselprodukte, Zahl der bakteriellen Teilungsrate und der sterbenden Bakterien halten sich die Waage;
Absterbephase: Abnahme der Kultur aufgrund eines Übermaßes an negativen Faktoren (Nährstoffmangel, hohe Stoffwechselbelastung etc.) [189]

Die gezüchtete Bakterienbouillon wurde schließlich eisgekühlt in das biochemische Labor transportiert, um dort direkt im Anschluss weiterverarbeitet zu werden. Durch die Lagerung auf Eis konnte ein weiteres Bakterienwachstum minimiert werden.

3.1.1.1 KEIMNACHWEIS UND REINHEITSKONTROLLE

Zum Keimnachweis und deren Reinheitskontrolle sowie zur Beurteilung der Bakterienmorphologie erfolgte nach jeder Überführung der bakteriellen Bouillon die Begutachtung von Einzelkolonien auf fraktioniert ausgestrichenen Blutagarplatten (Columbia-Blutagar, heipha, D-Eppelheim). Die Blutagarplatten wurden mit Hilfe von sterilen Einmal-Impfösen (neoLab, D-Heidelberg) beimpft und anschließend für 24-48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Bestandteile	Zusammen-setzung pro l	Kommentar
Spezialpepton	23,0 g	Lieferant essentieller Aminosäuren, niedermolekularer Peptide & löslicher Proteine (Stickstoffquelle, wachstumsfördernde Wirkung)
Stärke	1,0 g	Förderung der Diffusion der Hämolysine
NaCl	5,0 g	Regulation osmotischer Verhältnisse
Agar	14,0 g	Geliermittel
Schafsblut	50 ml	Hämolysenachweis

Tabelle 3-2: *Zusammensetzung des Columbia-Blutagars (pH 7,3 ± 0,2; heipha Produktinfo)*

Parallel zum fraktionierten Ausstrich erfolgte zusätzlich die visuelle Beurteilung der kultivierten Bakterien anhand einer 10 µl-Zellsuspension unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 600-facher Vergrößerung (Leitz, D-Wetzlar).

3.1.1.2 HERSTELLUNG VON EINFRIERKULTUREN

Zur Stammerhaltung bzw. Langzeitlagerung erfolgte für jeden bakteriellen Keim die Herstellung einer Bakterien-Rückstellprobe. Kleine, mit 10 M Kaliumhydroxid angeätzte Perlen wurden mit 300 µl der finalen Bakterienkultur und 500 µl Nährmedium (72 mM $K_2PO_4 \times 3\ H_2O$, 26 mM KH_2PO_4, 3 mM Na-Citrat × 2 H_2O, 0,7 mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 89 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,8 M Glycerin) in einem 2 ml-Tube (Sigma-Aldrich, D-Steinheim) 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Absaugen des überschüssigen Mediums wurden die Tubes bei -80 °C im Tiefkühlschrank (Polar 340 V, Labotect, D-Göttingen) gelagert.

3.1.2 BIOTINYLIERUNG DER BAKTERIELLEN OBERFLÄCHENMEMBRANPROTEINE

Zur späteren Identifizierung der zu untersuchenden bakteriellen Oberflächenmembranproteine wurde der Großteil der kultivierten Bakterien mit Biotin markiert, ein kleiner Teil blieb für vergleichende Zwecke unbehandelt.

Da es sich bei Biotin, auch als Vitamin H oder B_7 bekannt, um ein sehr kleines Molekül (244 Dalton) handelt, kann es an viele Proteine gebunden werden, ohne dabei deren biologische Aktivität zu verändern. Aufgrund der Wasserlöslichkeit und der Membran-Impermeabilität eignet sich Biotin hervorragend für die Markierung von ausschließlich Oberflächenmembranproteinen, ohne dabei auch im Inneren der Zellen für eine Biotinylierung zu sorgen. Verwendet werden hauptsächlich N-Hydroxysulfosuccinimide-(Sulfo-NHS) Ester des Biotins. Durch die Reaktion eines NHS-aktivierten Biotins (Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, US-Rockford) mit der Aminogruppe ($-NH_2$) eines entsprechenden Proteins, kommt es zur Ausbildung einer stabilen Amidbindung.

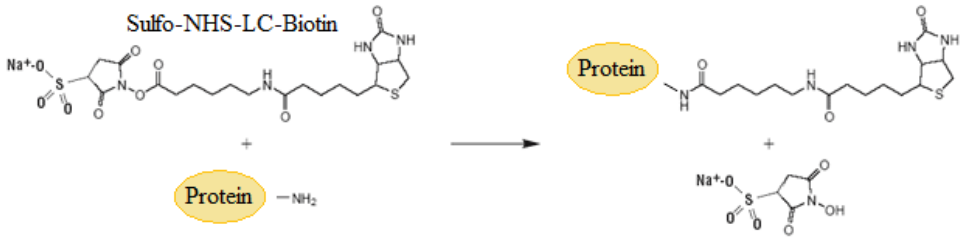


Abbildung 3-4: *Reaktion von EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE) mit einem Protein*

Da Biotin in der Lage ist mit sehr hoher Affinität an Neutravidin zu binden, ist somit ein äußerst spezifischer Nachweis biotinmarkierter Oberflächenmembranproteine möglich.

Das zuvor, nach mehrfacher Zentrifugation (jeweils 10 min, 2500 U/min, 4 °C), gewonnene Bakterienpellet wurde in 15 ml Biotin-Pufferlösung gelöst und schüttelnd bei 4 °C über Nacht inkubiert. Laut Verarbeitungsprotokoll der Firma PIERCE wurden 0,5 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin pro ml Reaktionsvolumen unter Verwendung eines nicht aminhaltigen Puffers (50 mM Na_2CO_3-Puffer, pH 8,0) gelöst. Die Zugabe eines organischen Lösungsmittelzusatzes entfiel aufgrund der Löslichkeit des Biotins bis zu einer Konzentration von 10 mM.

Im Anschluss an die Biotinylierung erfolgte erneut zur Entfernung ungebundenen Biotins, jeweils unter Zugabe von Na_2CO_3-Puffer, eine mehrfache Zentrifugation bei 2500 U/min, 4 °C. Dieses Vorgehen ermöglichte eine sehr starke Verdünnung ungebundenen Biotins, da allein durch die einfache Zentrifugation mit dem fünffachen Volumen der nassen Bakteriensuspension ca. 80 % des ungewünschten, sich in Lösung befindlichen Biotins eliminiert werden konnte. Auch der nicht biotinylierte Anteil des Bakterienpellets wurde der gleichen Prozedur unterworfen.

3.1.3 BAKTERIELLE LYSE

Zum Aufspalten der Bakterien wurde sowohl das biotinylierte als auch das nicht biotinylierte Pellet anschließend lysiert. Dabei wurde das Bakterienpellet fünfmal mit je 50 ml Lysepuffer (50 mM H_2KPO_4, 20 mM EDTA, 0,2 % Triton FX-100, 2 mM PMSF, pH 8,0) jeweils 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Das Kaliumdihydrogenphosphat bildet dabei die puffernde Grundsubstanz, PMSF und EDTA wirken als Enzyminhibitoren und Triton X-100 ist als Detergenz für die Lyse der Zellen verantwortlich. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit in wässrigen Lösungen und der schnellen Inaktivierung von PMSF, wurden jeweils 2 ml aus einer PMSF-Stammlösung (50 mM PMSF gelöst in wasserfreiem DSMO) erst kurz vor dem Lysevorgang hinzugeben. Es erfolgte eine deutliche Trennung zwischen dem nicht lysierten Bakterienpellet und den sich im Überstand befindlichen lysierten Bakterien- und Pufferbestandteilen. Der Überstand des biotinylierten Pellets wurde in einem sterilen, verschließbaren Gefäß auf Eis gekühlt der sich anschließenden Filtration unterzogen. Der Überstand des nicht biotinylierten Pellets sowie das biotinylierte und das nicht biotinylierte Rest-Pellet wurden bei -80 °C tiefgefroren.

3.1.4 FILTRATION ZUR LEKTINGEWINNUNG

Zur Trennung der biotinylierten bakteriellen Oberflächenmembranproteine von partikulären Verunreinigungen (beispielsweise intakte, nicht lysierte Bakterienzellen) einerseits sowie von

niedermolekularen Molekülen (Pufferbestandteile, Verdünnungsmedium etc.) andererseits erfolgte eine sich anschließende mehrstufige Filtration.

Bei der Cross-Flow-Filtration wird das Filtermedium (PES, Polyethersulfon) von der zu filtrierenden Lösung überströmt. Die Überströmungsgeschwindigkeit wird mit Hilfe einer Pumpe eingestellt (BVP, Ismatec, CH-Glattbrugg-Zürich), die über flexible Schläuche mit dem entsprechenden Filter in Verbindung steht. Die Flipflow-Engspalt-Flusskanalführung der eingesetzten Filter bietet dabei hohe Cross-Flow-Geschwindigkeiten bei geringer Pumpenleistung. Ein Druckbegrenzer war deshalb nicht erforderlich. Entsprechend der Porengröße des eingesetzten Filters schieden sich größere Partikel (das sogenannte Retentat) an der Filteroberfläche ab, während das Filtrat in der Lage war, die Membran zu durchdringen. Aufgrund einer ständigen Überströmung konnte ein filtrationsverhindernder Aufbau einer Deckschicht vermieden werden.

Das im ersten Schritt gewonnene Filtrat nach Filtration (Rezirkulationsrate 200-400 ml/min, ca. 2,5 bar) mit einem 0,2 µm-Filter (Vivaflow 50, Vivascience, D-Göttingen) wurde im Anschluss mit einem 10 kDa-Filter (Vivaflow 50, Vivascience) unter gleichen Bedingungen filtriert. Zum Erlangen einer möglichst effektiven Ausbeute wurde nach jeder Filtration mit der fünffachen Menge an aqua bidest. durch Zugabe mehrerer kleiner Volumina gewaschen. Das im zweiten Schritt vom Filter zurückgehaltene Retentat wurde abschließend mit Hilfe eines 10 kDa-Palfiltrons (Amicon® Ultra-4, Millipore, USA-Billerica) in einer Zentrifuge mittels Schwingkopfrotor (Multifuge 4 KR, Heraeus, D-Osterode) eingeengt (4400 U/min, 10 Minuten, à 4 ml). Endprodukt war das im dritten Schritt gewonnene Retentat – ein eingeengtes bakterielles Homogenat mit Molekülen < 0,2 µm, > 10 kDa, welches unter anderem die in späteren Versuchen zu untersuchenden biotinylierten bakteriellen Oberflächenmembranproteine enthält.

Die bakteriellen Homogenate der Keime *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 sowie *S. sobrinus* DSM 20381 wurden abschließend 1:2 in Ethylenglykol verdünnt und in Alliquots à 50 µl im Tiefkühlschrank bei -30 °C (Comfort, Liebherr, D-Ochsenhausen) gelagert. Der Gehalt an Ethylenglykol verhindert das Einfrieren und damit eine Denaturierung der Proteine.

Die nachfolgenden Abbildungen verdeutlichen den Aufbau der Filtrationsanlage.

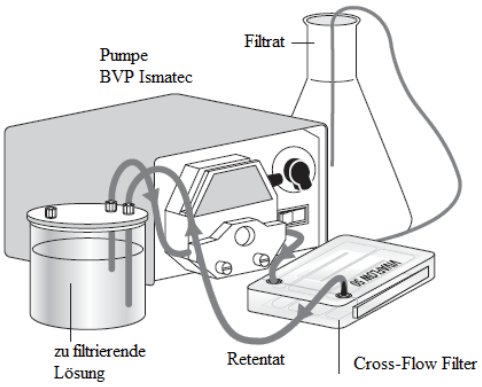


Abbildung 3-5:
Schematischer Aufbau der Filtrationsanlage

Abbildung 3-6: *Laboraufbau der Anlage*

Die Qualität bzw. Effektivität des Filtrationsprozesses kann mit Hilfe der Flussratenbestimmung überprüft werden. Bei uneingeschränkter Funktionalität der Filter sollte keine signifikante Abweichung der filtrierten Menge an aqua bidest. pro Zeiteinheit vor und nach der eigentlichen Filtration unter gleichen Bedingungen (Geschwindigkeit, Druck, Schlauchlängen etc.) festgestellt werden können.

Nach Abschluss der Filtration wurden die Filter zur Entfernung der restlichen Bakteriensuspension mit ca. 200 ml aqua bidest. gespült. Im Anschluss daran erfolgte deren ausgiebige Reinigung mit einer basischen Reinigungslösung (0,5 M NaOH, 0,5 mM NaOCl) bei reduzierter Pumpgeschwindigkeit (50-100 ml/min, 40 min). Abschließend wurde nach Ablassen der Reinigungslösung erneut ca. 5-10 Minuten mit aqua bidest. gespült. Zur Lagerung wurden die Vivaflow-Filter mit 20 % Ethanol gefüllt, um sie nach Verschluss ihrer Ein- und Ausgänge eingeschweißt bei ca. 4 °C im Kühlschrank (Grönland, DDR) aufbewahren zu können.

3.2 BCA-TEST ZUR BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Zur Bestimmung der Proteingesamtkonzentration der gewonnenen bakteriellen Homogenate der Keime *S. mutans* DSM 20523 und 6178 sowie *S. sobrinus* DSM 20381 wurde der BCA-Test eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine quantitative Proteinanalyse zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen im Bereich von 20-2000 µg/ml (Nachweisgrenze: 0,5 µg/ml). Das Verfahren wurde von *Smith* et al. (1985) entwickelt und von *Redinbaugh* et al. (1986) an das Mikrotiterplatten-Format angepasst [176, 205]. Für die Durchführung der Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das BCA™ Protein Assay-Kit von Pierce (US-Rockford) verwendet.

Die Methode beruht auf dem hochsensitiven kolorimetrischen Nachweis eines Bicinchoninsäure-Kupfer-I-Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen im alkalischen Milieu (pH-Wert 12,0; Reagenz A) auf Kupfer-II-Ionen (Reagenz B) und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure (BCA, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) entsteht [205]. Diese dem BCA-Test zugrunde liegende Reaktion wird als Biuret-Reaktion bezeichnet. Für die Bildung des wasserlöslichen, intensiv violetten Farbkomplexes spielen die makromolekulare Struktur der Proteine, die Anzahl der vorhandenen Peptidbindungen und das Vorhandensein vier spezifischer Aminosäuren (Zystein, Zystin, Tryptophan und Tyrosin) eine entscheidende Rolle. Die Intensität der Färbung bzw. das Ausmaß der Absorption ist im Konzentrationsbereich von 20-2000 µg/ml proportional zur Proteingesamtkonzentration der Probe und kann photometrisch detektiert werden. Als Referenzprotein für die Standardreihe wird der Albumin Standard (2 mg/ml) aus dem Kit von Pierce im Konzentrationsbereich von 0-1 mg/ml in einer geometrischen Verdünnung (Faktor 2) eingesetzt.

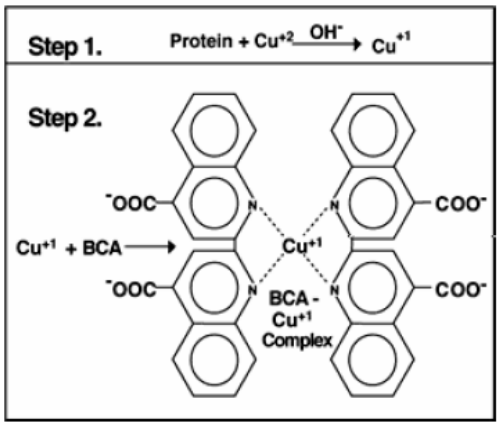


Abbildung 3-7:
Step 1: Biuret-Reaktion – Reduktion der Kupfer-II-Ionen zu Kupfer-I-Ionen in Anwesenheit von Proteinen in alkalischem Milieu;
Step 2: Bildung des Bicinchoninsäure-Kupfer-I-Farbkomplexes durch Reaktion der Kupfer-I-Ionen mit BCA; Pierce Produktinformation

Aufgrund der völlig unbekannten Proteinkonzentrationen wurden Verdünnungsreihen gelöst in aqua ad iniectabilia erstellt, ausgehend von einer 1:2 bis hin zu einer 1:1000-Verdünnung der Proben. Es erfolgten Doppelbestimmungen im Mikrotiterformat. Die BCA-Reagenz A + B aus dem Kit von Pierce wurde 50:1 gemischt. Zu je 25 µl Probe pro Well wurden 200 µl BCA-Reagenz gegeben mit anschließender zweistündiger Inkubation im Thermomixer (Comfort, Eppendorf, D-Hamburg), schüttelnd (300 U/min) bei 37 °C. Nach dem Abkühlen der 96-Well-Mikrotiter-Platte (Nunc™, DK-Roskilde) wurde die Absorption des violetten Farbkomplexes bei 532 nm im Photometer Ultra 384 (Tecan, D-Crailsheim) bestimmt.

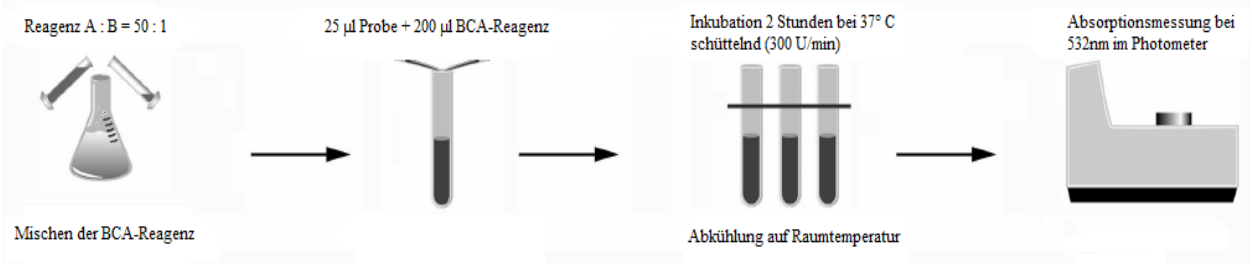


Abbildung 3-8: *Arbeitsflussplan der BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung; Pierce Produktinformation*

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	**Standard** 1:2 **1000 µg/ml**		**DSM 20523** 1:2		**DSM 6178** 1:2		**DSM 20381** 1:2					
B	1:4 **500 µg/ml**		1:5		1:5		1:5					
C	1:8 **250 µg/ml**		1:10		1:10		1:10					
D	1:16 **125 µg/ml**		1:50		1:50		1:50					
E	1:32 **62,5 µg/ml**		1:100		1:100		1:100					
F	1:64 **31,25 µg/ml**		1:200		1:200		1:200					
G	1:128 **15,625 µg/ml**		1:500		1:500		1:500					
H	**LW**	**LW**	1:1000		1:1000		1:1000					

Abbildung 3-9: *Pipettierschema der 96-Well-Mikrotiter-Platte: jede Probe wurde in acht Verdünnungen gemessen, jede Verdünnung als Doppelmessung in jeweils zwei Wells; eine Leerwert (LW)-Bestimmung erfolgte zum Ausschluss eventuell falsch positiver Messungen*

3.3 DEGLYKOSYLIERUNG DER BSA-GLYKOKONJUGATE

In den nachfolgenden Versuchen wurden die bakteriellen Homogenate unter anderem bezüglich ihrer Bindungsfähigkeit gegenüber spezifischen BSA-Glykokonjugaten analysiert. Interessant war dabei vor allem die Untersuchung hinsichtlich einer möglichen Adhäsion der bakteriellen Lektine an den Glykananteil der BSA-Glykokonjugate, basierend auf einer Protein-Kohlenhydrat-Bindung, der sogenannten Lektinbindung. Da jedoch weitere Bindungsmechanismen, wie beispielsweise Protein-Protein-Bindungen, bei der Adhäsion der bakteriellen Homogenate nicht ausgeschlossen werden können, sollte mit Hilfe der deglykosylierten Strukturen der Bindungs-

anteil zwischen bakteriellem Homogenat und BSA-Glykokonjugat bestimmt werden, der nicht auf glykanvermittelter Adhäsion basiert.

Bei der Deglykosylierung kommt es durch Zugabe von Natriumperiodat (10 mM $NaIO_4$-Lösung) zu den spezifischen Glykokonjugaten unter sauren Bedingungen (50 mM NaH_2PO_4-Puffer, pH 4-5) zur oxidativen Spaltung der endständigen Kohlenhydratreste von den Proteinen. Ihre Funktion als Glykoprotein haben die BSA-Glykokonjugate damit verloren. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Rollschüttler (REAX2, Heidolph, D-Schwabach). Durch anschließendes schrittweises Waschen (3 × 20 min, 5000 U/min, 4 °C, aqua ad iniectabilia) der Proben mit dem zehnfachen ihres Volumens in einem 10 kDa-Filter (Amicon® Ultra-4, Millipore, USA-Billerica) konnten u. a. Pufferbestandteile und ungebundenes Natriumperiodat entfernt werden. Um die Existenz endständiger Kohlenhydrate auf ein Minimum zu reduzieren, wurde der Vorgang dreimal wiederholt. Das gewonnene Retentat wurde im Anschluss an die Bestimmung seiner Proteinkonzentration mit Hilfe eines BCA-Tests (vgl. Kapitel 3.2) entsprechend den nicht deglykosylierten Beschichtungszuckern in aqua ad iniectabilia (Braun, D-Melsungen) verdünnt, um in den nachfolgenden Versuchen adäquat eingesetzt werden zu können.

3.4 BESTIMMUNG DER BINDUNGSSPEZIFITÄT BAKTERIELLER HOMOGENATE MIT HILFE DES KOMPETITIVEN LEKTINBINDUNGS-INHIBITIONSASSAYS

3.4.1 ELISA-TESTPRINZIP

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (*enzyme linked immunosorbent assay*; ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren (Antigen-Antikörper-Reaktion), basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion.

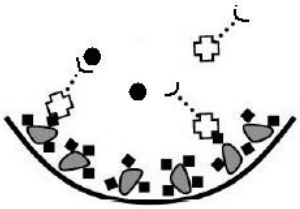
Die Charakterisierung und Spezifizierung der bakteriellen Oberflächenmembranproteine beruht auf dem Prinzip des von *Kage* et al. eingeführten kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassays [88]. Der ursprüngliche Gedanke dieses Tests basiert auf der Tatsache, dass die Adhäsion eines pflanzenspezifischen biotinylierten Lektins bekannter Bindungsspezifität an komplementäre Glykananteile immobilisierter Neoglykoproteine durch spezifische Glykananteile einer Probe kompetitiv inhibiert werden kann. Durch die Bestimmung der Menge des gebundenen Lektins an das festphasenadsorbierte Glykoprotein kann das Ausmaß der kompetitiven Hemmung charakterisiert werden. Somit ist es auf indirektem Weg möglich, die Konzentration der in der Probe enthaltenen spezifischen Glykanstrukturen zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun, basierend auf dem gleichen Prinzip, die bakteriellen Homogenate der Keime *S. mutans* DSM 20523 und 6178 sowie *S. sobrinus* DSM 20381 unter-

sucht werden. Bei den unbekannten Strukturen handelt es sich in diesem Fall jedoch nicht um Glykananteile einer Probe, stattdessen sollen die bakteriellen Lektine auf eine eventuelle Bindungsspezifität gegenüber spezifischen Glykokonjugaten bekannter Struktur und einer möglichen Verdrängung durch diese untersucht werden.

Mit Hilfe der Biotinylierung der zu charakterisierenden Lektine, analog dem Prinzip markierter Antikörper in einem ELISA, gelang die Quantifizierung mit Hilfe des Neutravidin-Peroxidase-Systems durch Katalysation einer enzymatischen Farbreaktion. Zur Standardisierung erfolgte parallel dazu der Einsatz spezifischer Pflanzenlektine mit bekannter Bindungsspezifität, deren Hemmung durch die entsprechenden spezifischen Glykokonjugate ebenfalls bestimmt wird.

Abbildung 3-10 veranschaulicht das Prinzip des kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassays.



Biotinylierte bakterielle Lektine binden in Abhängigkeit ihrer Bindungsspezifität an die immobilisierten Glykokonjugate. Der quantitative Nachweis erfolgt über das Neutravidin-Peroxidase-System.

Verdrängungs-Glykokonjugate inhibieren durch Bindung der Lektine über ihre spezifischen Glykananteile deren Anlagerung an die Festphasen-adsorbierten Glykokonjugate.

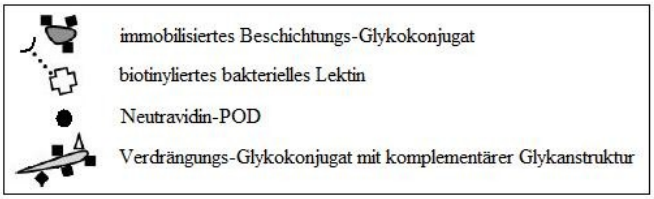


Abbildung 3-10:
Schematische Darstellung des kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassays

Tabelle 3-3 stellt die im kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassay eingesetzten pflanzenspezifischen Lektine mit ihrer Bindungsspezifität und den entsprechenden Glykokonjugaten dar.

	Lektin	Bindungsspezifität [235]	Beschichtungs-Glykokonjugat	Verdrängungs-Glykokonjugat
PNA	*Arachis hypogaea* Lectin **Peanut Agglutinin** (Erdnuss) *1 mg/ml*	β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin	BSA-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin *1 mg/ml*	Methyl-α-D-Galaktopyranosid *300 mM*
SNA	*Sambucus nigra* Lectin **Sambucus nigra Agglutinin** (Holunderbeere) *1 mg/ml*	α-2,6-gebundene Sialinsäure (NANA)	Fetuin *1 mg/ml*	N-Acetyl-Neuraminlactose *1 mg/ml*
GNA	*Galanthus nivalis* Lectin **Galanthus nivalis Agglutinin** (Schneeglöckchen) *0,5 mg/ml*	terminale Mannose	BSA-α-Mannopyranosid *1 mg/ml*	Mannan *0,4 mg/ml*
ConA	*Canavalia ensiformis* Lectin **Concanavalin A** (Jack Bean) *1 mg/ml*	Trimannosyl-Struktur in High-Mannose-Typ-Glukanen (verzweigte Mannose)	BSA-α-Mannopyranosid *1 mg/ml*	Methyl-α-D-Mannopyranosid *300 mM*
AAA	*Anguilla anguilla* Lectin **Anguilla anguilla Agglutinin** (Frischwasseraal) *1 mg/ml*	α-1,6-gebundene Fukose	BSA-Fukosylamid *1 mg/ml*	α-L-(-)-Fukose *300 mM*

Tabelle 3-3: *Pflanzenspezifische Lektine, deren Bindungsspezifität und entsprechende Glykokonjugate*

Die zuvor biotinmarkierten adsorbierten Lektine können mit Hilfe von Neutravidin nachgewiesen werden. Neutravidin ist ein aus vier identischen Untereinheiten aufgebautes Protein aus dem Meerrettich, wobei jedes dieser Untereinheiten mit sehr hoher Affinität ein Biotin-Molekül binden kann. Infolge einer Deglykosylierung besitzt Neutravidin keine Kohlenhydrate, wodurch unspezifische Bindungen weitestgehend ausgeschlossen werden können. Mit Hilfe einer an Neutravidin gebundenen Peroxidase kann durch Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat die Oxidation des löslichen, farblosen TMB-Komplexes zu einem blauen Farbstoff katalysiert werden. Nach ausreichender Färbung wird die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt. Die Intensität der resultierenden Gelbfärbung kann im Anschluss photometrisch ermittelt werden. Die vom Photometer erfasste optische Dichte steht dabei in direktem Zusammenhang zur Menge des adsorbierten biotinylierten Lektins.

Die photometrische Messung basiert auf dem Lambert Beer'schen Gesetz:

$$\mathbf{E_\lambda = -lg\,(I/I_0) = \varepsilon_\lambda \times c \times d}$$

E_λ	*Extinktion des Materials für Licht der Wellenlänge λ*
I_0	*Intensität des eingestrahlten Lichts*
I	*Intensität des durchgelassenen Lichts*
ε_λ	*molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ [l/mol × cm]*
c	*Konzentration der Probelösung [mol/l]*
d	*Weglänge des Lichts im Material [cm]*

Formel 3-1: *Lambert Beer'sches Gesetz*

Dabei ist die Extinktion der negative dekadische Logarithmus der durchgelassenen Strahlung. Da sowohl der molare Extinktionskoeffizient des gelben Farbstoffs bei einer bestimmten Wellenlänge als auch die Füllhöhe in den Wells konstant ist, hängt die Extinktion in diesem Fall primär von der gebundenen Menge der bakteriellen Lektine an die feste Phase ab.

3.4.2 EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

Dem eigentlichen Versuch zur Charakterisierung der Bindungsspezifität bakterieller Lektine und einer möglichen Verdrängung durch komplementäre Glykokonjugate gingen zunächst eine Reihe von Vorversuchen voraus. Die Auswahl geeigneter pflanzenspezifischer Lektine sowie der entsprechenden Beschichtungs- und Verdrängungs-Glykokonjugate bezieht sich auf bereits existente Daten [43, 190]. Auch die in Tabelle 3-3 dargestellten optimalen Verdünnungen wurden bereits zu einem früheren Zeitpunkt empirisch festgelegt [190]. Sie wurden dementsprechend übernommen und während des gesamten Versuchsablaufs beibehalten. Alle Proben wurden abschließend à 50 µl alliquotiert und bei -30 °C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Zur endgültigen Etablierung der Versuchsdurchführung erfolgte weiterhin die Festlegung des Ablaufs und der Inkubationszeiten, die Überprüfung bestellter Materialien bezüglich ihrer Funktionalität sowie die Bestimmung der geeigneten Konzentration für den optimalen Einsatz der bakteriellen Homogenate. Ziel dabei war es eine optimale Verdünnung der Homogenate zu ermitteln, bei der bei entsprechender Spezifität eine ausreichende Bindung zur festen Phase gewährleistet werden konnte, bei gleichzeitig möglichst maximaler Bindungsinhibition durch sich in Lösung befindlicher komplementärer Glykokonjugate.

Der kompetitive Lektinbindungs-Inhibitionsassay wurde auf 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Pro Platte kam jeweils ein spezifisches Beschichtungs-Glykokonjugat zum Einsatz. So konnte auf einer Platte jeweils das entsprechende pflanzenspezifische Lektin zusammen mit den drei bakteriellen Homogenate mit einer Verdünnungsreihe des spezifischen Verdrängungszuckers

eingesetzt werden. Es erfolgten mindestens Doppelbestimmungen zum Ausgleich möglicher Pipettierfehler. Der Einsatz des jeweiligen pflanzenspezifischen Lektins dient zum einen der internen Qualitätssicherung, zum anderen des Vergleichs in Bezug auf die Bindungsfähigkeit der bakteriellen Lektine.

Mit Hilfe der Leerwert-Bestimmung ist die Berücksichtigung all der Positiv-Messungen möglich, die nicht auf einer Bindung zwischen Lektin und Beschichtungs-Glykokonjugat basieren. Der ermittelte Leerwert wird für jedes bakterielle Homogenat gemittelt und von den entsprechenden Messungen subtrahiert.

<table>
<tr><th></th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th></tr>
<tr><td>A</td><td colspan="2">Pflanzen-spezifisches Lektin
Max. Lektinbindung</td><td colspan="2">DSM 20381
Max. Lektinbindung</td><td colspan="2">DSM 20523
Max. Lektinbindung</td><td colspan="2">DSM 6178
Max. Lektinbindung</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>B</td><td colspan="2" rowspan="5">Verdünnungsreihe des Verdrängers

(höchste Konzentration des Verdrängers)</td><td colspan="2" rowspan="5">Verdünnungsreihe des Verdrängers

(höchste Konzentration des Verdrängers)</td><td colspan="2" rowspan="5">Verdünnungsreihe des Verdrängers

(höchste Konzentration des Verdrängers)</td><td colspan="2" rowspan="5">Verdünnungsreihe des Verdrängers

(höchste Konzentration des Verdrängers)</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>C</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>D</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>E</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>F</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>G</td><td colspan="2">Maximale Lektinbindung</td><td colspan="2">Maximale Lektinbindung</td><td colspan="2">Maximale Lektinbindung</td><td colspan="2">Maximale Lektinbindung</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>H</td><td colspan="2">Leerwert</td><td colspan="2">Leerwert</td><td colspan="2">Leerwert</td><td colspan="2">Leerwert</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
</table>

Abbildung 3-11: *Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte*

Zu Beginn erfolgte die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit den für die jeweiligen pflanzenspezifischen Lektine komplementären Glykoproteine in einer Verdünnung von 1:1000 in frisch hergestelltem Beschichtungspuffer (0,1 M Na_2CO_3, pH 8,5). In analoger Weise wurden weitere Mikrotiterplatten mit den entsprechenden deglykosylierten Glykokonjugaten beschichtet. Nach der Pipettierung von 100 µl in jedes Well der Mikrotiterplatte erfolgte die nächtliche Inkubation im Kühlschrank bei 4 °C. Da die Mikrotiterplatten im Überschuss mit Glykoproteinen beschichtet wurden, stellte sich nach ausreichend langer Inkubation ein Gleichgewicht zwischen der festen Phase und denen sich in Lösung befindlichen Glykoproteinen ein. Die Etablierung dieser festen Phase basiert dabei auf Proteinbindungen zwischen den Neoglykoproteinen und dem Polystyrol der Mikrotiterplatten.

	Lektinspezifisches Beschichtungs-Glykokonjugat	Ausgangskonzentration	Verdünnung in Na_2CO_3-Puffer
PNA	BSA-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin	1 mg/ml	1:1000
SNA	Fetuin	1 mg/ml	1:1000
GNA	BSA-α-Mannopyranosid	1 mg/ml	1:1000
ConA	BSA-α-Mannopyranosid	1 mg/ml	1:1000
AAA	BSA-Fukosylamid	1 mg/ml	1:1000

Tabelle 3-4: *Lektinspezifische Beschichtungs-Glykokonjugate und deren eingesetzte Verdünnungen*

Nach Ablauf der Inkubationsphase wurden die Platten am zweiten Tag dreimal mit jeweils 200 µl/Well Tris-Waschpuffer (50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 0,1 % Tween 20, pH 7,5) mit Hilfe eines Waschautomaten für 96-Well-Mikrotiterplatten gewaschen. Ungebundene Neoglykoproteine konnten so auf ein Minimum reduziert werden.

Im Anschluss daran erfolgte die Probenpipettierung. Sowohl zu dem pflanzenspezifischen Lektin als auch zu den jeweiligen bakteriellen Homogenaten erfolgte entsprechend des oben dargestellten Plattenschemas die Zugabe eines standardisierten Verdrängungs-Glykokonjugats in einer Verdünnungsreihe unterschiedlicher Konzentrationen. Das Verdrängungs-Glykokonjugat richtet sich in seiner Spezifität nach dem sich auf der Platte befindlichen pflanzenspezifischen Lektin. Die entsprechenden Verdünnungsstufen der einzelnen lektinspezifischen Glykokonjugate sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

	Lektinspezifisches Verdrängungs-Glykokonjugat	Ausgangs-konzentration	1. Verdünnung in Tris-Probenpuffer	Geometrische Weiterverdünnung
PNA	Methyl-α-D-Galaktopyranosid	300 mM	1:8	1:2
SNA	N-Acetyl-Neuraminlactose	1 mg/ml	1:25	1:3
GNA	Mannan	0,4 mg/ml	1:500	1:3
ConA	Methyl-α-D-Mannopyranosid	300 mM	1:10	1:3
AAA	α-L-(-)-Fukose	300 mM	1:2	1:3

Tabelle 3-5: *Lektinspezifische Verdrängungs-Glykokonjugate und deren eingesetzte Verdünnungen*

Die Verdünnung der einzelnen Standards erfolgte in Tris-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 mM $MnCl_2$, 0,5 mM $CaCl_2$, 2,0 mM $MgCl_2$, 0,025 mM $ZnCl_2$, pH 7,5). Pro Well wurden 25 µl pipettiert. In den Wells zur Bestimmung der maximalen Lektinbindung und des Leerwerts erfolgte anstelle der Zugabe des Standards die gleiche Menge an Tris-Probenpuffer. Ergänzend erfolgte die Zugabe von 75 µl Lektinlösung in der zuvor bestimmten optimalen Lektinkonzentration, sodass schließlich alle Wells ein Volumen von 100 µl enthielten. Während die pflanzenspezifischen Lektine (1 mg/ml) jeweils in einer 1:20.000-Verdünnung zum Einsatz kamen, wurden die bakteriellen Homogenate (ca. 730 µg/ml) nur 1:1500 in Tris-Probenpuffer verdünnt. Für die Bestimmung des Leerwerts wurden 75 µl Tris-Probenpuffer anstelle des Lektins pipettiert. Schließlich wurden die Mikrotiterplatten mit ca. 100 U/min auf dem Rüttler zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert, sodass es auch hier zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen den Molekülen kam.

Der dritte Tag wurde erneut mit dem dreimaligen Waschen der Wells mit jeweils 200 µl/Well Tris-Waschpuffer mit Hilfe des Waschautomaten begonnen. Somit konnte sowohl das ungebundene Lektin als auch das sich in Lösung befindliche, durch spezifisches Glykokonjugat gebundene Lektin vor der anschließenden Detektion eliminiert werden. Nur das, an das festphasenadsorbierte Neoglykoprotein gebundene, biotinylierte Lektin konnte im Anschluss daran von einem Neutravidin-Peroxidase-Komplex gebunden werden. Dazu wurden pro Well 100 µl Neutravidin-POD (1 mg/ml), 1:20.000 in Tris-Probenpuffer verdünnt, in die einzelnen Wells pipettiert mit sich anschließender einstündiger Inkubation auf dem Rüttler (100 U/min, bei Raumtemperatur). Ein abschließendes viermaliges Waschen der Mikrotiterplatten (200 µl pro Well) reduzierte das Vorhandensein unspezifischer Bindungen des Neutravidins.

Durch die Zugabe des frisch angesetzten TMB-Substrats (5 ml 100 % Ethanol, 5 ml DMSO, 240 mg Tetramethylbenzidin) 1:100 verdünnt in Galatti-Puffer (0,2 M Zitronensäure, 30 % H_2O_2, pH 3,75) mit 110 µl pro Well wurde die Farbreaktion induziert. Dabei katalysiert die indirekt an die feste Phase gebundene Peroxidase die Oxidation des löslichen, farblosen Tetramethylbenzidin-Komplexes zu einem blauen Farbstoff. Sobald eine abgestufte Blaufärbung entsprechender Intensität sichtbar war, wurde der enzymatische Farbumschlag durch Inaktivierung der Peroxidase mit Hilfe von 50 µl einer 4N H_2SO_4-Lösung gestoppt. Die Intensität des resultierenden gelben, stabilen, gut quantifizierbaren Farbstoffs konnte anschließend mit Hilfe eines Spektralphotometers (Ultra 384, Tecan, D-Crailsheim) quantifiziert werden. Die Bestimmung der Extinktionen (optische Dichte, Absorption) wurde bei einer Messfilterwellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzfilterwellenlänge von 492 nm durchgeführt, um eventuell auftretende unterschiedliche unspezifische Absorptionen der Proben in den Mikrotiterplatten auszugleichen. Die

Messwerte aller Wells wurden zur Dokumentation für jede Mikrotiterplatte als Messwertdatei digital gespeichert. Die nachfolgende Tabelle stellt die einzelnen Schritte in ihrer zeitlichen Reihenfolge schematisch dar.

		Inkubationszeiten
Beschichtung mit spezifischen Neoglykoproteinen	100 µl/Well	über Nacht bei 4 °C
Waschen	200 µl/Well	-
Zugabe des spezifischen Verdrängungs-Glykokonjugats	25 µl/Well	-
Zugabe des pflanzenspezifischen Lektins bzw. der bakteriellen Homogenate	75 µl/Well	30 Minuten bei RT, über Nacht bei 4 °C
Waschen	200 µl/Well	-
Zugabe von Neutravidin/POD	100 µl/Well	1 Stunde bei RT
Waschen	200 µl/Well	-
Zugabe des Farbstoffs TMB-Galatti	110 µl/Well	-
Stoppen der Farbreaktion mit 4N H_2SO_4	50 µl/Well	
Photometrische Messung	-	-

Tabelle 3-6: *Schematischer Ablauf des Lektinbindungs-Inhibitionsassays (RT = Raumtemperatur)*

3.4.3 AUSWERTUNG DER PHOTOMETRISCH ERMITTELTEN DATEN

Mit Hilfe der photometrisch ermittelten Daten lässt sich zunächst für jede spezifische Beschichtung eine halblogarithmische Standardkurve für die pflanzenspezifischen Lektine durch die definierte Standardverdünnungsreihe erstellen. Ein sigmoider Kurvenverlauf tritt dann auf, wenn der dekadische Logarithmus der Konzentration des Standards (x-Achse) gegen die prozentuale Lektinbindung (y-Achse) graphisch dargestellt wird. Eine 100%-Lektinbindung entspricht dabei der Extinktion der maximalen Lektinbindung abzüglich der Extinktion der maximalen Verdrängung unter Berücksichtigung des Leerwerts.

Im Anschluss daran erfolgte analog zu den pflanzenspezifischen Lektinen die graphische Darstellung einer eventuellen Bindung und/oder Verdrängung der bakteriellen Homogenate. Mit Hilfe der 50%-Bindungsinhibition können Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich der Bindungsspezifität zwischen den bakteriellen Homogenaten und in Bezug zur Standardkurvengrafik des jeweiligen pflanzenspezifischen Lektins dargestellt werden.

3.5 SDS-GELELEKTROPHORESE MIT ANSCHLIEßENDER SILBERFÄRBUNG

3.5.1 MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG DER PROBEN MIT HILFE DER SDS-PAGE

Die SDS-Gelelektrophorese dient der qualitativen Proteinanalyse komplexer Proteingemische. Es handelt sich dabei um ein standardmäßiges Verfahren, bei dem unter Einfluss eines elektrischen Feldes die Separation geladener Probemoleküle in einer bestimmten Gelmatrix erfolgt. Die elektrophoretische Trennung bietet so einen schnellen Nachweis der zu identifizierenden Proteine und deren Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe eines Protein-Standards.

Zur Separation von Proteinen werden fast ausschließlich Gele auf Polyacrylamidbasis verwendet. Diese Gele bestehen aus einem engmaschigen Polyacrylamid-Netz, welches durch Copolymerisation von Acrylamid- mit vernetzenden N, N‘-Methylenbisacrylamid-Molekülen entsteht. Je nachdem, in welchem Größenbereich die aufzutrennenden Proteine liegen, können Gele mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentrationen (unterschiedlicher Porengröße) eingesetzt werden. Für die Separation der bakteriellen Homogenate der Keime *S. mutans* DSM 20523 und 6178 sowie *S. sobrinus* DSM 20381 wurde ein 10%iges Acrylamidgel (CleanGel, 52S) der Firma ETC (Elektrophorese Technik, D-Kirchtellinsfurt) verwendet.

Die Auftrennung der Moleküle basiert auf der restriktiven Wirkung des Trennmediums und der daraus resultierenden unterschiedlich schnellen Bewegung verschiedener Moleküle im elektrischen Feld. Auf die Mobilität einflussnehmende Faktoren sind dabei sowohl die angelegte Spannung sowie die Mediumeigenschaften (Vernetzungsgrad des Gels, pH-Wert, Ionenstärke) als auch die Eigenschaften der zu untersuchenden Moleküle, wie deren Ladung, Molekülgröße und Konformation.

Bei der SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden den Proben das stark anionische Detergenz Sodium (Natrium)-dodecylsulfat (SDS) zugesetzt. Dieses amphiphile Molekül besitzt die Fähigkeit, hydrophobe Wechselwirkungen sowie auch elektrostatische Bindungen zu zerstören. Dabei wird die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Die Proteine liegen so im Gegensatz zur nativen Gelelektrophorese in ihrer denaturierten Form vor. Es kommt zur Komplexbildung zwischen den entfalteten Proteinen und den SDS-Molekülen. Dabei überdeckt das SDS aufgrund der großen Anzahl an SDS-Molekülen pro Proteinmolekül die Eigenladung der Proteine und verleiht ihnen somit eine konstante negative Ladung pro Masseeinheit (ca. 1,4 g SDS pro 1 g Protein). Um auch kovalente Sekundärstrukturen, wie die Disulfidbrücken (zwischen Cysteinen) zu zerstören, wird den Proben zusätzlich die reduzierende Thiolverbindung DTT (Dithiothreitol) zugesetzt.

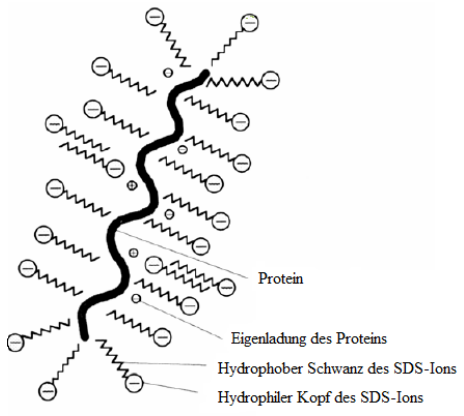


Abbildung 3-12: *Struktur eines denaturierten Protein-SDS-Komplexes*

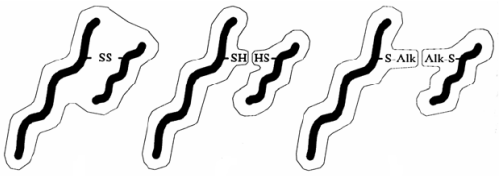


Abbildung 3-13: *Reduktion der Disulfidbrücken mit Hilfe von DTT*

Durch das Zusammenspiel von SDS, Hitze und dem Reduktionsmittel DTT wurden alle Proteine in der Probe vollständig denaturiert, linearisiert und mit einer Hülle aus negativ geladenen SDS-Molekülen versehen. Somit erfolgte die Auftrennung der Proteine ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichts (unabhängig von ihrer Ladung und Konformation).

Mit Hilfe eines Protein-Standards (*Precision Plus* 10-250 kDa, Bio-Rad, US-Hercules, 1:20 in Probenpuffer verdünnt) mit mehreren Proteinen bekannter Molekülgröße ist so eine Abschätzung des Molekulargewichts der zu untersuchenden Proben möglich.

3.5.2 VORBEREITUNG DER PROBEN

In einem Vorversuch wurde zunächst für jedes bakterielle Homogenat eine geeignete Proteinkonzentration ermittelt, die eine optimale Darstellung der Proteine im Gel ermöglicht (Darstellung kräftiger Banden ohne Überlagerungen). Die zu untersuchenden bakteriellen Homogenate wurden so vorverdünnt, dass für beide *S. mutans*-Proben 300 µg und für *S. sobrinus* 200 µg Protein pro ml Lösung in der Verdünnung enthalten waren. Die Verdünnung erfolgte mit Probenpuffer (15 ml SDS-Rehydrationspuffer, 10 ml aqua bidest., 500 mg SDS und 60 µl Bromphenolblau-Lösung (1 %) nach Protokoll der Firma ETC). SDS wurde dabei im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben. Zu 1 ml Probenpuffer wurden weiterhin 10 µl 2,5 M DTT zugesetzt.

Um eine möglichst hohe Auftrennung der Proben zu gewährleisten ist im Probenpuffer Bromphenolblau, ein sichtbarer, negativ geladener Farbstoff, enthalten. Bromphenolblau dient als Marker für die Dauer der Gelelektrophorese. Er interagiert nicht mit den Proteinen und wandert im Gel etwa so schnell wie Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 5 kDa. Die Gelelektrophorese wurde beendet, sobald der Farbstoff das Gel durchlaufen hat.

Für eine adäquate Denaturierung wurden die Proben nach kurzem Vortexen im Wasserbad (Köttermann, D-Hänigsen) für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Nach ausreichendem Abkühlen wurden die Eppendorfgefäße anschließend kurz zentrifugiert, um die gesamte Probe am Boden des Gefäßes zu konzentrieren.

3.5.3 DURCHFÜHRUNG DER SDS-GELELEKTROPHORESE

Das auf die entsprechende Größe zugeschnittene Gel wurde zunächst zwei Stunden in Rehydrations-Puffer (ETC, D-Kirchentellinsfurt) schüttelnd inkubiert, um eine gleichmäßige Benetzung des Gels zu erreichen. Nach anschließender Trocknung des Gels mit entsprechenden *cardboards* (ETC) wurde es in der horizontalen Gelelektrophorese-Apparatur (Multipor II, Pharmacia Biotech, A-Wien) möglichst zentral platziert. Um optimale Bedingungen und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Gelelektrophorese in einer gekühlten Apparatur (Flüssigkeitsumwälzkühler FK 350, Colora Messtechnik, D-Lorch) bei konstanten Temperaturen (10 °C ± 1,5 °C) durchgeführt. Ein dünner Öl-Film zwischen der Gelplattform und dem Gel garantierte dabei einen ausreichenden Kühlkontakt.

Die abgekühlten denaturierten Proben wurden in zuvor festgelegter Reihenfolge in die entsprechenden Wells des Polyacrylamidgels pipettiert (6 µl pro Well). Zwei in Elektrodenpuffer (Anodenpuffer, Kathodenpuffer, ETC) getränkte Cellophan-Streifen (ETC) sorgten beidseitig für den Kontakt zur Anode (Plus-Pol) bzw. Kathode (Minus-Pol). Die nachfolgende Abbildung dient der Veranschaulichung des Aufbaus der horizontalen Gelelektrophorese-Apparatur.

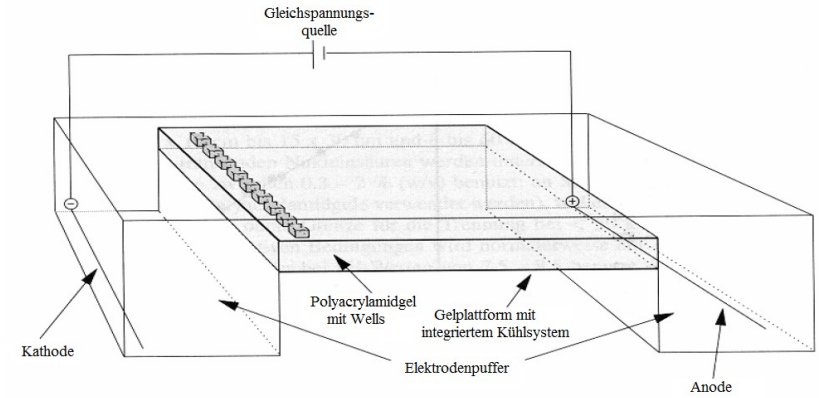


Abbildung 3-14: *Schematischer Aufbau einer horizontalen Gelelektrophorese-Apparatur (Flachbettgel)*

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wird die Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel bewirkt. Die SDS-Protein-Komplexe bewegen sich nun unabhängig von der voraus laufenden Grenzschicht in einem Bereich gleicher Spannung und gleichem pH-Wert in Richtung der positiv geladenen Anode. Gleiche Moleküle laufen in diskreten Zonen, sogenannten Banden, durch das Gel. Je größer die Moleküle sind, desto mehr nimmt ihre elektrophore-

tische Mobilität in der Polyacrylamid-Matrix ab. Kleinere Proteine wandern demnach schneller durch das Gel als größere Proteine. Die Gelelektrophorese wurde beendet, sobald die kleinsten, mobilsten Moleküle (erkennbar anhand des sichtbaren Bromphenolblaus) das Ende des Gels erreicht haben.

Die Einstellung der elektrischen Parameter (Spannung, Stromstärke und Leistung) ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen. Die Werte wurden während des Laufs schrittweise erhöht, um nach einem anfänglichen Sammeln der Moleküle eine adäquate Trennung des Proteingemischs zu gewährleisten.

	Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Leistung [W]	Zeit
1	200	15	10	1 h 30 min
2	600	25	20	30 min
3	1000	35	60	variabel

Tabelle 3-7: *Einstellung der elektrischen Parameter für die Gelelektrophorese*

3.5.4 DETEKTION DER PROTEINBANDEN MITTELS SILBERFÄRBUNG

Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte die unmittelbare Detektion der Proteinbanden mit Hilfe der Silberfärbung [174]. Hierbei wurden die durch das Gel entstandenen Proteinbanden durch Ausfällung von Silberionen sichtbar gemacht. Diese Methode zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität im Vergleich zu anderen Färbemethoden aus. Die Nachweisgrenze liegt im Nanogrammbereich (0,1-1,0 ng pro Bande).

Die verwendeten Substanzen stammen aus dem Silberfärbungs-Kit der Firma GE Healthcare Biosciences (D-Freiburg). Alle Lösungen wurden mit aqua bidest. frisch am Tag der Versuchsdurchführung angesetzt. Zunächst wurden die Proteine durch eine Fixierlösung im Gel denaturiert. Ein weiteres Wandern der Proteine wurde damit verhindert. Nach anschließender Sensibilisierung und ausreichendem Waschen erfolgte die Inkubation in einer Silbernitratlösung. Dadurch lagern sich Silberionen an die Proteine an. Überschüssige Silberionen wurden durch erneutes Waschen entfernt. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel in einer Entwicklerlösung inkubiert. Durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd wurden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Dieses färbt die Stellen im Gel, an denen Proteine vorhanden sind mit unterschiedlicher Intensität, in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Haben die Proteinbanden die gewünschte Färbung erreicht, wird die Reaktion schließlich mit der Stopplösung beendet. Nach abschließender Inkubation in einer Glycerollösung wird das Gel, umhüllt von zwei Cellophanblättern, über Nacht in einem Geltrocknungsrahmen (Roth, D-Karlsruhe) getrocknet.

Schritt	Lösung	Menge	Zeit
Fixierung	Ethanol Eisessig aqua bidest.	100 ml 25 ml auf 250 ml	30 min
Sensibilisierung	Ethanol Glutardialdehyd (25 % w/v) Natriumthiosulfat (5 % w/v) Natriumacetat (17 g) aqua bidest.	75 ml 1,25 ml 10 ml 1 Paket auf 250 ml	30 min
Waschen	aqua bidest.		3 × 5 min
Silberfärbung	Silbernitrat-Lösung (2,5 % w/v) Formaldehyd (37 % w/v) aqua bidest.	25 ml 0,1 ml auf 250 ml	20 min
Waschen	aqua bidest.		2 × 1 min
Entwicklung	Natriumcarbonat (6,25 g) Formaldehyd (37 % w/v) aqua bidest.	1 Paket 0,05 ml auf 250 ml	2-5 min
Stopp	EDTA-$Na_2 \times 2H_2O$ (3,65 g) aqua bidest.	1 Paket auf 250 ml	10 min
Waschen	aqua bidest.		3 × 5 min
Aufbewahrung	Glycerol (87 % w/v) aqua bidest.	25 ml auf 250 ml	20 min

Tabelle 3-8: *Protokoll für die Silberfärbung von Proteinen*

3.6 BLOTTING ZUM NACHWEIS SPEZIFISCHER PROTEINE

3.6.1 KONTAKTBLOT DER ZUVOR GELELEKTROPHORETISCH AUFGETRENNTEN PROTEINE

Unter dem Begriff Blotten versteht man den Transfer von Molekülen auf eine Membran (Polyvinyldifluorid/PVDF, Nitrozellulose oder Nylon), verbunden mit der dortigen irreversiblen Fixierung. Dies ermöglicht den qualitativen und quantitativen Nachweis der adsorbierten, zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Moleküle, mit spezifischen komplementären Strukturen (im Sinne eines Antigen-Antikörper-Nachweises). Um diese Spezifität gewährleisten zu können, müssen im Anschluss an den Transfer zunächst die freien Bindungsstellen der Membran mit geeignetem Blockierungspuffer inaktiviert werden.

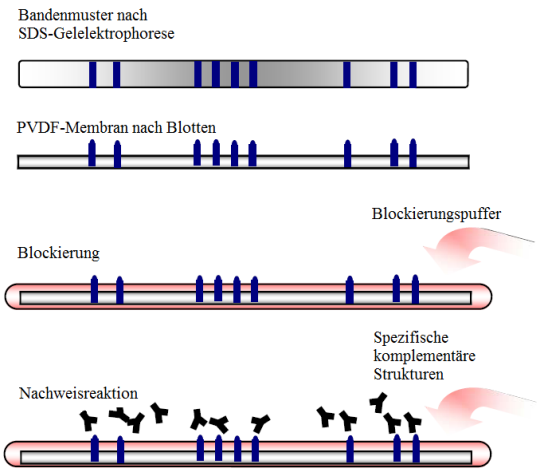


Abbildung 3-15:
Schematischer Ablauf des Blottens mit anschließender Nachweisreaktion [231]

Eingeführt wurde die *Blotting*-Technik 1975 von *Edwin Southern* mit dem sogenannten *Southern Blot*, einer Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit nachfolgender Hybridisierung. In Anlehnung an seinen Versuch wurde die entsprechende Auftrennung von RNA-Fragmenten *Northern Blot* und das Proteinblotting als *Western Blot* bezeichnet (Namensgebung durch *W. N. Burnette*).

Vor dem eigentlichen Blot wurden die Proteingemische der bakteriellen Homogenate, wie bereits in Kapitel 3.5 beschrieben, mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese in einer Polyacrylamidmatrix entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Unmittelbar im Anschluss daran erfolgte das Blotten. Die Übertragung der Proteine auf die Membran ist dabei auf unterschiedliche Art und Weise möglich. Der hier zur Anwendung gekommene Kontaktblot beruht auf einer auf Diffusion basierenden Übertragung.

Die an die Größe des Gels angepasste PVDF-Membran wurde zunächst 10 Minuten in 100%igem Methanol aktiviert und anschließend mit aqua bidest. gründlich abgespült. Sowohl die PVDF-Membran als auch das Gel wurden anschließend für 15 Minuten in Transferpuffer (12 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 96 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert.

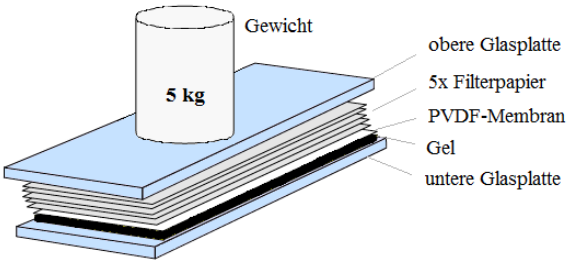


Abbildung 3-16:
Schematischer Aufbau eines Blot-Sandwichs

Zum Aufbau des Blot-Sandwichs wurden folgende Schichten luftblasenfrei übereinander gestapelt: Glasplatte – Gel – PVDF-Membran – fünf Filterpapierstreifen – Glasplatte. Unter dem Gewicht eines fünf Kilogramm schweren Zylinders erfolgte über einen Zeitraum von 1,5 Stunden das Blotten. Abbildung 3-16 veranschaulicht den Aufbau des Blot-Sandwichs.

Somit wandern die Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran. Auf der Membranoberfläche werden sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen immobilisiert. Dabei bleibt das Trennmuster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten – die Proteine sind anschließend für weitere Methoden zugänglich.

Um den Erfolg des Proteintransfers visuell beurteilen zu können, wurde ein vorgefärbter Protein-Standard (*Multi Mark, MultiColoured Standard*, Invitrogen, D-Karlsruhe) eingesetzt, dessen Proteinbanden (4-250 kDa) bereits ohne Färbung direkt im Gel und auf der PVDF-Membran sichtbar erscheinen. Somit kann die optimale Dauer des Blottens bestimmt werden, bei dem ein Großteil der Proteine die PVDF-Membran erreicht, bevor es zu einem weiteren Übertritt auf die nachfolgenden Filterpapierstreifen kommt. Zur weiteren Beurteilung des durchgeführten Blots können zurückgebliebene Proteine im geblotteten Gel direkt im Anschluss mit Hilfe der Silberfärbung dargestellt werden (vgl. Kapitel 3.5.4).

Parallel dazu erfolgte die Weiterbehandlung der PVDF-Membran. Nach dem erfolgreichen Proteintransfer müssen zunächst alle freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich sonst Antikörper an diese Bindungsstellen heften können und somit einen spezifischen Nachweis von Antigenen (Proteinen) unmöglich machen würden. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem geeigneten Blockierungspuffer (20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 137 mM NaCl, 2 % Tween 20, pH 7,6), dessen Moleküle nicht in der Lage waren an der nachfolgenden spezifischen Reaktion teilzunehmen. Durch das simultane Auswaschen des an den Proteinen angelagerte SDS erlangten die Proteine so gleichzeitig ihre ursprüngliche Sekundär- und Tertiärstruktur zurück.

3.6.2 NACHWEIS BIOTINYLIERTER PROTEINSTRUKTUREN

Zum Nachweis aller geblotteten biotinylierten Proteine des bakteriellen Homogenats erfolgte eine 60-minütige Inkubation in einem hochsensitiven Enzym-Antikörper-Konjugat (Neutravidin-Peroxidase 1 mg/ml, 1:10.000 in Tris-Probenpuffer verdünnt). Ausgiebige Waschschritte (1 × 15 Minuten, 3 × 5 Minuten, schüttelnd) mit Tris-Waschpuffer (20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 137 mM NaCl, 2 % (v/v) Tween 20, pH 7,6) dienten der Entfernung schwächer haftender, unspezifisch gebundener Antikörper von der Membran. Anschließend erfolgte die Detektion mit Hilfe der ECL™ (*Enhanced Chemo-Luminescence*)-Reagenz (Amersham Pharmacia Biotech, US-Piscataway) nach Herstellerangaben (Lösung 1+2 1:1 miteinander

gemischt, 0,125 ml/cm²). Dazu wird die in einer Klarsichtfolie platzierte Membran nach einminütiger ECL-Inkubation in einer Filmkassette (Siemens, D-München) entsprechend positioniert. Das in dem ECL-Reagenz enthaltene Luminol ($C_8H_7N_3O_2$) wird durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid im alkalischen Milieu in einen angeregten Zustand versetzt. Die an Neutravidin gebundene Peroxidase katalysiert diesen Vorgang. Beim Übergang in den Grundzustand sendet das angeregte Luminol eine chemische Lumineszenz aus, die als blaues Licht (Δ_{max} = 495 nm) mit einem lichtempfindlichen Röntgenfilm (*High Performance Chemiluminescence Film*, Amersham Biosciences) positionsgenau detektiert werden kann. Die Belichtungszeit (beginnend bei einer Minute) wurde entsprechend variiert. Die Filmentwicklung fand im abgedunkelten Röntgenlabor statt. Nach ein- bis fünfminütiger Entwicklung in entsprechender Entwickler-Lösung (AGFA, D-Köln) und anschließender Spülung in Wasser erfolgte die ca. dreiminütige Inkubation in der Fixierer-Lösung (AGFA). Nach erneuter, ausgiebiger Spülung in Wasser wurde der Röntgenfilm abschließend getrocknet und ausgewertet.

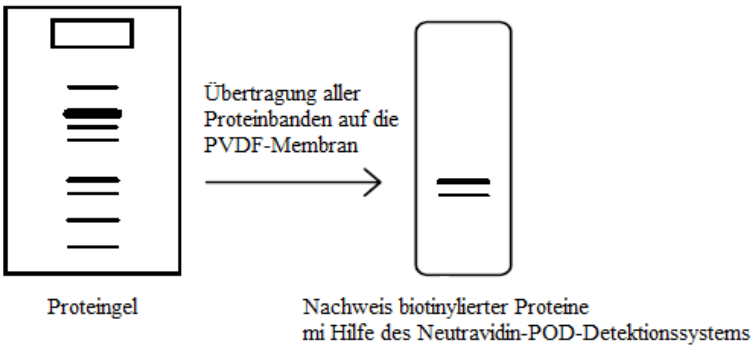


Abbildung 3-17:
Nachweis biotinylierter Proteine mit Hilfe des Kontaktblots

Durch die Mitführung eines biotinmarkierten Standards (*biotinylated SDS Molecular Weight Standard*, 6,5-180 kDa, Sigma-Aldrich, D-Steinheim) ist es möglich, all die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten, biotinylierten Proteine ihres Molekulargewichts entsprechend darzustellen und zu charakterisieren. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines digitalen Messprogramms.

3.6.3 NACHWEIS GLYKOSYLIERTER, BIOTINYLIERTER PROTEINSTRUKTUREN

Zur Identifikation derjenigen biotinylierten Proteine der bakteriellen Homogenate, die für die spezifische Lektinbindung verantwortlich sind, wurden die im Blot eingesetzten Membranen zunächst in entsprechender Beschichtungs-Glykokonjugat-Lösung vorinkubiert. Im Gegensatz zur Verwendung nicht vorinkubierter Membranen werden so nur die Proteine geblottet, die in der Lage sind, auf der mit spezifischem Glykokonjugat-vorbehandelten Membran zu adhärieren. Zum Ausschluss aller Bindungsmechanismen, die dabei nicht auf einer Protein-Kohlenhydrat-

Bindung (Lektinbindung) basieren, wurden neben den entsprechenden Beschichtungs-Glykokonjugaten auch die jeweiligen deglykosylierten Formen eingesetzt.

Analog zu der zuvor beschriebenen Versuchsdurchführung wurden die Membranen auch hier initial 10 Minuten in 100%igem Methanol aktiviert und anschließend mit aqua bidest. gründlich abgespült. Die Inkubation in der entsprechenden Beschichtungs-Glykokonjugat-Lösung erfolgte in Polypropylen-Röhrchen im Überschuss (1:100-Verdünnung in Beschichtungspuffer), zunächst 1 Stunde bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei 4 °C auf dem Rollschüttler, um eine möglichst gleichmäßige Benetzung der Membranen zu gewährleisten. Durch die Verwendung von Polypropylen-Röhrchen konnte die Bindung der Glykoproteine an die Röhrchenwand minimiert werden. Am zweiten Tag erfolgte die Blockade der vorinkubierten Membranen mit Blockierungspuffer (20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 137 mM NaCl, 2 % Tween 20, pH 7,6). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Puffer ausgewechselt und erneut über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die weiterführende Durchführung analog der im Kapitel 3.6.1 beschriebenen Vorgehensweise. Die vorinkubierten Membranen mussten dabei direkt im Vorfeld des Kontaktblots nicht ein weiteres Mal in Methanol aktiviert werden. Der Nachweis gebundener Proteine erfolgte auch hier mit Hilfe des Neutravidin-POD-Detektionssystems mit abschließender Katalyse und Detektion einer Chemilumineszenz-Reaktion.

4 ERGEBNISSE

4.1 GEWINNUNG BIOTINYLIERTER OBERFLÄCHENMEMBRANPROTEINE KARIES-ÄTIOLOGISCH BEDEUTSAMER BAKTERIEN

4.1.1 BAKTERIELLE KULTIVIERUNG

Die bakterielle Kultivierung erfolgte für jeden der drei Bakterien-Stämme jeweils innerhalb einer Woche gemäß der unter 3.1.1 beschriebenen Methode. Die zunächst klare, leicht gelblich gefärbte Bouillon erfuhr nach Beimpfung mit zunehmender Inkubation eine deutliche Trübung. Am Boden der Bakterienbouillon bildeten sich dicke, dichte, weißliche Flocken.

Der in regelmäßigen Abständen zum Keimnachweis und zur Reinheitskontrolle angefertigte fraktionierte Ausstrich zeigte bei der Anzucht aller bakteriellen Keime deutlich ein homogenes Bild einer typischen Kokken-Kultur. Die Einzelkolonien auf den entsprechenden Blutagarplatten erschienen als einheitliche, rundliche, konvexe Gebilde (Durchmesser 0,5-1,0 mm) mit granulierter Oberfläche.

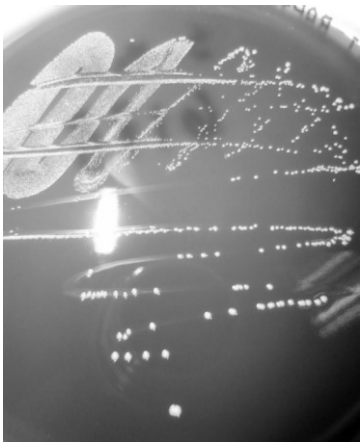


Abbildung 4-1:
Exemplarische Darstellung eines fraktionierten Ausstrichs auf einer Blutagarplatte zur Reinheitskontrolle

Im Phasenkontrastmikroskop erschienen die Streptokokken als dunkle, mehr oder weniger lange, unverzweigte Ketten vor einem hellen Hintergrund. Während zu Beginn überwiegend haufenförmige, körnige Gebilde mit langen Ketten (ca. 50-200 Kettenglieder) das Bild dominierten, erschienen zu einem späteren Zeitpunkt der Anzucht kaum noch haufenförmige Aggregate, stattdessen eher kurze Ketten mit ca. 5-10 Kettengliedern.

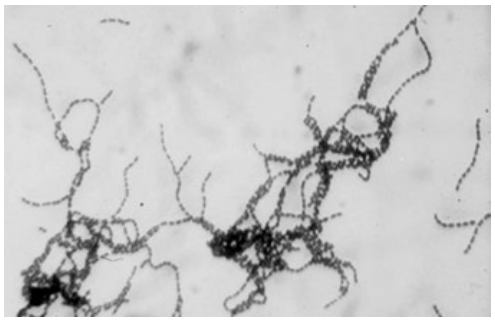


Abbildung 4-2:
Mikroskopische Darstellung der unverzweigten Ketten von S. mutans

4.1.2 BAKTERIELLE AUFREINIGUNG

Ausgehend von der gezüchteten Bakterienbouillon konnten für jeden Keim innerhalb von drei Tagen biotinylierte Oberflächenmembranproteine in Form eines bakteriellen Homogenats > 10 kDa, < 0,2 µm isoliert werden. Alle Schritte der bakteriellen Aufreinigung (Biotinylierung, Lyse, Filtration) verliefen dabei entsprechend dem in Kapitel 3.1.2 - 3.1.4 beschriebenen Vorgehen.

Zur Kontrolle eines erfolgreichen Ablaufs sowie zur internen Qualitätssicherung wurden im Laufe des Prozesses mehrere Proben nach entsprechenden Aufbereitungsschritten genommen. Durch den Einsatz der gewonnenen Proben in späteren Versuchen (kompetitiver Lektinbindungs-Inhibitionsassay, SDS-Gelelektrophorese, Kontaktblot etc.) konnte sowohl eine erfolgreiche Biotinylierung als auch eine effiziente Filtration nachgewiesen werden.

4.2 CHARAKTERISIERUNG DER GEWONNENEN BAKTERIELLEN HOMOGENATE

4.2.1 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Mit Hilfe des BCA-Tests konnte die Proteingesamtkonzentration der gewonnenen bakteriellen Homogenate der Keime *S. mutans* DSM 20523 und 6178 sowie *S. sobrinus* DSM 20381 in Korrelation zu einem Referenzprotein bestimmt werden.

Die Standardkurvengrafik des Referenzproteins Albumin zeigte eine lineare Regression mit einem Regressionskoeffizienten [r] von annähernd 1. Demzufolge konnte von einer relativ genau bestimmten Proteinkonzentration der einzelnen Proben ausgegangen werden.

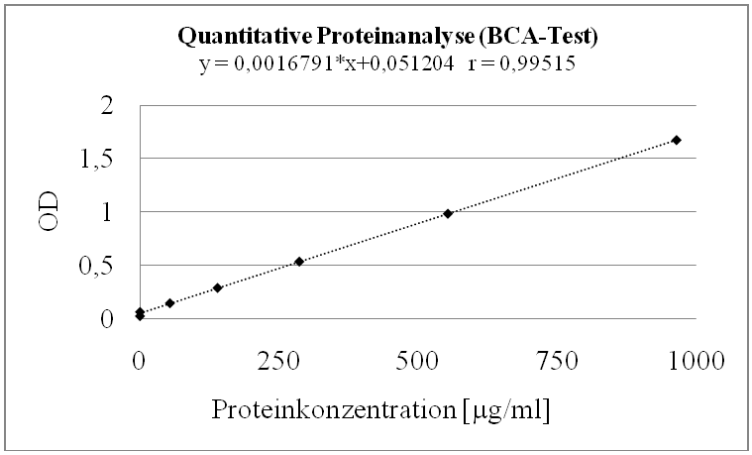


Abbildung 4-3:
Eichgerade des Referenzproteins Albumin

In Bezug auf das Referenzprotein konnten folgende mittlere Konzentrationen für die entsprechend eingesetzten Verdünnungen ermittelt werden:

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	**Standard 1:2** 964,34		**DSM 20523 1:2** 719,75		**DSM 6178 1:2** 385,52		**DSM 20381 1:2** 317,42					
B	**1:4** 533,32		**1:5** 276,54		**1:5** 176,34		**1:5** 147,22					
C	**1:8** 286,37		**1:10** 182,77		**1:10** 87,78		**1:10** 81,59					
D	**1:16** 139,36		**1:50** 29,45		**1:50** < Min		**1:50** < Min					
E	**1:32** 53,81		**1:100** < Min		**1:100** < Min		**1:100** < Min					
F	**1:64** < Min		**1:200** < Min		**1:200** < Min		**1:200** < Min					
G	**1:128** < Min		**1:500** < Min		**1:500** < Min		**1:500** < Min					
H	**LW**		**1:1000** < Min		**1:1000** < Min		**1:1000** < Min					

Abbildung 4-4*: Mittlere Konzentrationen eingesetzter Verdünnungen [µg/ml] im BCA-Test*

Die Proteingesamtkonzentration der einzelnen Proben errechnet sich aus dem Produkt der gemessenen Konzentrationen und dem Verdünnungskoeffizienten. Es erfolgte eine Mittelwertbestimmung unter Berücksichtigung eines steigenden Fehlerquotienten mit zunehmender Verdünnung.

Probe	Proteingesamtkonzentration
Bakterielles Homogenat DSM 20523	1530,56 µg/ml
Bakterielles Homogenat DSM 6178	843,52 µg/ml
Bakterielles Homogenat DSM 20381	728,94 µg/ml

Tabelle 4-1: *Ermittelte Proteingesamtkonzentrationen der bakteriellen Homogenate*

Auf adäquate Art und Weise wurde auch für weitere Proben (deglykosylierte BSA-Glykokonjugate, gewonnene Filtrate und Retentate etc.) deren Proteingesamtkonzentration bestimmt. So konnten die Proben in der Gelelektrophorese und im Blot entsprechend der ermittelten Gesamtkonzentration optimal auf die vorgesehene Proteinkonzentration verdünnt werden.

4.2.2 ERMITTLUNG DER BINDUNGSSPEZIFITÄTEN DER BAKTERIELLEN HOMOGENATE MIT HILFE DES LEKTINBINDUNGS-INHIBITIONSASSAYS

4.2.2.1 STANDARDKURVEN DER EINGESETZTEN PFLANZENSPEZIFISCHEN LEKTINE

Für alle eingesetzten pflanzenspezifischen Lektine konnte mit Glykokonjugaten entsprechender Glykanspezifität eine signifikante Verdrängung dieser Lektine an komplementären Glykananteilen immobilisierter Neoglykoproteine festgestellt werden. Die jeweiligen Glykanstrukturen dieser Glykokonjugate entsprechen der von *Wu* et al. festgelegten Bindungsspezifität pflanzenspezifischer Lektine [235].

PFLANZENSPEZIFISCHES LEKTIN	BINDUNGSSPEZIFITÄT [235]
PNA	β-Galaktose-1,3-N-Acetyl- Galaktosamin
SNA	α-2,6-gebundene Sialinsäure (NANA)
GNA	terminale Mannose
ConA	Trimannosyl-Struktur in High-Mannose-Typ-Glukanen (verzweigte Mannose)
AAA	α-1,6-gebundene Fukose

Tabelle 4-2: *Pflanzenspezifische Lektine und ihre Bindungsspezifität*

Mit Hilfe einer definierten Standardverdünnungsreihe ließ sich für jedes Lektin eine halblogarithmische Standardkurve mit sigmoidem Kurvenverlauf graphisch darstellen. Die eingesetzten Konzentrationen der entsprechenden Referenzglykokonjugate wurden dazu gegen das Ausmaß der vom Spektralphotometer gemessenen Extinktion (optischen Dichte) im Diagramm aufgetragen. Die Bindungsfähigkeit der Lektine steht dabei in direkter Beziehung zum Ausmaß der

jeweiligen Extinktion, da das gemessene Signal umso größer wird, je mehr Lektin in der Lage ist, an die festphasenadsorbierten Neoglykoproteine zu adhärieren.

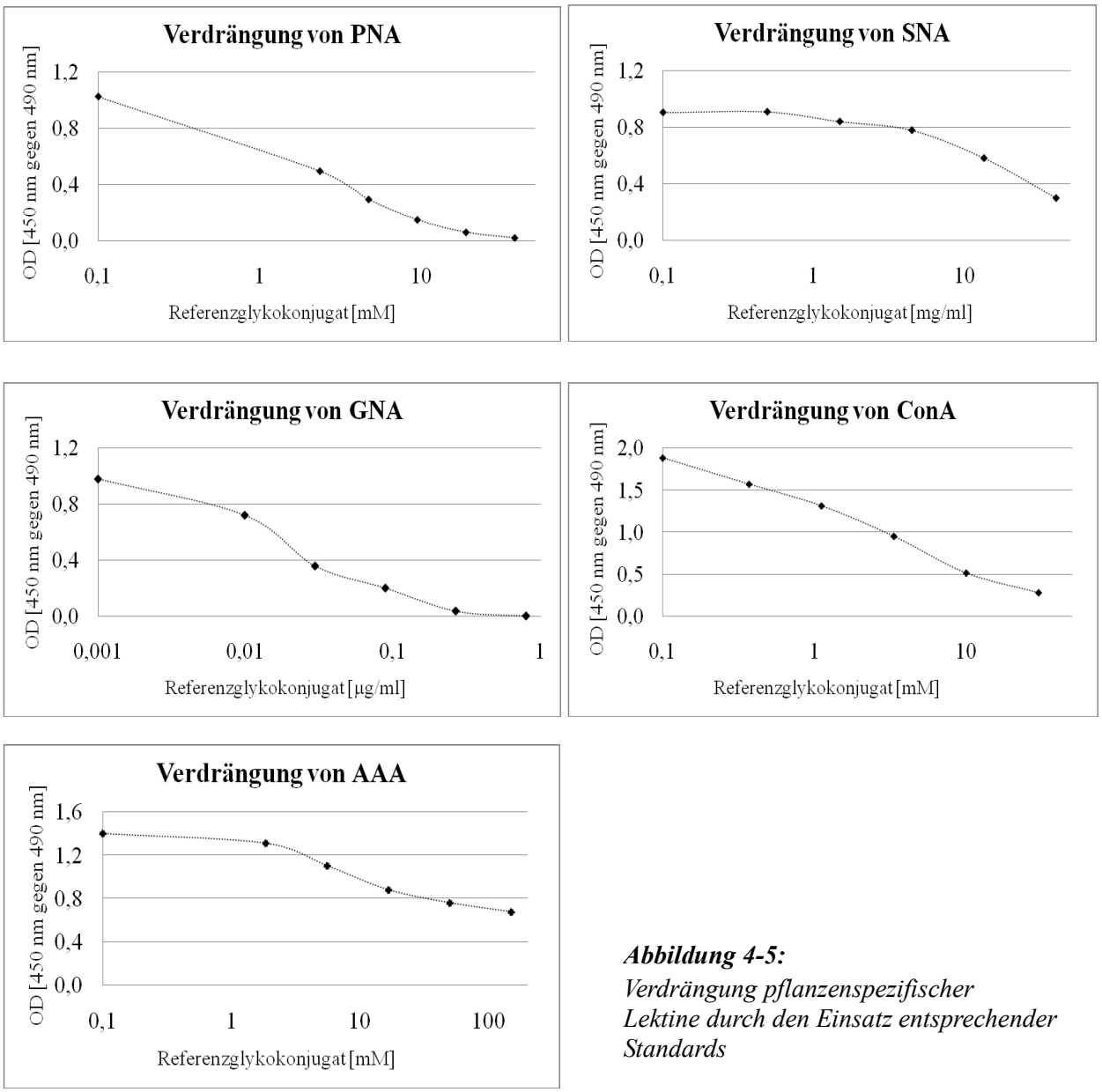


Abbildung 4-5:
Verdrängung pflanzenspezifischer Lektine durch den Einsatz entsprechender Standards

Die gemessenen optischen Dichten lagen alle in dem für das Spektralphotometer typischen Messbereich von 0,01 bis 2,0. Doppelwerte ohne signifikante Abweichung (≤ 25 %) gingen in die Auswertung ein.

Für jedes der eingesetzten pflanzenspezifischen Lektine war eine deutliche Abnahme der Bindungsintensität mit steigender Konzentration des verdrängenden Glykokonjugats erkennbar. Unterschiede wurden im Ausmaß einer möglichen Lektinverdrängung deutlich. Während bei den pflanzlichen Lektinen PNA, GNA und ConA bis auf ein nahezu absolutes Bindungsminimum

inhibiert werden konnte, blieb für SNA und AAA auch bei Zugabe der Maximalkonzentration des entsprechenden Glykokonjugats eine gewisse Bindung zwischen Lektin und festphasenadsorbiertem Neoglykoprotein erhalten. Dennoch war bei allen Lektinen bei ausreichender Konzentration des spezifischen Glykokonjugats eine asymptotische Annäherung der gemessenen Werte an eine bestimmte Lektinbindung zu beobachten.

4.2.2.2 LEERWERT-KONTROLLE

Zur Bestimmung der tatsächlichen Lektinbindung an die festphasenadsorbierten Neoglykoproteine erfolgte auf jeder Mikrotiterplatte, wie unter 3.4.2 beschrieben, für jedes Lektin eine Leerwertkontrolle.

Trotz entsprechend langer Inkubation bei den Fetuin- und BSA-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-beschichteten Mikrotiterplatten bis zum Eintritt des Farbumschlags (20-30 Minuten) lagen die Leerwerte aller gemessenen Platten in einem tolerierbaren Bereich. Die Leerwerte einer Platte wurden gemittelt und bei der Leerwertkorrektur entsprechend berücksichtigt.

4.2.2.3 EINSATZ DEGLYKOSYLIERTER BSA-GLYKOKONJUGATE ZUM AUSSCHLUSS ALLER NICHT AUF GLYKANSPEZIFISCHEN BINDUNGSMECHANISMEN BERUHENDEN BINDUNGEN

Zwischen erster, zweiter und dritter Deglykosylierung waren deutliche Unterschiede bezüglich der maximalen Lektinbindung und Verdrängung der pflanzenspezifischen Lektine erkennbar. Während zwischen erster und zweiter Deglykosylierung eine eindeutige Reduktion des Bindungsvermögens deutlich wurde, konnte nach dreifacher Periodat-Behandlung kaum noch eine signifikante Abnahme der maximalen Lektinbindung festgestellt werden. Ebenso konnte die zu Beginn deutlich stattfindende Verdrängung nach dreifacher Deglykosylierung kaum noch nachgewiesen werden. Die Bindung an dreifach deglykosylierte Beschichtungs-Glykokonjugate lag für alle pflanzenspezifischen Lektine nur knapp oberhalb des gemessenen Leerwerts. Die Extinktionen für ConA und AAA lagen dabei im Gegensatz zu den anderen Pflanzenlektinen (PNA, SNA und GNA) geringfügig höher (OD von 0,14-0,25 im Vergleich zu 0,01-0,03).

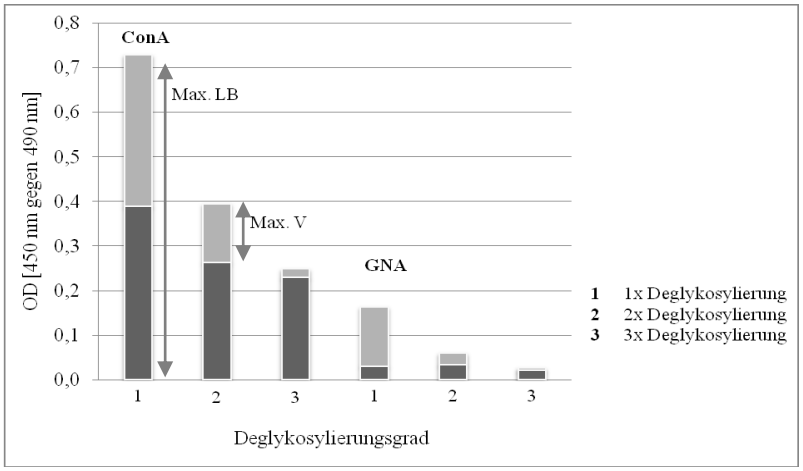


Abbildung 4-6:
Vergleich von ConA und GNA bezüglich ihrer maximalen Bindung auf zunehmend deglykosyliertem Beschichtungs-Glykokonjugat (BSA-α-Mannopyranosid);
LB = Lektinbindung
V = Verdrängung

Die Bindung der bakteriellen Homogenate an das dreifach deglykosylierte Beschichtungs-Glykokonjugat fiel generell etwas ausgeprägter aus als die der Pflanzenlektine (OD von 0,1-0,5). Am stärksten war dabei die Bindung an BSA-α-Mannopyranosid und BSA-Fukosylamid. Das bakterielle Homogenat des Keims *S. mutans* DSM 20523 zeigte auf allen eingesetzten Beschichtungen jeweils die höchsten Werte (OD).

Analog zu den pflanzenspezifischen Lektinen konnte für alle bakteriellen Homogenate bei entsprechender Spezifität eine deutliche Abnahme der maximalen Lektinbindung und der Verdrängung mit zunehmender Deglykosylierung des entsprechenden Beschichtungs-Glykokonjugats festgestellt werden. Die gemessenen optischen Dichten zwischen zweiter und dritter Deglykosylierung näherten sich deutlich an. Nach dreimaliger Deglykosylierung war keine signifikante Verdrängung des bakteriellen Homogenats mehr nachweisbar. Abbildung 4-7 stellt das Bindungsverhalten mit und ohne Verdränger bei zunehmender Deglykosylierung von BSA-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin exemplarisch am Beispiel von *S. mutans* DSM 20523 graphisch dar.

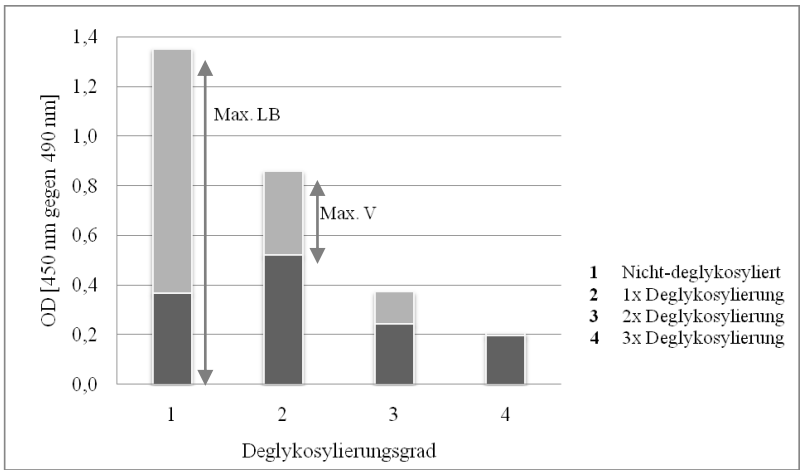


Abbildung 4-7:
Bindungsverhalten und mögliche Verdrängung des bakteriellen Homogenats von S. mutans DSM 20523 auf BSA-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin mit zunehmender Deglykosylierung;
LB = Lektinbindung
V = Verdrängung

Bei fehlender Spezifität des bakteriellen Homogenats war bereits auf dem nicht deglykosylierten Beschichtungs-Glykokonjugat eine nur sehr schwache Bindung nachweisbar (OD von 0,1-0,6). Diese ließ sich nicht signifikant verdrängen und blieb auch mit zunehmender Deglykosylierung auf gleichbleibendem Niveau.

Der Vergleich der unvorbehandelten Beschichtungs-Glykokonjugate mit der entsprechenden dreifach deglykosylierten Form zeigte bei drei der vier eingesetzten Glykokonjugate keinen Unterschied in ihrem Proteinmuster nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Nur deglykosyliertes Fetuin zeichnete sich durch den Verlust einer Proteinbande (ca. 320 kDa) aus.

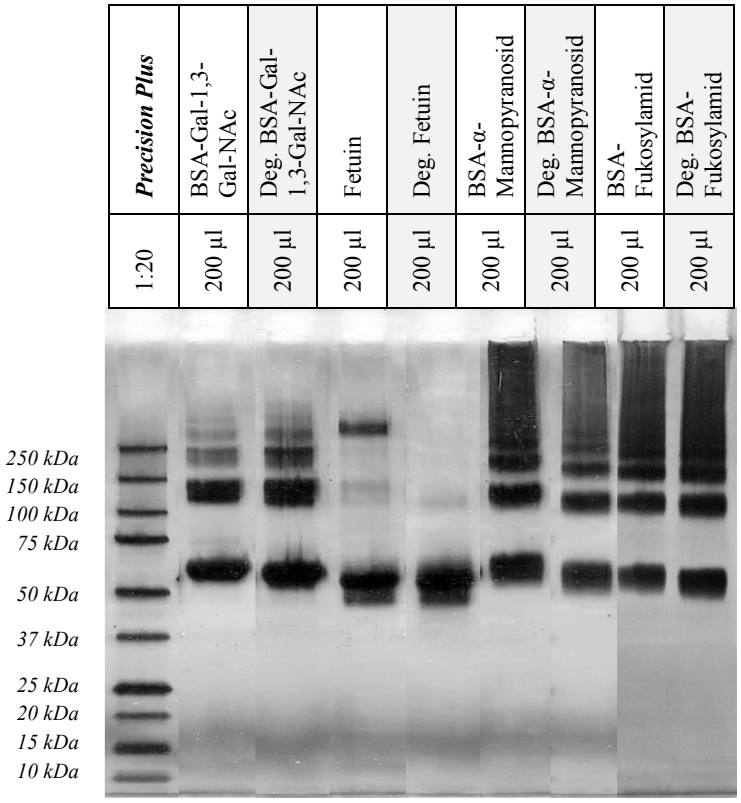


Abbildung 4-8:
Vergleich des Bandenmusters der Beschichtungs-Glykokonjugate vor und nach dreifacher Deglykosylierung

4.2.2.4 BINDUNGSVERHALTEN DER BAKTERIELLEN HOMOGENATE GEGENÜBER DEN EINGESETZTEN BESCHICHTUNGEN

Für die bakteriellen Homogenate ließen sich bezüglich ihres Bindungsverhaltens an die adsorbierten Neoglykoproteine deutliche Unterschiede erkennen. Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht die maximale Lektinbindung der bakteriellen Homogenate auf den unterschiedlichen Beschichtungen im Vergleich zu den pflanzenspezifischen Lektinen. Die maximale Lektinbindung ergab sich aus der maximalen Bindung auf unvorbehandelter Beschichtung abzüglich der maximalen Bindung auf dreifach deglykosylierter Beschichtung, unter Berücksichtigung des Leerwerts.

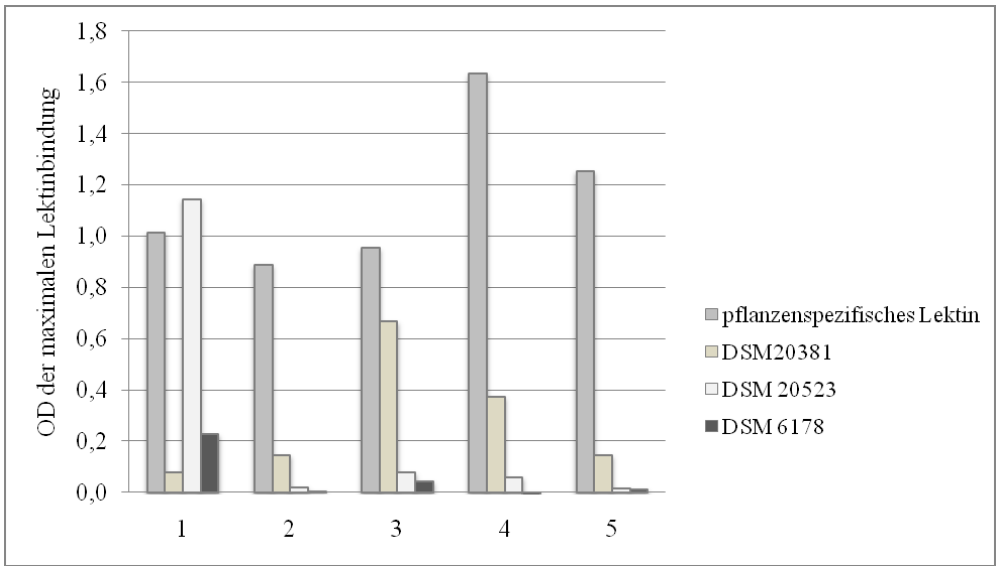


Abbildung 4-9:
Maximale Lektinbindung der bakteriellen Homogenate im Vergleich zu den pflanzenspezifischen Lektinen - 1=BSA-Gal-1,3-Gal-NAc (PNA), 2=Fetuin (SNA), 3=BSA-a-Mannopyranosid (GNA), 4=BSA-a-Mannopyranosid (ConA) und 5=BSA-Fukosylamid (AAA)

Das bakterielle Homogenat von *S. sobrinus* DSM 20381 band signifikant stärker an BSA-α-Mannopyranosid als an die anderen Beschichtungen. Dennoch fand auch für Fetuin, BSA-Fukosylamid und BSA-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin eine geringe glykanspezifische Bindung zwischen bakteriellem Lektin und der Beschichtung statt. Für *S. mutans* DSM 20523 war eine deutliche lektinabhängige Bindungsaffinität für BSA-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin zu erkennen, während das bakterielle Homogenat kaum eine Bindung mit den anderen Beschichtungen einging. Die maximale glykanabhängie Bindung von *S. mutans* DSM 6178 erschien für all die eingesetzten Beschichtungs-Glykokonjugate tendenziell gering. Betrachtet man dies jedoch unter dem Aspekt der generell schwachen Bindungsfähigkeit des Keims, so war auch hier eine vergleichsweise signifikant erhöhte Bindungsaffinität gegenüber BSA-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin zu erkennen.

4.2.2.5 VERDRÄNGUNG DER BAKTERIELLEN HOMOGENATE DURCH SPEZIFISCHE GLYKANRESTE EINGESETZTER GLYKOKONJUGATE

Analog zu der bereits dargestellten Verdrängung pflanzlicher Lektine durch Glykokonjugate entsprechender Bindungsspezifität konnte mit Hilfe bestimmter Glykokonjugate ebenfalls eine Inhibition der bakteriellen Homogenate nachgewiesen werden. Dabei ließen sich die pflanzlichen Lektine in ihrer Bindungsfähigkeit an die festphasenadsorbierten Neoglykoproteine stets effektiver inhibieren als die homogenen Gemische der aufgereinigten Bakterien.

Im Nachfolgenden werden die Einflüsse einer auf glykanspezifischen Bindungsmechanismen basierenden Verdrängung aufgezeigt. Die prozentuale Lektinbindung der bakteriellen Homogenate wurde dazu im Vergleich zu den Verdrängungskurven der pflanzenspezifischen Lektine graphisch dargestellt. Eine 100%ige Lektinbindung entsprach dabei der maximalen Lektinbindung abzüglich der maximalen Verdrängung auf entsprechender Beschichtung (unter Berücksichtigung des Leerwerts).

4.2.2.5.1 BESCHICHTUNG MIT PNA-SPEZIFISCHEM BSA-GALAKTOSE-1,3-N-ACETYL-GALAKTOSAMIN

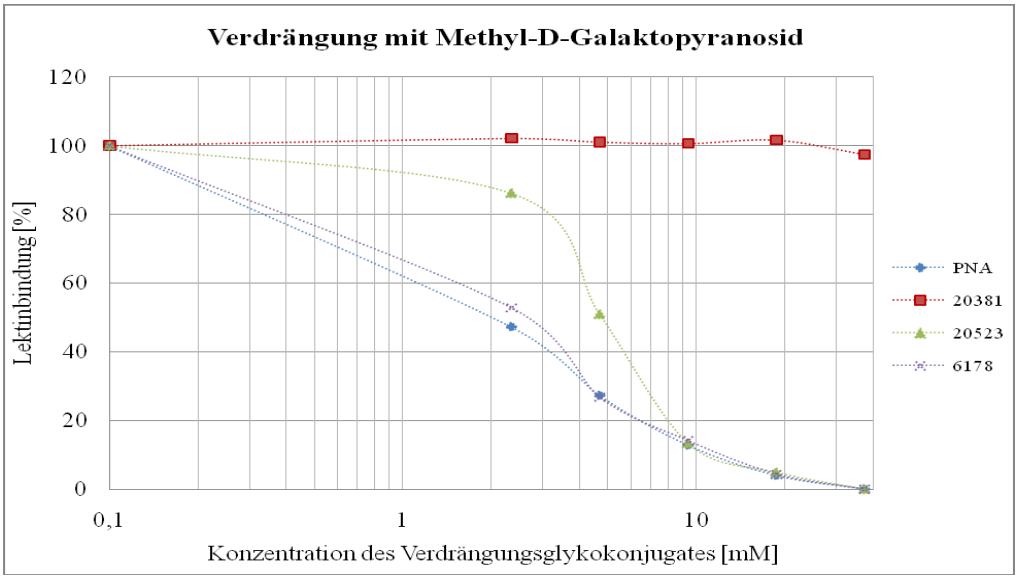


Abbildung 4-10: *Verdrängung der bakteriellen Homogenate mit Hilfe von PNA-spezifischem Verdränger*

Sowohl für *S. mutans* DSM 20523 als auch für *S. mutans* DSM 6178 trat eine signifikante Verdrängung durch Methyl-D-Galaktopyranosid ein. In beiden Fällen reichte bereits der Einsatz minimaler Konzentrationen des Verdrängers aus, um eine deutliche Reduktion der maximalen Bindungsfähigkeit hervorzurufen. Unterschiede wurden deutlich in der Verdrängungskurve der beiden *S. mutans*-Subspezies. *S. mutans* DSM 20523 ließ sich mit geringen Konzentrationen von Methyl-D-Galaktopyranosid zunächst weniger effektiv inhibieren. Während für *S. mutans* DSM 6178 bereits eine Konzentration von ca. 2,5 mM an spezifischem Glykokonjugat ausreichte, um eine 50%-Inhibition der Lektinbindung zu erreichen, waren für *S. mutans* DSM 20523 ca. 5 mM Methyl-D-Galaktopyranosid notwendig, um die Bindung auf die Hälfte zu reduzieren. Mit zunehmender Konzentration des Inhibitors näherten sich die Verdrängungskurven der beiden bakteriellen Homogenate stark aneinander an. Die Verdrängungskurve für *S. mutans* DSM 6178 erschien auffällig kongruent zu der des pflanzlichen Lektins PNA.

Für *S. sobrinus* DSM 20381 konnte keine Verdrängung mit Hilfe von endständigen Galaktosyl-Resten gezeigt werden. Die Bindungsfähigkeit an das festphasenadsorbierte Neoglykoprotein blieb trotz Zugabe von Methyl-D-Galaktopyranosid unterschiedlicher Konzentration auf gleichbleibend niedrigem Niveau.

4.2.2.5.2 BESCHICHTUNG MIT SNA-SPEZIFISCHEM FETUIN

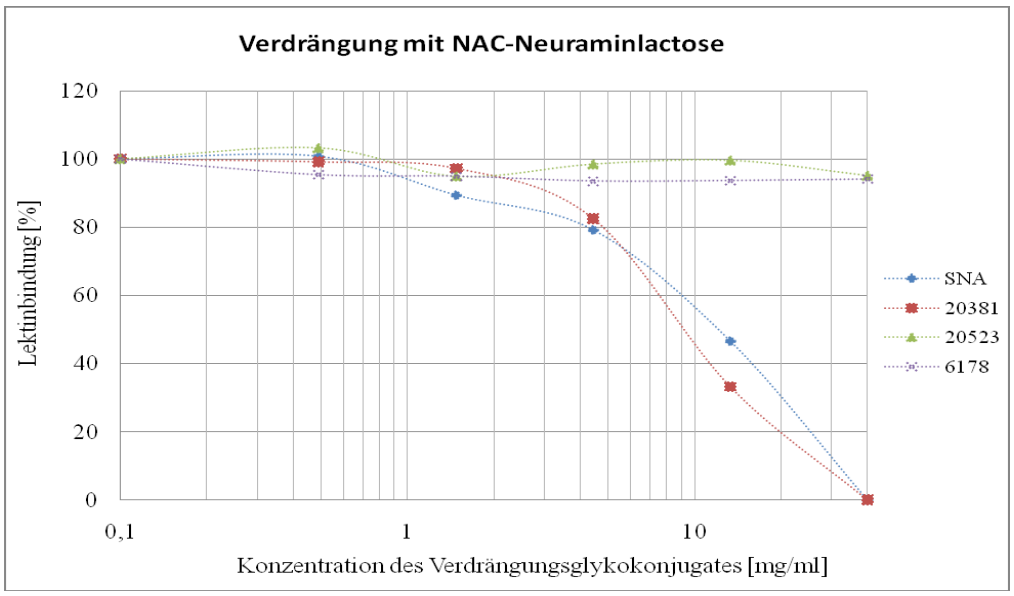


Abbildung 4-11: *Verdrängung der bakteriellen Homogenate mit Hilfe von SNA-spezifischem Verdränger*

Mit Hilfe von NAc-Neuraminlactose konnte auch mit zunehmender Konzentration des Verdrängungs-Glykokonjugats keine Verdrängung für *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 nachgewiesen werden. Die Bindung des Keims *S. sobrinus* DSM 20381 an die feste Phase ließ sich hingegen in geringfügigem Ausmaß mit terminaler α-2,6-gebundenen Sialinsäure inhibieren. Zum Erreichen einer 50%igen Inhibition waren ca. 10 mg/ml N-Acetyl-Neuraminlactose erforderlich.

4.2.2.5.3 BESCHICHTUNG MIT GNA-/CONA-SPEZIFISCHEM BSA-α-MANNOPYRANOSID

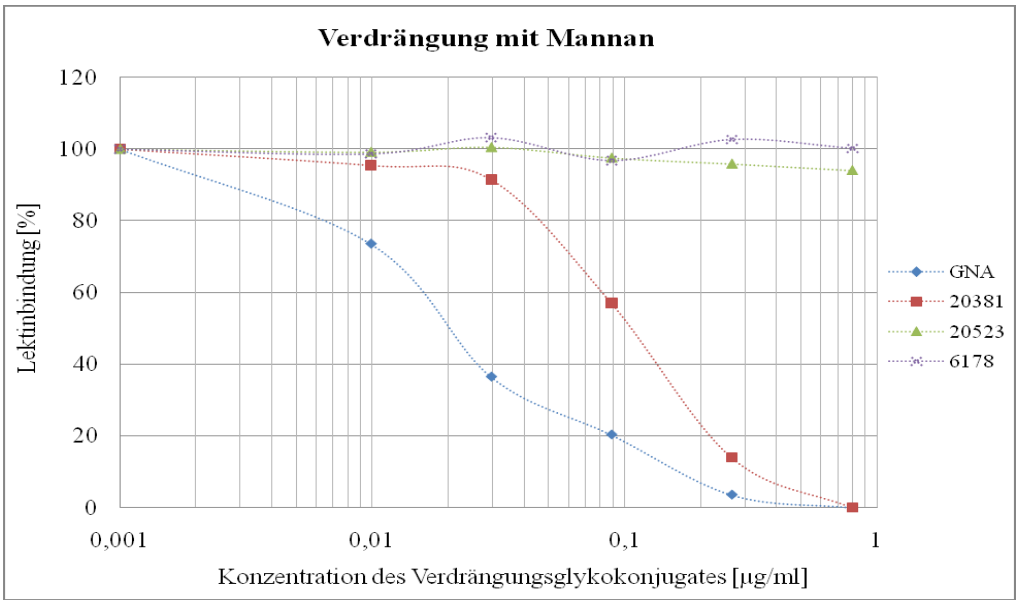


Abbildung 4-12: *Verdrängung der bakteriellen Homogenate mit Hilfe von GNA-spezifischem Verdränger*

Durch den Einsatz von Mannan war eine Verdrängung des Keims *S. sobrinus* DSM 20381, nicht jedoch der beiden *S. mutans*-Subtypen möglich. Auch mit steigender Konzentration des Mannans blieb das Bindungsverhalten von *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 unbeeinflusst. Das bakterielle Homogenat von *S. sobrinus* ließ sich bereits mit geringen Konzentrationen endständiger Mannose in seiner Lektinbindung an die feste Phase deutlich reduzieren. Bereits ca. 0,1 µg/ml Mannan reichten aus, um die 50%-Inhibition zu erreichen.

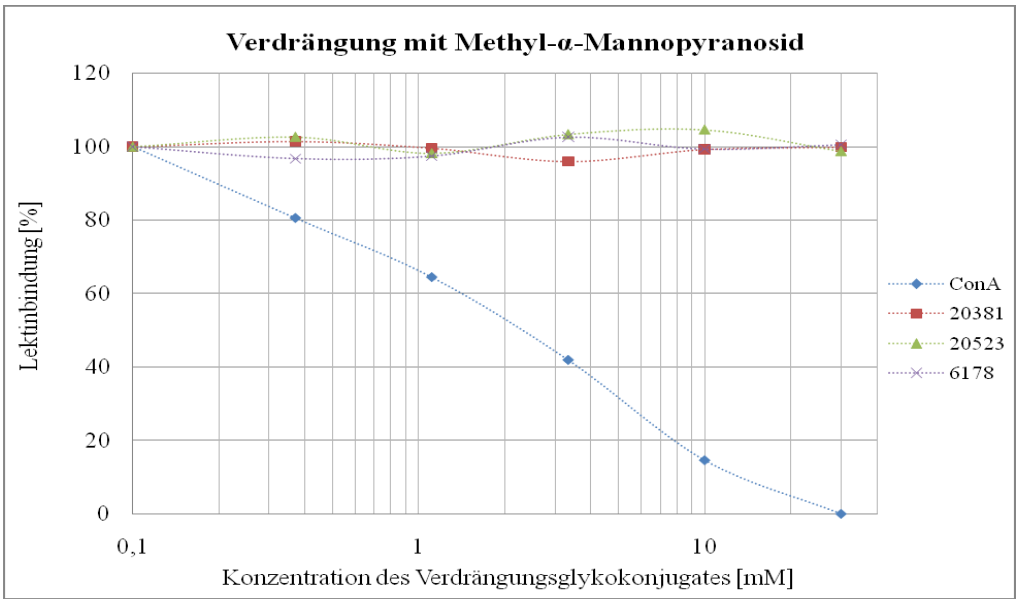


Abbildung 4-13: *Verdrängung der bakteriellen Homogenate mit Hilfe von ConA-spezifischem Verdränger*

Setzte man anstelle der terminalen Mannose ein Verdrängungs-Glykokonjugat mit verzweigten Mannose-Strukturen ein, so war für keines der eingesetzten bakteriellen Homogenate eine signifikante Verdrängung nachweisbar.

4.2.2.5.4 BESCHICHTUNG MIT AAA-SPEZIFISCHEM BSA-FUKOSYLAMID

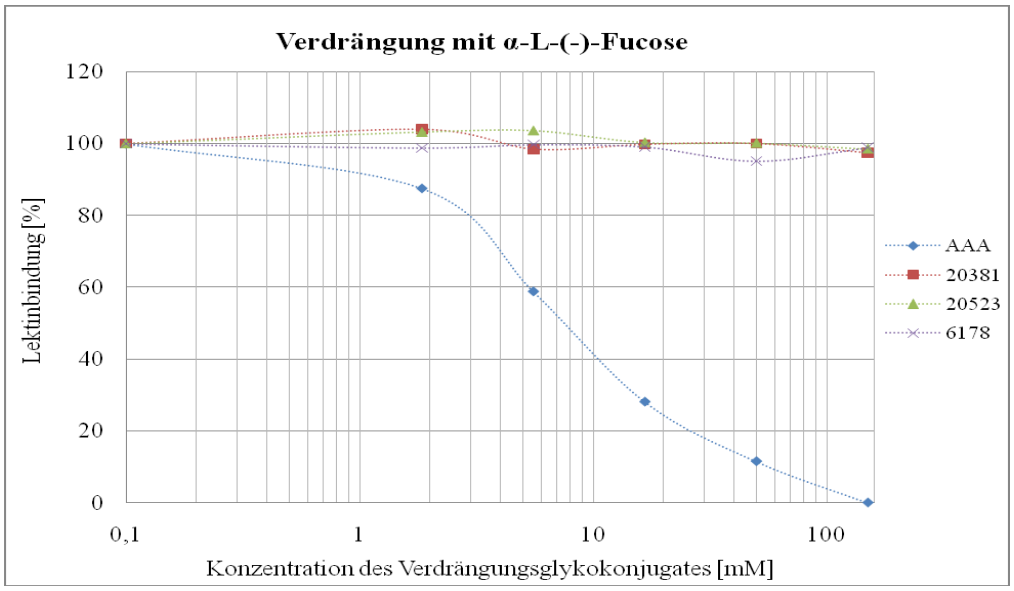


Abbildung 4-14: *Verdrängung der bakteriellen Homogenate mit Hilfe von AAA-spezifischem Verdränger*

Durch den Einsatz von α-L-(-)-Fukose konnte bei keinem der eingesetzten bakteriellen Keime eine signifikante Verdrängung nachgewiesen werden. Die Bindungsfähigkeit an das festphasen-adsorbierte BSA-Fukosylamid blieb trotz zunehmender Konzentration der α-L-(-)-Fukose auf gleichbleibend niedrigem Niveau.

4.2.2.5.5 ZUSAMMENFASSUNG

Die nachfolgende Tabelle stellt die bakteriellen Homogenate mit ihren entsprechenden Bindungsspezifitäten übersichtlich dar.

Bindungsspezifität eingesetzter Verdrängungs-Glykokonjugate	***S. mutans* DSM 20523**	***S. mutans* DSM 6178**	***S. sobrinus* DSM 20381**
β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin	++	++	-
α-2,6-gebundene Sialinsäure	-	-	(+)
terminale Mannose	-	-	++
verzweigte Mannose-Strukturen	-	-	-
α-1,6-gebundene Fukose	-	-	-

Tabelle 4-3: *Bakterielle Homogenate und deren Bindungsspezifität*

4.2.3 DARSTELLUNG DES GESAMTPROTEINS IN DER GELELEKTROPHORESE

Für jedes der fünf eingesetzten pflanzenspezifischen Lektine war ein individuelles Bandenmuster mit mindestens einer stark überladenen Proteinbande zu erkennen. Es handelte sich bei allen Lektinen um ein Proteingemisch unterschiedlicher Molekulargewichte.

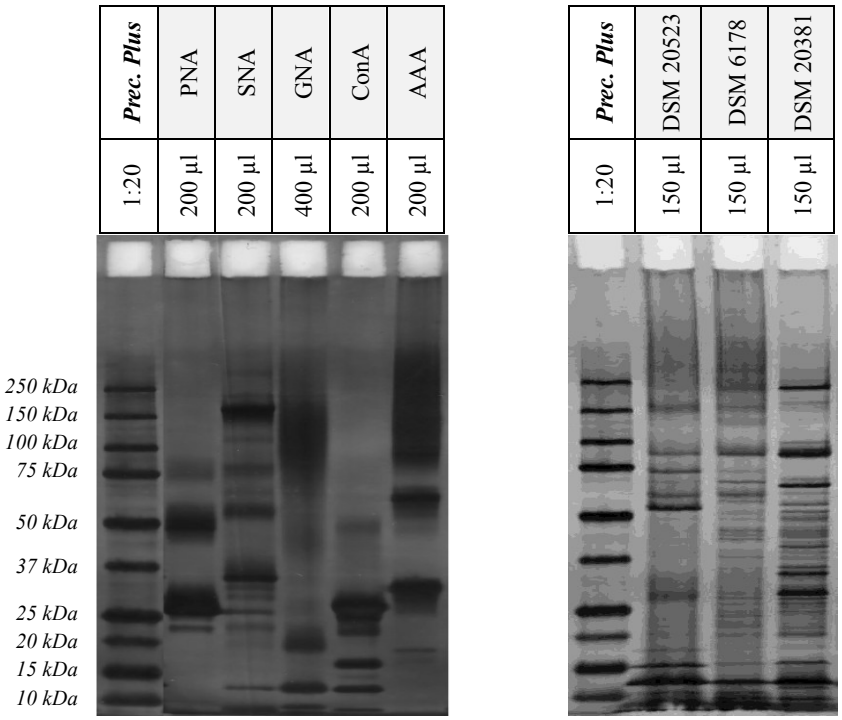


Abbildung 4-15: *Proteinauftrennung der pflanzenspezifischen Lektine (links) und der bakteriellen Homogenate (rechts) in einem 10%igen SDS-Gel im Vergleich zu einem Protein-Standard (Precision Plus, Bio-Rad)*

Auch für die drei bakteriellen Homogenate der Keime *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 sowie für *S. sobrinus* DSM 20381 war jeweils ein individuelles Bandenmuster feststellbar. Jedoch konnten auch mehrere übereinstimmende Proteinbanden identifiziert werden. Während *S. mutans* DSM 20523 vergleichsweise wenig Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts aufwies, konnten bei *S. sobrinus* DSM 20381 eine Vielzahl verschiedener Proteine dargestellt werden. Im Gegensatz zu den pflanzenspezifischen Lektinen konnte bei den bakteriellen Homogenaten keine jeweils klassisch überladene Proteinbande identifiziert werden.

4.2.4 MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG DER IM GEL DARGESTELLTEN PROTEINE

In einem, wie ein Molekularsieb wirkenden Polyacrylamidgel besteht innerhalb eines gewissen Bereichs zwischen den relativen Mobilitäten der SDS-Protein-Komplexe und dem Logarithmus ihres Molekulargewichts eine lineare Abhängigkeit. Mit Hilfe eines gleichzeitig aufgetrennten Markerproteins (*Precision Plus*, Bio-Rad) ließen sich die Molmassen unbekannter Proteinproben

über eine Eichkurve ermitteln. Dieser Marker beinhaltet hoch aufgereinigte, rekombinante Proteine mit bekannten Molekulargewichten im Bereich von 10-250 kDa.

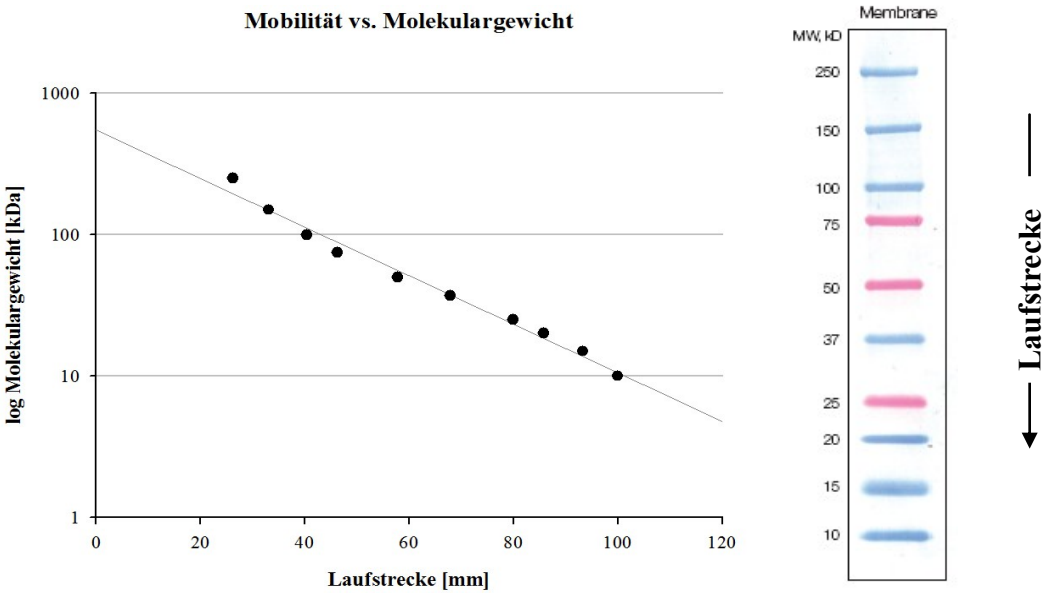


Abbildung 4-16: *Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe des Precision Plus Standards*

Nach Durchführung der Gelelektrophorese wurden die Laufstrecken der bekannten Proteine gegen die Logarithmen ihrer Molekulargewichte in einem Diagramm aufgetragen (vgl. Abbildung 4-16). Mit Hilfe einer Regressionsgeraden konnten im Anschluss die Molekulargewichte der unbekannten Proben nach Vermessung ihrer Laufstrecken ermittelt werden (SigmaPlot® Version 10.0).

4.3 CHARAKTERISIERUNG SPEZIFISCHER PROTEINE MITTELS KONTAKTBLOT

4.3.1 EFFEKTIVITÄTSKONTROLLE

Zum Ausschluss störender Proteine im Verdünnungsmedium der Proben wurde separat in jedem Geldurchlauf Probenpuffer als Negativkontrolle aufgetragen. Weder im Gel noch auf den PVDF-Membranen nach erfolgreichem Blotten konnten Proteinbanden identifiziert werden.

Um die Effektivität des durchgeführten Blots beurteilen zu können, konnten zurückgebliebene Proteine im geblotteten Gel direkt im Anschluss mit Hilfe der Silberfärbung dargestellt werden. Dabei zeigten sich auf den Gelen im Anschluss an das Blotten lediglich der farbmarkierte Marker aufgrund seiner hohen Konzentration und teilweise vereinzelte, schwache Proteinbanden. Dies ließ auf einen nahezu vollständigen Übertritt der Proteine auf die Membran schließen. Auch

auf den im Blot-Sandwich hinter der PVDF-Membran liegenden Filterpapierstreifen ließen sich kaum Proteine des vorgefärbten Standards erkennen. Sowohl Dauer als auch Gewicht schienen für den Vorgang des Blottens optimal.

4.3.2 NACHWEIS BIOTINYLIERTER PROTEINE

Zur späteren Identifikation spezifischer Oberflächenmembranproteine der untersuchten karies-relevanten Bakterien wurde das bakterielle Homogenat jeweils vor der Bakterienlyse biotinyliert. Mit Hilfe des Neutravidin-POD-Detektionssystems konnten so nach dem Blotten des zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Gesamtproteins der bakteriellen Homogenate all die Proteine dargestellt werden, die tatsächlich biotinyliert sind und somit ursprünglich von der Oberfläche der Bakterien stammen. Durch die Mitführung eines biotinmarkierten Standards (*biotinylated SDS Molecular Weight Standard*, 6,5-180,0 kDa, Sigma-Aldrich, D-Steinheim) war es möglich, auch die biotinylierten Proteine ihres Molekulargewichts entsprechend darzustellen und zu charakterisieren.

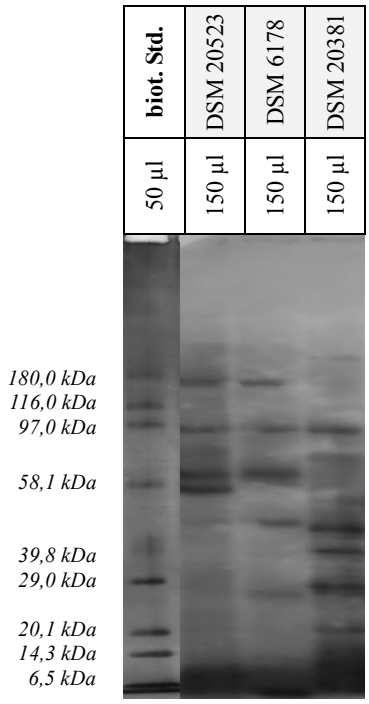


Abbildung 4-17:
Darstellung aller biotinylierten Proteine der bakteriellen Homogenate im Vergleich zu einem biotinylierten Standard (10%iges-SDS-Gel, 5 Sekunden Belichtungszeit nach Blotting)

Für jedes der drei bakteriellen Homogenate ließen sich im Gegensatz zur Darstellung des Gesamtproteins deutlich weniger Proteinbanden identifizieren. Tabelle 4-4 stellt die entsprechenden Molekulargewichte der biotinylierten Proteine (vgl. 4.2.4) denen des Gesamtproteins gegenüber.

DSM 20523		DSM 6178		DSM 20381	
Gemessene Laufstrecke	Ermitteltes Molekular-gewicht	Gemessene Laufstrecke	Ermitteltes Molekular-gewicht	Gemessene Laufstrecke	Ermitteltes Molekular-gewicht
-	-	28 mm	185 kDa	28 mm	185 kDa
-	-	-	-	31 mm	162 kDa
32 mm	**155 kDa**	32 mm	**155 kDa**	-	-
-	-	-	-	40 mm	99 kDa
-	-	-	-	42 mm	94 kDa
43 mm	**90 kDa**	43 mm	**90 kDa**	43 mm	**90 kDa**
47 mm	74 kDa	-	-	-	-
-	-	-	-	49 mm	69 kDa
-	-	50 mm	67 kDa	-	-
				51 mm	66 kDa
53 mm	**60 kDa**	53 mm	**60 kDa**	53 mm	60 kDa
-	-	54 mm	55 kDa	-	-
-	-	-	-	55 mm	53 kDa
56 mm	**52 kDa**	-	-	-	-
-	-	-	-	57 mm	51 kDa
-	-	-	-	58 mm	49 kDa
-	-	61 mm	48 kDa	61 mm	48 kDa
-	-	62 mm	47 kDa	62 mm	47 kDa
-	-	63 mm	**46 kDa**	-	-
-	-	-	-	65 mm	**45 kDa**
-	-	67 mm	38 kDa	-	-
-	-	-	-	69 mm	**35 kDa**
-	-	-	-	71 mm	34 kDa
-	-	-	-	76 mm	**30 kDa**
77 mm	27 kDa	77 mm	**27 kDa**	77 mm	27 kDa
-	-	-	-	78 mm	26 kDa
-	-	-	-	80 mm	24 kDa
-	-	81 mm	23 kDa	-	-
-	-	83 mm	21 kDa	-	-
-	-	85 mm	19 kDa	85 mm	**19 kDa**
88 mm	17 kDa	88 mm	17 kDa	-	-
92 mm	15 kDa	92 mm	15 kDa	92 mm	15 kDa
96 mm	13 kDa	96 mm	13 kDa	96 mm	13 kDa
-	-	-	-	97 mm	12 kDa
99 mm	11 kDa	99 mm	11 kDa	-	-
-	-	100 mm	10,5 kDa	100 mm	10,5 kDa
101 mm	**10 kDa**	101 mm	**10 kDa**	101 mm	**10 kDa**

Tabelle 4-4: *Molekulargewichtsbestimmung unbekannter Proteine der bakteriellen Homogenate (Gesamtprotein), die hervorgehobenen Molekulargewichte entsprechenden biotinylierten Proteinen innerhalb des Gesamtproteins*

4.3.3 NACHWEIS BIOTINYLIERTER PROTEINE MIT ENTSPRECHENDER BINDUNGSSPEZIFITÄT

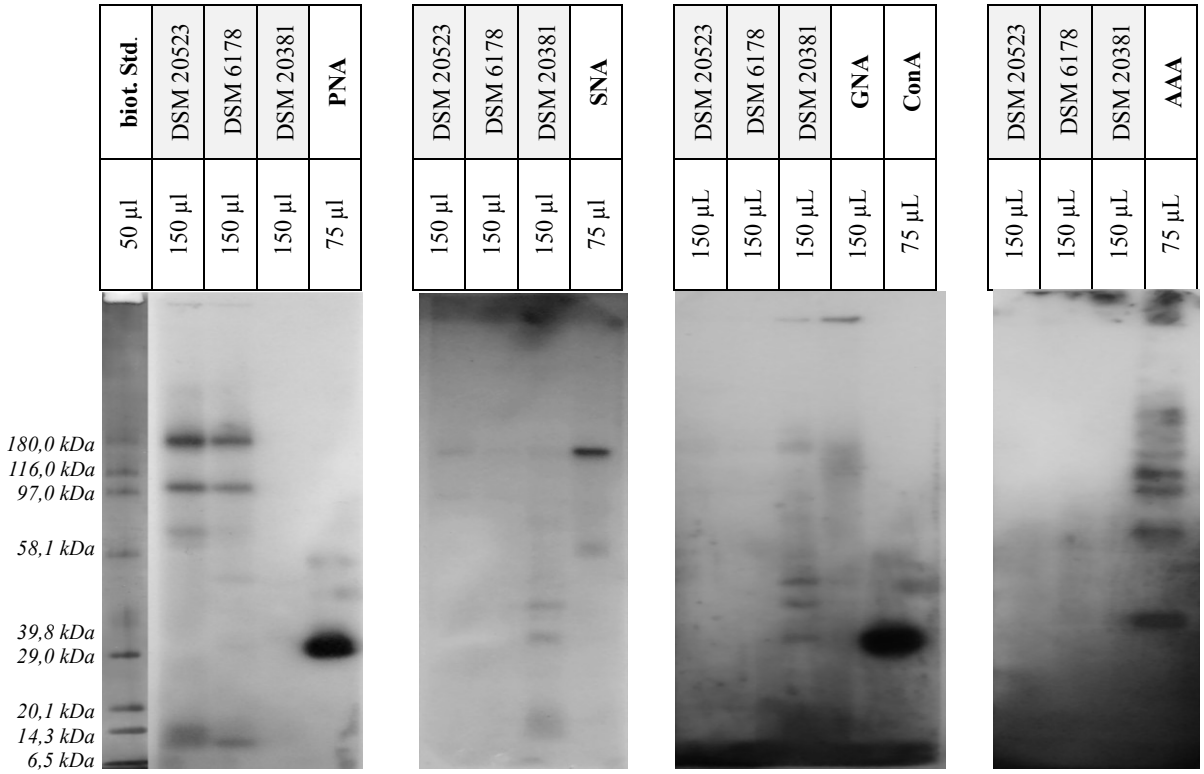


Abbildung 4-18: *Darstellung aller biotinylierten Proteinbanden mit entsprechender Bindungsspezifität*

4.3.3.1 PNA-BINDUNGSSPEZIFITÄT (β-GALAKTOSE-1,3-N-ACETYL-GALAKTOSAMIN)

Die Vorinkubation der PVDF-Membran in PNA-spezifischem Beschichtungs-Glykokonjugat (BSA-Gal-1,3-Gal-NAc) bewirkte eine deutliche Reduktion nachweisbarer Proteinbanden der bakteriellen Homogenate. Während beide *S. mutans*-Stämme (DSM 20523 + DSM 6178) in der Lage waren an BSA-Gal-1,3-Gal-NAc zu adhärieren, zeigte das bakterielle Homogenat von *S. sobrinus* (DSM 20381) keinerlei Bindungsaffinität. *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 wiesen drei deutlich nachweisbare gemeinsame Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 10 kDa, 90 kDa und 155 kDa auf. Des Weiteren konnten bei beiden Keimen weitere, jedoch nur relativ schwach darstellbare Proteinbanden nachgewiesen werden.

Für das pflanzenspezifische Lektin PNA konnten insgesamt drei Proteinbanden nachgewiesen werden, von denen eine besonders stark überlagert erscheint.

4.3.3.2 SNA-BINDUNGSSPEZIFITÄT (α-2,6-GEBUNDENE SIALINSÄURE)

Eine mit Fetuin vorinkubierte PVDF-Membran verhinderte die Adhäsion beider *S. mutans*-Stämme. *S. sobrinus* DSM 20381 war jedoch in der Lage schwach an die Beschichtung zu

adhärieren. Für diesen Keim konnten zwei Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa und 35 kDa mit entsprechender Bindungsspezifität (α-2,6-gebundene Sialinsäure) nachgewiesen werden.

SNA zeigte zwei charakteristische Proteinbanden auf der entsprechenden Beschichtung.

4.3.3.3 GNA-/ConA-Bindungsspezifität (Mannose-Strukturen)

Weder *S. mutans* DSM 20523 noch DSM 6178 wiesen gegenüber BSA-α-Mannopyranosid eine entsprechende Bindungsspezifität auf. Für beide bakteriellen Homogenate waren keine eindeutigen Proteinbanden auf der vorinkubierten Membran nachweisbar. Für *S. sobrinus* ließen sich hingegen mehrere Proteinbanden nachweisen. Im Gegensatz zu der mit Fetuin vorbehandelten Membran erschienen die Proteinbanden hier deutlich intensiver. Die drei stärksten Proteinbanden wiesen ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa, 35 kDa und 45 kDa auf.

GNA band im Vergleich zu den anderen eingesetzten pflanzenspezifischen Lektinen nur sehr schwach an der entsprechenden Beschichtung. Für ConA war ein spezifisches Bindungsverhalten an BSA-α-Mannopyranosid deutlich nachweisbar. Hier dominierte eine stark überladene Proteinbande neben einer etwas schwächeren.

4.3.3.4 AAA-Bindungsspezifität (α-1,6-gebundene Fukose)

An eine mit AAA-spezifischen BSA-Fukosylamid vorinkubierte PVDF-Membran war keines der bakteriellen Homogenate in der Lage signifikant zu adhärieren.

Das pflanzenspezifische Lektin AAA zeigte hingegen eine deutliche Bindungsaffinität. Mehrere Proteinbanden konnten hier nachgewiesen werden.

4.3.4 Vergleich der Proteinbanden auf glykosylierter und deglykosylierter Beschichtung

Analog zu den im kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassay eingesetzten deglykosylierten BSA-Glykokonjugaten zum Ausschluss aller nicht auf glykanspezifischen Bindungsmechanismen beruhenden Bindungen erfolgte auch beim Blotten die Vorinkubation der PVDF-Membranen in den entsprechenden deglykosylierten Beschichtungs-Glykokonjugaten. Durch den Vergleich nachweisbarer Proteinbanden auf glyko- und deglykosylierter Beschichtung konnten abschließend all die biotinylierten Proteine der bakteriellen Homogenate identifiziert werden, deren spezifische Bindungsaffinität auf einer Protein-Kohlenhydrat-Interaktion (Lektinbindung) basiert.

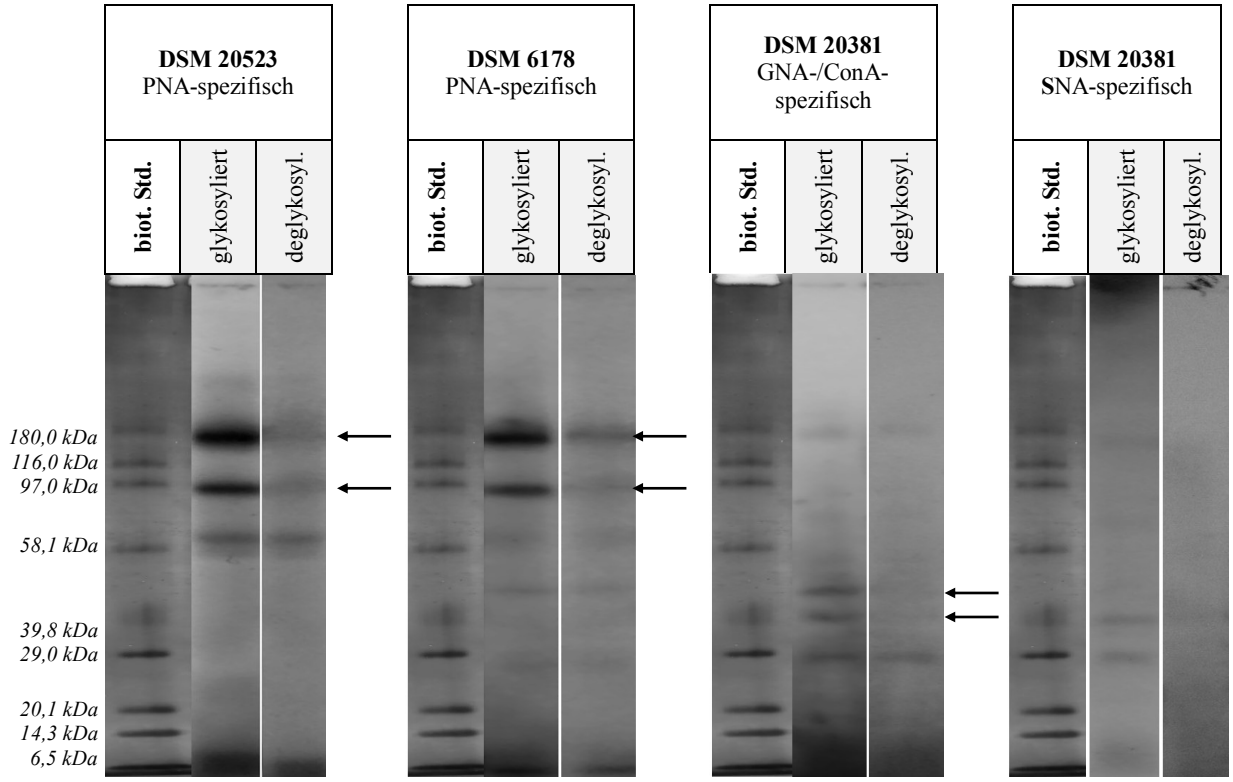


Abbildung 4-19: *Vergleich spezifischer biotinylierter Proteinbanden auf glykosylierter und deglykosylierter Beschichtung*

Vergleicht man die nachweisbaren biotinylierten PNA-spezifischen Proteinbanden des Keims *S. mutans* DSM 20523 auf glykosylierter Beschichtung (BSA-Gal-1,3-Gal-NAc) mit den Proteinbanden auf entsprechendem deglykosylierten BSA-Glykokonjugat, so wird ein eindeutiger Intensitätsverlust zweier Proteinbanden deutlich. Dabei handelt es sich um zwei auf glykosylierter Beschichtung besonders intensiv erscheinenden Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa und 155 kDa. Auch bei *S. mutans* DSM 6178 fielen die beiden auf glykosylierter Beschichtung am stärksten erscheinenden Proteinbanden auf der deglykosylierten Beschichtung deutlich schwächer aus. Es handelt sich ebenfalls um Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa und 155 kDa.

Die spezifischen biotinylierten Proteinbanden des Keims *S. sobrinus* DSM 20381 fielen im Vergleich zu beiden *S. mutans*-Subtypen insgesamt deutlich schwächer aus. Jedoch ist auch hier beim Vergleich der Proteinbanden auf GNA-/ConA-spezifischer glyko- und deglykosylierter Beschichtung ein „Wegfall“ zweier Proteinbanden erkennbar. Die Molekulargewichte dieser beiden Proteinbanden liegen hier bei ca. 35 kDa und 45 kDa.

Für die Proteinbanden auf SNA-spezifischer Beschichtung lässt sich eine Intensitätsreduktion auf deglykosyliertem Beschichtungs-Glykokonjugat aufgrund der initial nur sehr schwachen Darstellung der Proteinbanden nur schwer beurteilen.

4.3.5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die im Blot ermittelten Bindungsspezifitäten kongruieren mit den Ergebnissen aus dem kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassay. *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 zeigten ausschließlich eine PNA-spezifische Bindungsaffinität gegenüber endständigen β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Resten. Für *S. sobrinus* DSM 20381 konnte eine ausgeprägte GNA-/ConA-spezifische und eine sehr schwache SNA-spezifische Bindungsaffinität festgestellt werden. Gegenüber AAA-spezifischem Beschichtungs-Glykokonjugat zeigte keines der drei bakteriellen Homogenate eine nachweisbare Bindungsspezifität.

Nach zusätzlichem Blotten der bakteriellen Homogenate auf die mit deglykosylierten Beschichtungs-Glykokonjugaten vorbehandelten Membranen konnten die spezifischen Proteinbanden soweit reduziert werden, dass letztendlich ausschließlich die auf Protein-Kohlenhydrat-Bindungsmechanismen basierenden Proteinbanden isoliert werden konnten. Diese spezifischen Lektine der drei untersuchten kariesätiologisch bedeutsamen Bakterien sind in der nachfolgenden Tabelle mit ihren Molekulargewichten entsprechend ihrer Bindungsspezifität übersichtlich dargestellt.

	PNA-spez. Bindungs-affinität	**SNA-spez.** Bindungs-affinität	**GNA-/ConA-spez.** Bindungsaffinität	**AAA-spez.** Bindungs-affinität
DSM 20523	**90 kDa** **155 kDa**	-	-	-
DSM 6178	**90 kDa** **155 kDa**	-	-	-
DSM 20381	-	fragwürdig	**35 kDa** **45 kDa**	-

Tabelle 4-5: *Molekulargewichte spezifischer Lektine bakterieller Homogenate*

5 DISKUSSION

Trotz beachtlicher Rückläufe der Kariesprävalenz stellt die Karies weltweit noch immer eine der häufigsten und am weitesten verbreiteten bakterienbedingten Erkrankungen des Menschen dar. Die Entstehung kariöser Läsionen basiert dabei auf einem multifaktoriellen Geschehen, wobei sich das unter physiologischen Bedingungen herrschende Gleichgewicht zwischen Wirt und der oralen apathogenen Standortflora zu einer kariogenen Mikroflora verschiebt. Das feuchte, nährstoff- und nischenreiche orale Milieu bietet den Bakterien einen perfekten Lebensraum. Für eine dauerhafte Adhäsion spielen neben Protein-Protein-Wechselwirkungen vor allem lektinvermittelte Bindungen an Glykane oraler Oberflächen eine entscheidende Rolle [163, 195]. Das Vorhandensein dieser hochspezifischen kohlenhydratbindenden Proteine/Glykoproteine nicht immunologischer Herkunft (Lektine) ermöglicht den Mikroorganismen unter entsprechenden Umständen (Substratzufuhr, mangelnde Mundhygienemaßnahmen etc.) das interbakterielle Zusammenleben auf der Wirtsoberfläche in Form einer strukturierten Plaque.

Körpereigene *host defence*-Faktoren gestatten es dem menschlichen Organismus sich bis zu einem gewissen Grad gegen eindringende oder in erhöhter Menge auftretende Mikroorganismen zu schützen. Die der Protektion und Abwehr dienenden körpereigenen Produkte werden mittels des Sulkusfluids [33] und vor allem des Speichels [232] in die Mundhöhle transportiert. Aufgrund der sehr hohen Antigenlast scheint das humorale Immunsystem über physiologische Mechanismen jedoch nur sehr eingeschränkt reaktiv zu sein [190, 204, 238]. Daher kommt den über die exokrinen Drüsen natürlich in den Speichel sezernierten Glykanstrukturen eine besondere Bedeutung zu. Neben ihrer adhäsionsvermittelnden Funktion sind sie in der Lage, die lektinvermittelte Bindungsfähigkeit pathogener Mikroorganismen an oberflächengebundene Glykokonjugate bzw. interbakterielle Bindungsmechanismen kompetitiv zu inhibieren [66, 117, 161]. Dieses spezifische Oligosaccharid-Lektin-abhängige Abwehrsystem stellt ein frühzeitiges antibakterielles Schutzsystem, im Sinne einer *first line of defence*, dar [87]. Da eine bakterielle Adhäsion den ersten Schritt bei der Besiedlung der Zahnoberfläche darstellt, spielt dieser antiadhäsive Mechanismus auf sämtlichen Mukosaoberflächen des Körpers eine wichtige Abwehrrolle, bevor das systemische Immunsystem in Aktion tritt.

In Speicheluntersuchungen wurde beobachtet, dass die Glykosylierung im Speichel unterschiedlicher Individuen variiert. Die Glykokonjugate differieren in ihren terminalen und inneren Glykanstrukturen, in der Anzahl, der Art und der Reihenfolge der Monosaccharide innerhalb eines Glykans sowie in der Art der Glykan-Aminosäure-Verknüpfung. Die daraus resultierende hohe strukturelle Variabilität unterliegt sowohl genetisch determinierten als auch endogenen und exogenen Einflüssen. Im Speichel von Kindern mit hoher Karies-Aktivität waren im Gegensatz zum Speichel kariesfreier Kinder weniger Lektinrezeptoren spezifisch für das Lektin PNA und

mehr für das Lektin SNA vorhanden [194]. Bei Patienten mit rasch fortschreitender Parodontitis konnte eine Reduktion von terminalen N-Acetyl-Galaktosamin-Strukturen, spezifisch für das Lektin VVA festgestellt werden [87]. Eine weitere Studie konnte eine erhöhte Sekretion lektinspezifischer Speichelkomponenten im Verlauf einer zunehmenden bakteriellen Belastung im Mundraum darstellen [43]. Aufgrund dessen stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen den reduzierten Glykanstrukturen im Speichel und dem vermehrten Auftreten spezifischer pathogener Mikroorganismen im Rahmen eines gewissen Krankheitsbildes gibt.

Um diese Erkenntnisse gezielt im Rahmen der Kariesprophylaxe ausnutzen zu können, bedarf es der genauen Kenntnis der Lektinspezifität kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien. Durch Zufuhr spezifischer Glykanstrukturen im Sinne einer antiadhäsiven Therapie wäre eine gezielte Unterbindung ihrer initialen Adhäsion an orale Oberflächen durch kompetitive Inhibition denkbar, ohne eine gleichzeitige Störung der residenten apathogenen Standortflora [213]. In anderen Bereichen der Medizin konnten entsprechende Strategien bereits erfolgreich umgesetzt werden. So gelang es beispielsweise die Infektion des Urogenitaltrakts mit *Escherichia coli* nach Bestimmung der Adhäsinspezifität des Pathogens [162] durch die Gabe von spezifischem Methyl-α-D-Mannopyranosid zu verhindern [10, 195]. Übertragen auf das orale System ist es durchaus vorstellbar, die lektinvermittelte Adhäsion kariesätiologisch bedeutsamer Mutans-Streptokokken durch die Gabe spezifisch wirksamer Glykanstrukturen zu inhibieren und damit die Entstehung von Karies signifikant zu minimieren. Ein erster Nachweis hierzu wurde in in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen beschrieben [190, 193].

Für einen erfolgversprechenden prophylaktischen Ansatz einer antiadhäsiven Therapie ist die Kenntnis der Spezifität bakterieller Lektine von höchster Bedeutung. Obwohl gewisse Lektinbindungsspezifitäten einiger Plaquebakterien beschrieben wurden [34, 65, 114, 117, 214], ergeben sich für *S. mutans* bislang keine einheitlichen Ergebnisse [52, 65, 115, 118]. Der Galaktose scheint jedoch eine besondere Bedeutung bei der Besiedlung der Zahnoberfläche durch *S. mutans* zuzukommen [65, 114, 151]. In jüngeren Studien gelang es trotz bislang fehlender Charakterisierung der genauen Lektinspezifität kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien einen Konzentrationsabfall bezüglich der initialen bakteriellen Adhäsion mit Hilfe eines aus Preiselbeersaft gewonnenen heterogenen Glykangemischs mit hohem Oligosaccharidanteil (NDM, *high-molecular-weight non-dialysable material*) zu bewirken [210, 229]. Auch *Seemann* et al. konnten in einer künstlichen Mundhöhle mit Hilfe einer experimentellen Glykanlösung einen kariesprotektiven Effekt an natürlichen Zähnen zeigen [193]. Da die Adhäsion und Etablierung pathogener Mikroorganismen auf der Zahnoberfläche den initialen Schritt im Rahmen der Kariesentstehung darstellt, gewinnt die antiadhäsive Therapie durch eine mögliche Verhinderung dessen an besonderer Bedeutung.

Aus diesem Grund bildet die vorliegende Arbeit den Versuch, die adhäsionsvermittelnden bakteriellen Oberflächenmembranproteine (Lektine) der beiden kariesätiologisch bedeutsamsten Bakterienarten *S. mutans* und *S. sobrinus* nach weitestgehender Isolation bezüglich ihrer Glykanbindungsspezifität zu charakterisieren. Dazu wurde ein entsprechender Versuchsablauf auf der Basis standardisierter Routine-Methoden entwickelt, der ansatzweise bereits in früheren Studien in modifizierter Form erfolgreich eingesetzt wurde [43, 194].

5.1 VALIDITÄT DER LABORTECHNISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Um ein hohes Maß an Standardisierung und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden alle Versuche eigenständig (von der gleichen Person) durchgeführt. Somit konnten interindividuelle Diskrepanzen weitestgehend ausgeschlossen werden. Ein Wechsel der für die Versuche notwendigen Geräte wurde ebenfalls vermieden. Alle Geräte wurden regelmäßig entsprechend der Richtlinien und Sicherheitsvorschriften kalibriert bzw. gewartet. Des Weiteren kamen soweit wie möglich standardisierte, kommerzielle Reagenzien zum Einsatz. War der Erwerb solcher Reagenzien nicht gegeben, erfolgte eine eigene Herstellung in ausreichender Menge, um bei allen Versuchen auf dieselbe Charge zurückgreifen zu können. Für die Biotinylierung der bakteriellen Homogenate sowie für die Deglykosylierung eingesetzter Glykokonjugate war dies notwendig.

Der Transport der kultivierten Bakterien sowie die nächtliche Filtration des bakteriellen Homogenats erfolgte stets in einer entsprechenden Kühlbox auf Eis, um einer Zerstörung durch die Aktivität bakterieller Enzyme (Proteasen, Glykohydrolasen) vorzubeugen. Es wurde auf eine konstante Lagerung der Biomaterialien bei mindestens -30 °C im Tiefkühlschrank (bis jeweils kurz vor Untersuchungsbeginn) geachtet. Die eingesetzten Beschichtungs- bzw. Verdrängungs-Glykokonjugate wurden selbstständig hergestellt. Dabei wurde auf eine konsequente hygienische Arbeitsweise geachtet, da eine bakterielle Kontamination durch freigesetzte Glykosidasen zur Spaltung endständiger Kohlenhydratreste und damit zum Verlust der Glykanfunktion führen würde. Sämtliche Pufferlösungen wurden stets unmittelbar vor dem Gebrauch frisch angesetzt, um jeglichen Verunreinigungen vorzubeugen. Verdünnungen fanden ausschließlich mit gereinigtem Wasser aus der Reinstwasseranlage bzw. mit kommerziell erworbenem aqua ad iniectabilia statt.

Zur Kontrolle der Pipettierqualität sowie zur Fehlerminimierung beim Erstellen von Verdünnungsreihen wurden für alle Messwerte mindestens Doppelmessungen vorgenommen. Ab einer Abweichung der Vergleichswerte um mehr als 25 % wurde dies als sogenannter Ausreißerwert gedeutet und als *missing value* in die Auswertung einbezogen.

Zum Ausschluss eventuell auftretender Falsch-Positiver-Messungen wurde stets ein Leerwert mitgeführt. So wurde beim Lektinbindungs-Inhibitionsassay anstelle des jeweiligen Lektins und Verdrängungs-Glykokonjugats lediglich Verdünnungspuffer auf das entsprechende Beschichtungs-Glykokonjugat gegeben. Somit fand eine Berücksichtigung einer möglichen Eigenperoxidaseaktivität der Beschichtung oder das Auftreten unspezifischer Bindungen zwischen der Nachweisreagenz Neutravidin-POD und der fest gebundenen Phase statt. Auch eine mögliche Eigenfärbung des Tetramethylbenzidins bei entsprechend langer Inkubation, auch ohne das Vorhandensein eines Katalysators (Peroxidase), konnte so bei der Auswertung berücksichtigt werden. Insgesamt musste den Leerwert-Messungen keine besondere Bedeutung zugesprochen werden, dennoch wurden die verschwindend geringen Werte jeweils von den entsprechenden Messungen abgezogen. Um bei der Gelelektrophorese eine Interaktion des Probenpuffers auf den Lauf der in den Proben enthaltenen Proteine ausschließen zu können, wurde bei jedem Durchgang reiner Probenpuffer als Leerwert separat aufgetragen. Auch hier konnte keine signifikante, störende Beeinflussung der Pufferlösung festgestellt werden. Da aufgrund des begrenzten Mikrotiterplattenformats nicht immer alle Proben Platz auf der gleichen Mikrotiterplatte fanden, wurde stets auf Zusammengehörigkeit der Proben geachtet, um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu erzielen. Durch den konsequenten Einsatz standardisierter Proben konnte der Versuchserfolg dokumentiert werden. Bei der Gelelektrophorese kamen standardisierte Protein-Marker mit unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen zum Einsatz, um so ein möglichst breites Proteingrößen-Spektrum zu erfassen.

5.2 METHODIK DER LABORTECHNISCHEN UNTERSUCHUNGEN

5.2.1 AUSWAHL DER ZU UNTERSUCHENDEN BAKTERIENSPEZIES

Zur Untersuchung der Bindungsspezifität spezifischer bakterieller Oberflächenmembranproteine (Lektine) mit dem Ziel einer möglichen Kariesreduktion im Sinne einer antiadhäsiven Therapie wurden drei Subtypen der kariesätiologisch bedeutsamsten humanpathogenen Arten aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) ausgewählt. *S. mutans* ist dabei zu 70-100 %, *S. sobrinus* zu < 30 % in der kariogenen Plaque vertreten [124]. Sowohl *S. mutans* als auch *S. sobrinus* gehören zusammen mit *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. ferus*, *S. macacae* und *S. downei* zu den sogenannten Mutans-Streptokokken [40]. Um eventuelle Unterschiede innerhalb einer Bakterienspezies einerseits als auch zwischen zwei Bakterienspezies der Mutans-Streptokokken andererseits zu evaluieren, wurden gezielt zwei Subtypen der Bakterienspezies *S. mutans* (DSM 20523 und DSM 6178) und eine der Spezies *S. sobrinus* (DSM 20381) ausgewählt.

5.2.2 BAKTERIELLE KULTIVIERUNG & ISOLATION DER SPEZIFISCHEN OBERFLÄCHENMEMBRANPROTEINE

Keimnachweis und Reinheitskontrolle der kultivierten Bakterien erfolgten zum einen visuell mit Hilfe des fraktionierten Ausstrichs, zum anderen durch die Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop bei 600-facher Vergrößerung (vgl. 3.1.1.1). Sowohl mit Hilfe der Blutagarplatte (siehe Abbildung 4-1) als auch durch das Bild im Phasenkontrastmikroskop (siehe Abbildung 4-2) konnte der Verdacht auf eine mögliche Verunreinigung durch α-hämolysierende Streptokokken bzw. das Vorliegen einer Mischkultur ausgeschlossen werden. Durch regelmäßige Messungen der optischen Dichte während der Kultivierung gelang es, das bakterielle Wachstum im späten Stadium der exponentiellen Phase zu stoppen, um einer möglichen Destruktion der bakteriellen Oberflächenmembranproteine vorzubeugen. Es kam deutlich zu einer Annäherung an eine bestimmte optische Dichte innerhalb eines festgelegten zeitlichen Intervalls (Übergang der exponentiellen in die stationäre Phase).

Zur späteren Charakterisierung der spezifischen bakteriellen Lektine wurde ein geeignetes Konzept entwickelt, um diese zunächst zu markieren und in ausreichendem Maße aus der Menge kultivierter Bakterien zu isolieren. Die bakteriellen Oberflächenmembranproteine wurden zur späteren Identifikation biotinyliert und nach bakterieller Lyse unter Eliminierung der partikulären Bestandteile und niedermolekularen Moleküle durch den Einsatz entsprechender Filter homogenisiert. Der Vergleich des biotinylierten bakteriellen Homogenats mit nicht biotinylierter Probe im Gel ergab keinen Unterschied im Bandenmuster (Ergebnisse nicht dargestellt). Somit kann eine Veränderung der Proteine durch die Biotinylierung ausgeschlossen werden. Abbildung 3-2 stellt den Ablauf zur Gewinnung biotinmarkierter bakterieller Lektine in Form eines bakteriellen Homogenats > 10 kDa, < 0,2 µm schematisch dar. Ziel war die Etablierung eines begrenzt aufwendigen Verfahrens, das in einem limitierten Zeitrahmen bei möglichst maximaler Ausbeute umgesetzt werden kann. Aus diesem Grund wurde auf eine weitere Aufreinigung der bakteriellen Homogenate durch weiterführende, umfangreiche Isolationsmaßnahmen zur Gewinnung der spezifischen Lektine (z. B. durch den Einsatz entsprechender Muzinsäulen) verzichtet. Stattdessen wurden die im Anschluss stattfindenden Versuche zur Charakterisierung dahingehend modifiziert, dass eine Aussage allein über die spezifischen Oberflächenmembranproteine ermöglicht wird. Alle weiteren Versuche zur Charakterisierung der Bindungsspezifität der bakteriellen Lektine erfolgten durch den Einsatz der entsprechenden bakteriellen Homogenate.

Die Qualität bzw. Effektivität der durchgeführten Filtration lässt sich mit Hilfe der Flussratenbestimmung dokumentieren. Die Flussraten vor und nach vollendeter Filtration wiesen bei konstanter Pumpgeschwindigkeit pro Zeiteinheit keine signifikant voneinander abweichenden Werte auf. Das Auftreten verstopfter bzw. geplatzter Filterporen konnte so ausgeschlossen

werden. Der geringfügige Anstieg der Flussrate nach erstmaliger Benutzung der Filter lässt sich durch die initiale Poren-Quellung der trocken gelieferten Filter erklären. Eine maximale Ausbeute wurde durch das jeweils abschließende Waschen am Ende einer Filtration ermöglicht. Dadurch konnte eine nahezu vollständige Rückgewinnung des eingesetzten Volumens erzielt werden (das nicht rückgewinnbare Totraumvolumen liegt laut Herstellerangaben unter 500 µl).

5.2.3 VORVERSUCHE ZUR BESTIMMUNG OPTIMALER KONZENTRATIONEN

Die Auswahl geeigneter pflanzenspezifischer Lektine und entsprechender Verdrängungs- bzw. Beschichtungs-Glykokonjugate sowie die Festlegung ihrer optimalen Konzentrationen wurde bereits im Rahmen früherer Studien [190] empirisch ermittelt und als Grundlage für diese Arbeit übernommen. Um eine ausreichende Vergleichbarkeit zwischen den bakteriellen Homogenaten der unterschiedlichen Mutans-Streptokokken gewährleisten zu können, wurden diese zunächst nach entsprechender Proteinkonzentrationsbestimmung mittels des BCA-Tests auf eine einheitliche Proteinkonzentration vorverdünnt.

Weitere Vorversuche galten der Ermittlung der optimalen Verdünnung der bakteriellen Homogenate beim Einsatz im kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassay. Während eine 1:1000-Verdünnung bei relativ hohem Materialverlust eine nur unzureichende Verdrängung ermöglichte, konnte bei einer 1:2000-Verdünnung keine adäquate Lektinbindung mehr gewährleistet werden. Bei einer Verdünnung von 1:1500 war es jedoch möglich eine maximale Lektinbindung an die feste Phase zu erzielen. Gleichzeitig war das Verdrängungs-Glykokonjugat bei entsprechender Spezifität in der Lage, eine nahezu vollständige Bindungsinhibition der bakteriellen Lektine an die feste Phase zu bewirken.

In einem weiteren Vorversuch wurde für jedes bakterielle Homogenat eine geeignete Proteinkonzentration ermittelt, die eine optimale Darstellung der Proteine im Gel und im Blot ermöglichte (Darstellung kräftiger Banden ohne Überlagerung oder anderer Störeffekte). Die zu untersuchenden bakteriellen Homogenate wurden so vorverdünnt, dass beide *S. mutans*-Proben 300 µg und *S. sobrinus* 200 µg Protein pro ml Lösung in der Verdünnung enthielten.

5.2.4 CHARAKTERISIERUNG DER GLYKANBINDUNGSSPEZIFITÄT BAKTERIELLER LEKTINE

Die Charakterisierung bzw. Analysierung von Glykanstrukturen kann prinzipiell unter der Betrachtung physiko-chemischer oder funktioneller Aspekte erfolgen.

Die physiko-chemische Analytik bietet die Möglichkeit einer sehr detaillierten Strukturanalyse ab einer bestimmten Menge des zu identifizierenden Glykans mit Hilfe der hochauflösenden NMR- (*nuclear magnetic resonance*) Spektroskopie [45, 148] und der MALDI-TOF- (*matrix*

assisted laser desorption ionisation – time of flight) Massenspektroskopie [140, 184] bzw. einer Kombination verschiedener Verfahren, wie z. B. der enzymatischen Degradation. Dabei werden die zu untersuchenden Oligosaccharide aufgetrennt und chemisch bzw. enzymatisch modifiziert. Nachteilig stellt sich jedoch die im Labor sehr aufwendige Separation und Isolation der Glykane von den Glykokonjugaten dar. Bisher sind auch nicht alle Glykane aus heterogenen Proben bestimmbar. Direkte Aussagen über ihre Funktion, die Syntheseprozesse sowie ihr Bindungsverhalten sind ebenfalls nicht ableitbar.

Mit Hilfe der funktionellen Strukturanalytik können hingegen sowohl die Biosynthese als auch der Metabolismus von Glykanstrukturen nachvollzogen werden. Jedoch ist der Einsatz Radioisotop-markierter Substituenten in vivo aufgrund der hohen Radioaktivitätsdosen und des raschen biologischen Metabolismus nicht geeignet [67]. Eine der ältesten Methoden zur funktionellen Strukturaufklärung von Glykanstrukturen ist die Hämagglutination bzw. deren Hemmung durch bestimmte Oligosaccharide. Dabei wird die, durch Bindung von di- oder oligovalenten Lektinkomplexen an komplementäre Oberflächenglykane von Erythrozyten bedingte Erythrozytenaggregation durch die Zugabe von Oligosacchariden verhindert. Auf dem gleichen Prinzip basiert die inter- bzw. intrabakterielle Koaggregation bei der Etablierung eines bakteriellen Biofilms [101].

Durch den Einsatz von Oligosacchariden bekannter Struktur kann bei erfolgreicher Inhibition eines bestimmten Lektinkomplexes eine Aussage über dessen funktionelle Struktur getroffen werden. Resultierend aus den Vorzügen der funktionellen Analytik in Bezug auf die explorative Untersuchung von Oligosaccharid-Lektin-Wechselwirkungen gegenüber der physiko-chemischen Analytik kam es in der vorliegenden Arbeit zunächst zum Einsatz eines kompetitiven ELISAs mit analogem Verlauf zur inhibitorischen Hämagglutination. Dieser von *Kage* et. al 1989 eingeführte Lektinbindungs-Inhibitionsassays [88] simuliert in stark vereinfachter Form eine mögliche Inhibition der lektinvermittelten Adhäsion kariesrelevanter Mikroorganismen an Glykanstrukturen oraler Oberflächen. In früheren Studien wurde der kompetitive Lektinbindungs-Inhibitionsassay in modifizierter Form bereits erfolgreich eingesetzt [43, 194]. Eine detaillierte Beschreibung des Testprinzips sowie der experimentelle Ablauf ist in den Kapiteln 3.4.1 und 3.4.2 dargestellt.

Durch die Verwendung verschiedener Glykokonjugate mit bekannter Bindungsspezifität ist es möglich, über das Ausmaß einer möglichen Bindungshemmung im Vergleich zu einem Standard bekannter Struktur, auf die Bindungsspezifität der bakteriellen Lektine innerhalb eines bakteriellen Homogenats zu schließen. Mit Hilfe der Biotinylierung der zu charakterisierenden Lektine, analog dem Prinzip markierter Antikörper in einem ELISA, gelingt die Quantifizierung mit Hilfe des Neutravidin-Peroxidase-Systems durch Katalysation einer enzymatischen Farbreaktion.

Diese Möglichkeit der Quantifizierung stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen funktionellen Tests wie der Hämagglutination oder der Bakterien-Koaggregation dar, da u. a. auch monovalente Lektine bezüglich der Spezifität untersucht werden können. Des Weiteren konnten durch den Einsatz des Neutravidin-POD-Detektionssystems unspezifische Bindungen weitestgehend minimiert werden. Neutravidin stellt ein modifiziertes Avidin-Derivat dar, bei dem aufgrund seiner Deglykosylierung eine Reduktion aller nicht auf dem biotinspezifischen Bindungsmechanismus basierenden Bindungen erfolgt.

Der Lektinbindungs-Inhibitionsassay erwies sich bei der Analyse der Bindungsspezifizierung zwischen Lektinen und Glykanen in charakterisierender und quantitativer Hinsicht als äußerst effektiv und gewährt mit einer hohen Sensitivität einen Konzentrationsnachweis bis in den Mikrogramm-Bereich. Jedoch kann allein mit Hilfe dieses Tests noch keine Aussage über den Zusammenhang zwischen der spezifischen Lektinbindungsspezifität und den dafür verantwortlichen Lektinen innerhalb des bakteriellen Homogenats getroffen werden.

Zur zusätzlichen qualitativen Charakterisierung der bakteriellen Lektine kam aus diesem Grund außerdem eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Blotting auf zuvor spezifisch vorbehandelten Membranen zum Einsatz. Nähere Einzelheiten hierzu sind in den Kapiteln 3.5 und 3.6 beschrieben. Somit gelang neben der Identifizierung der Bindungsspezifitäten der bakteriellen Homogenate der Keime *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 sowie *S. sobrinus* DSM 20381 zusätzlich die (annähernde) Bestimmung des Molekulargewichts der dafür verantwortlichen spezifischen bakteriellen Lektine.

Es gilt jedoch zu beachten, dass die Beweglichkeit der Proteine im Polyacrylamidgel nicht ausschließlich von ihrem Molekulargewicht abhängt, sondern zu einem gewissen Anteil auch von der jeweiligen Form der denaturierten Eiweiße. So wandern globuläre Proteine im Gel wesentlich schneller als vollständig entfaltete, lange Proteinfäden. Außerdem verändern bestimmte, natürlich vorkommende Modifizierungen der Proteine, wie z. B. Glykosylierungen, deren Wanderungstendenz im elektrischen Feld. Aufgrund dessen kann eine SDS-Gelelektrophorese trotz Denaturierung und weitestgehender Linearisierung der Proteine nur zur Abschätzung des Molekulargewichts unbekannter Proteine dienen.

5.2.5 AUSWIRKUNG UNTERSCHIEDLICHER GELKONZENTRATIONEN

In Abhängigkeit von den aufzutrennenden Proteinen kommen Gele mit unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration (unterschiedlicher Porengröße) zum Einsatz. Aufgrund der zunächst unbekannten Proteingröße der zu charakterisierenden spezifischen bakteriellen Oberflächenmembranproteine (Lektine) wurden in Vorversuchen verschiedene Polyacrylamidgele eingesetzt. Der Vergleich zeigt deutlich, dass eine hohe Schärfe in der Darstellung aller

Proteine der bakteriellen Homogenate am besten in einem 10%igen Acrylamidgel ermöglicht wird. Abbildung 5-1 stellt die Proteinbanden aus einem 7,5%igen und einem 10%igen Gel vergleichend gegenüber.

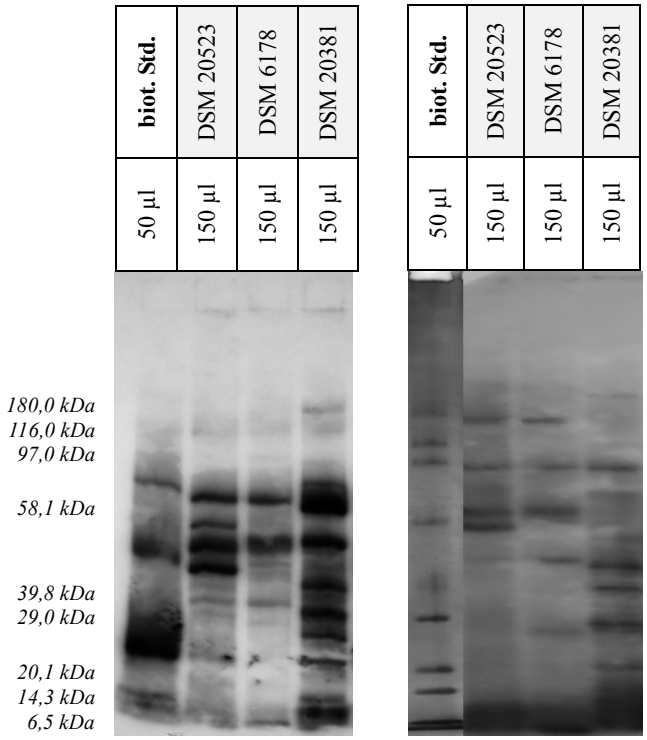


Abbildung 5-1:
Darstellung aller biotinylierten Proteine der bakteriellen Homogenate auf einem 7,5%igen Gel (links) im Vergleich zu einem 10%igen Gel (rechts) - jeweils 5 Sekunden Belichtungszeit nach Blotting

5.3 ERGEBNISSE DER LABORTECHNISCHEN UNTERSUCHUNGEN

5.3.1 BEDEUTUNG DER DEGLYKOSYLIERUNG

Ziel der vorliegenden Studie war es, durch die Untersuchung der Adhäsion und einer eventuell möglichen Verdrängung der bakteriellen Homogenate Rückschlüsse über deren Lektinspezifität zu erlangen. Bei der Bindung zwischen Bestandteilen des bakteriellen Homogenats und spezifischem Glykokonjugat kann davon ausgegangen werden, dass diese nicht ausschließlich über Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen vermittelt werden. Um diese Bindungen unabhängig von den lektinspezifischen Bindungen zu erfassen, wurde die Adhäsion der bakteriellen Homogenate an deglykosylierte Proteine untersucht. Durch die oxidative Spaltung der terminalen Glykanstrukturen im Rahmen der Deglykosylierung wurden die Glykane von den Glykoproteinen entfernt oder auf einen rudimentären Rumpf zurückgeführt. Damit verloren die behandelten Glykokonjugate ihre lektinspezifische Bindung.

Der gelelektrophoretische Vergleich der unvorbehandelten Beschichtungs-Glykokonjugate mit der entsprechenden deglykosylierten Form zeigt für drei der vier eingesetzten Beschichtungs-

Glykokonjugate keine Veränderung im Protein-Bandenmuster (vgl. Abbildung 4-8). Die Periodat-Behandlung stellt somit eine gezielte und zugleich schonende Auftrennung der Bindung zwischen Protein und endständigem Kohlenhydratrest ohne eine strukturelle Veränderung des Proteins dar. Fetuin zeigt nach erfolgter Deglykosylierung als einziges Glykokonjugat ein verändertes Bandenmuster durch den Verlust einer Proteinbande (ca. 320 kDa). Dabei kann eine stattgefundene Konformationsänderung des Proteins die Ursache des veränderten Laufmusters darstellen.

Die Veränderung ihrer funktionellen Eigenschaften (durch den Verlust der glykanspezifischen Bindungsspezifität) konnte für alle eingesetzten Beschichtungs-Glykokonjugate im Lektinbindungs-Inhibitionsassay bestätigt werden. Nach dem ersten Deglykosylierungs-Durchgang konnte durch eine bis dahin nur unvollständige Deglykosylierung der Beschichtungs-Glykokonjugate sowohl eine relativ hohe Bindungsfähigkeit als auch eine Verdrängung spezifisch gebundener Proben nachgewiesen werden. Durch die dreimalige Deglykosylierung war es jedoch möglich, die Bindung über glykanspezifische Strukturen weitestgehend zu eliminieren. Während zwischen erster und zweiter Deglykosylierung eine eindeutige Reduktion des Bindungsvermögens deutlich wurde, konnte nach dreifacher Periodat-Behandlung kaum noch ein signifikanter Unterschied der Bindung in Gegenwart und Abwesenheit eines spezifischen Glykans festgestellt werden. Die zu Beginn mögliche Verdrängung konnte nach dreimaliger Deglykosylierung auch mit maximaler Konzentration des Verdrängungs-Glykokonjugats nicht mehr nachgewiesen werden.

Der Erfolg der durchgeführten Deglykosylierung lässt sich weiterhin am Bindungsverhalten der bakteriellen Homogenate an festphasenadsorbierten Neoglykoproteinen bei entsprechend fehlender Bindungsspezifität darstellen. Bei fehlender Spezifität der Oberflächenmembranproteine eines bakteriellen Homogenats für ein spezielles Beschichtungs-Glykokonjugat entspricht das Ausmaß des Bindungsvermögens auf unvorbehandelter Beschichtung dem auf deglykosylierter Beschichtung, unabhängig vom Deglykosylierungsgrad. Die Bindung beruht demnach ausschließlich auf nicht glykanspezifischen Bindungsmechanismen.

Der Lektinbindungs-Inhibitionsassay zeigte beim Einsatz pflanzenspezifischer Lektine auf dreifach deglykosyliertem Beschichtungs-Glykokonjugat kaum eine nachweisbare Bindung (Bindung auf Leerwert-Niveau). Die Bindung zwischen Lektin und festphasenadsorbiertem Neoglykoprotein basiert demnach nahezu ausschließlich auf einer Protein-Kohlenhydrat-Interaktion. Bei den pflanzenspezifischen Lektinen handelt es sich um gereinigte, standardisierte, kommerziell erhältliche Lektine. Die dennoch vergleichsweise etwas stärkere Bindung von ConA und AAA (vgl. Abbildung 4-6) im Gegensatz zu den restlichen Pflanzenlektinen (PNA, SNA und GNA) ist möglicherweise auf strukturelle Unterschiede der eingesetzten Glyko-

konjugate zurückzuführen. So liegt für ConA die Vermutung nahe, dass die für die spezifische Lektinbindung verantwortlichen zentral gelegenen Trimannosyl-Strukturen des Beschichtungs-Glykokonjugats BSA-α-Mannopyranosid weniger effektiv durch die Deglykosylierung beeinflusst werden als beispielsweise die für das Pflanzenlektin GNA spezifischen terminalen Mannosereste.

Die insgesamt stärker ausgeprägte Bindung für alle eingesetzten bakteriellen Homogenate an die dreifach deglykosylierten Beschichtungs-Glykokonjugate lässt sich durch das Vorliegen eines Homogenats begründen. Das bakterielle Homogenat stellt dabei stets ein Proteingemisch von in Lösung gebrachten Bestandteilen dar, einem Gemisch von Molekülen lysierter und anschließend filtrierter Bakterien. Da die zu untersuchenden bakteriellen Lektine nur Teil der eingesetzten bakteriellen Homogenate sind, kommen bei der Bindung zwischen bakteriellem Homogenat und festphasenadsorbierten Neoglykoproteinen neben der glykanspezifischen Adhäsion weitere Bindungsmechanismen (wie z. B. Protein-Protein-Wechselwirkungen) zum Tragen. Auch hier spielen strukturelle Unterschiede eine entscheidende Rolle. Die Bindung fiel dabei am stärksten an BSA-α-Mannopyranosid und BSA-Fukosylamid aus.

Weiterhin lässt sich eine deutlich stärker ausgeprägte Inhibition der Pflanzenlektine durch den Einsatz entsprechender gelöster Glykokonjugate darstellen. Auch hier wäre das Vorhandensein weiterer Bindungsmechanismen durch die Vielzahl der Moleküle innerhalb des bakteriellen Homogenats eine mögliche Erklärung. Jedoch könnte die vergleichsweise geringere Lektininhibition der bakteriellen Homogenate auch auf eine unzureichende Spezifität der terminalen Glykanstrukturen eingesetzter Glykokonjugate in Bezug auf die Lektinbindungsspezifität zurückzuführen sein.

Durch den abschließenden Vergleich der Proteinbanden auf glykosylierten und dreifach deglykosylierten Membranen konnten all die biotinylierten Proteine der bakteriellen Homogenate identifiziert werden, deren spezifische Bindungsaffinität auf einer Protein-Kohlenhydrat-Interaktion (Lektinbindung) basiert. Andere Bindungsmechanismen waren für diese Studie nicht relevant und werden von der weiteren Betrachtung ausgeschlossen.

5.3.2 BEDEUTUNG DER BINDUNGSSPEZIFITÄT

Mit Hilfe des kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassays kam eine höchst empfindliche Methode zum Nachweis glykanvermittelter Bindungsmechanismen zum Einsatz. Anhand verschiedener Versuchsaufbauten konnte die hohe Spezifität der Lektin-Kohlenhydrat-Bindung demonstriert werden.

Allein der Einsatz einer α-D-(+)-Fukose anstatt einer α-L-(-)-Fukose resultierte in einem völligen Bindungsverlust zwischen dem pflanzenspezifischen Lektin AAA und dem immobilisierten

BSA-Fukosylamid. Beide Glykokonjugate sind Stereoisomere ein und derselben chemischen Verbindung mit gleicher Verknüpfung der Atome, jedoch in jeweils entgegengesetzter Konfiguration (sogenannte Spiegelbildisomere).

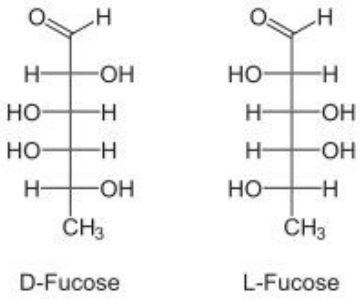


Abbildung 5-2:
Spiegelbildisomere der Fukose

Die Bindung zwischen bakteriellem Lektin und endständigem Kohlenhydrat-Rest basiert auf Grundlage der sogenannten *Induced-Fit*-Theorie. Je spezifischer die terminale Kohlenhydratstruktur des eingesetzten Glykokonjugats für das entsprechende bakterielle Lektin ist, desto deutlicher fällt der Bindungsnachweis zwischen den beiden Bindungspartnern aus. Die Inhibition hängt dabei entscheidend von der Konzentration des Bindungspartners ab. Eine hohe Konzentration von weniger spezifischem Glykokonjugat führt zur gleichen Verdrängung wie eine geringere Konzentration von hochspezifischem Glykokonjugat, jedoch mit unterschiedlichen Konzentrations-Inhibitionskurven.

So lässt sich nach mehrfachem Nachweis der ausgeprägten β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Spezifität beispielsweise die deutlich höhere Bindungshemmung von *S. mutans* durch Glykokonjugate mit endständigen D-Galaktosyl-Resten anstatt reiner Galaktose erklären. Die insgesamt nur schwach nachweisbare Sialyl-Spezifität von *S. sobrinus* DSM 20381 könnte ebenfalls auf einer nur unzureichenden Spezifität dieser terminalen Glykanstrukturen basieren (vgl. Kapitel 5.3.5).

5.3.3 DARSTELLUNG DES GESAMTPROTEINS DER BAKTERIELLEN HOMOGENATE GEGENÜBER DEN GLYKANSPEZIFISCHEN, BIOTINYLIERTEN OBERFLÄCHENMEMBRANPROTEINEN

Die Charakterisierung und Identifizierung der spezifischen Oberflächenmembranproteine (Lektine) aus den jeweiligen bakteriellen Homogenaten der Keime *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 sowie von *S. sobrinus* DSM 20381 bezüglich ihrer Bindungsspezifität wurde durch die Kombination verschiedener Versuchsmethoden erreicht. Während mit Hilfe des kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassays das jeweilige Bindungsverhalten der bakteriellen Homogenate sowie eine mögliche Verdrängung durch entsprechende Glykokonjugate aufgezeigt werden konnte, ermöglichte erst das Blotten der zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine der

bakteriellen Homogenate auf glykanspezifisch vorbehandelten PVDF-Membranen die qualitative Proteinanalyse all der für die spezifische Glykanbindung tatsächlich verantwortlichen Proteine. Die ermittelten Bindungsspezifitäten konnten dabei in unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen wiederholt bestätigt werden.

In der nachfolgenden Abbildung sind all die identifizierten glykanspezifischen, biotinylierten Oberflächenmembranproteine (Lektine) der eingesetzten bakteriellen Homogenate im Vergleich zum Gesamtprotein übersichtlich dargestellt.

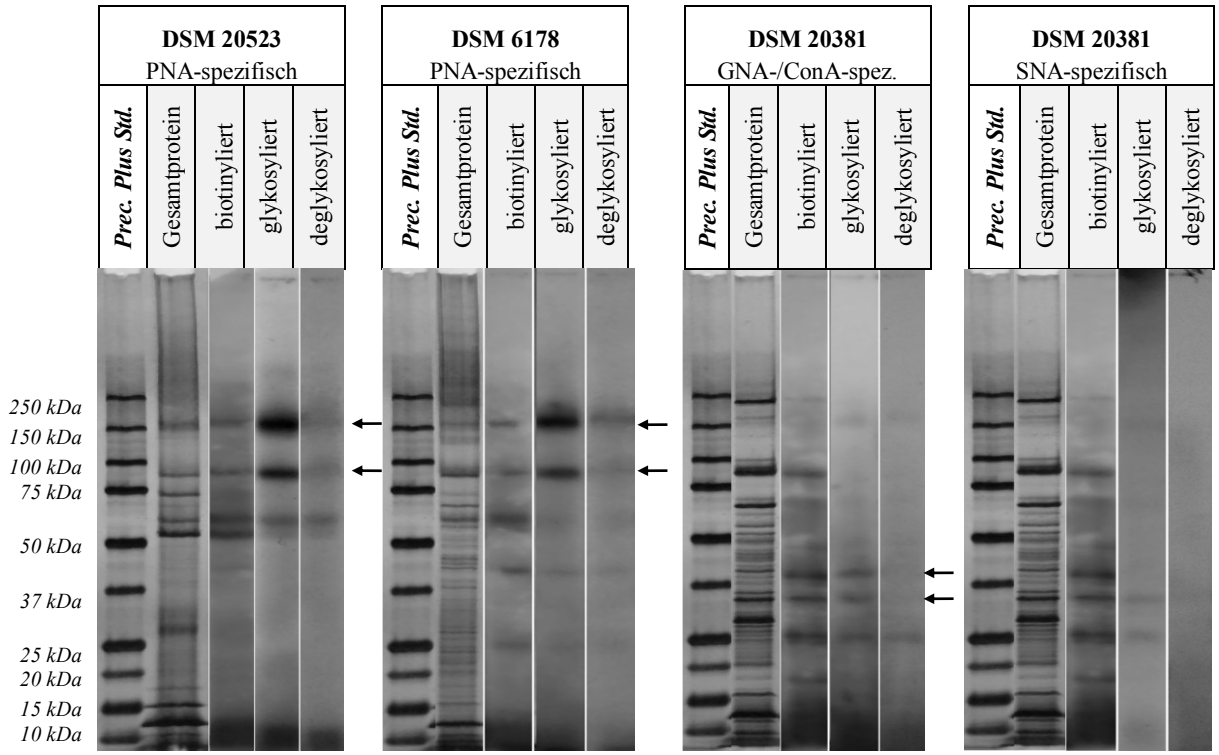


Abbildung 5-3: *Darstellung des Gesamtproteins der bakteriellen Homogenate gegenüber den biotinylierten sowie den glykanspezifischen, biotinylierten Oberflächenmembranproteinen (Lektinen) im Vergleich zum Precision Plus Standard*

Die Bande des Gesamtproteins stellt jeweils alle nachweisbaren Proteine innerhalb des jeweiligen bakteriellen Homogenats (sowohl von der Membranoberfläche als auch aus dem Bakterieninneren) dar. Durch den Biotinnachweis werden nur die Proteine von der Bakterienoberfläche, die vor der bakteriellen Lyse biotinyliert wurden, dargestellt. Auf der bakteriellen Oberflächenmembran befindet sich jedoch eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine mit verschiedenen Funktionen, die nicht alle allein der bakteriellen Adhäsion dienen. Durch den Einsatz glykanspezifisch vorbehandelter Membranen gelang es, all die biotinylierten Proteine darzustellen, die tatsächlich in der Lage sind, an die jeweilige spezifische Beschichtung zu adhärieren. Zum Ausschluss aller

Proteine, die nicht über glykanvermittelte Bindungsmechanismen an der spezifischen Beschichtung adhärieren können, erfolgte der Biotinnachweis auf deglykosylierten Membranen. Bei all den dargestellten Proteinbanden, die zwar auf den glykosylierten, nicht aber auf den deglykosylierten Membranen erscheinen, handelt es sich um biotinylierte Oberflächenmembranproteine (Lektine), die über eine spezifische Protein-Kohlenhydrat-Bindung (Lektinbindung) in der Lage sind an der Beschichtung zu adhärieren.

Abbildung 5-3 zeigt eine deutliche Abnahme der Proteinbanden, ausgehend vom Gesamtprotein bis hin zum Nachweis der glykanspezifischen, biotinylierten Proteine für alle dargestellten bakteriellen Homogenate. Im Nachfolgenden werden die eingesetzten kariesrelevanten Bakterien hinsichtlich ihrer Bindungsspezifität und der Charakterisierung der dafür verantwortlichen bakteriellen Lektine vergleichend zu den Beobachtungen aus bisherigen Studien gegenübergestellt.

5.3.4 VERGLEICH DER BINDUNGSSPEZIFITÄT - *S. MUTANS* DSM 20523 VS. DSM 6178

Der Vergleich der beiden *S. mutans*-Subtypen DSM 20523 und DSM 6178 zeigt deutliche Gemeinsamkeiten in Bezug auf ihre Lektinspezifität. Für beide bakteriellen Homogenate konnte eine besonders ausgeprägte β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Spezifität nachgewiesen werden. Eine signifikante Verdrängung beider bakterieller Homogenate war nur durch den Einsatz von Methyl-D-Galaktopyranosid möglich. Dabei reicht bei beiden bakteriellen Homogenaten bereits der Einsatz minimaler Konzentrationen des Verdrängungs-Glykokonjugats aus, um eine deutliche Reduktion der maximalen Bindungsfähigkeit an das entsprechende Beschichtungs-Glykokonjugat hervorzurufen (vgl. Abbildung 4-10).

Geringfügige Unterschiede lassen sich lediglich im Ausmaß der Spezifität der bakteriellen Lektine für terminale Galaktosyl-Reste feststellen. Für die bakteriellen Lektine des Keims *S. mutans* DSM 6178 reichen schon ca. 2,5 mM des spezifischen Glykokonjugats aus, um die 50%-Inhibition der Lektinbindung zu erreichen, während bei *S. mutans* DSM 20523 eine vergleichsweise doppelt so hohe Konzentration notwendig ist. Mit zunehmender Konzentration des Verdrängungs-Glykokonjugats lassen sich beide bakteriellen Homogenate gleichermaßen effektiv inhibieren. Somit liegt die Vermutung nahe, dass eine höhere Spezifität des bakteriellen Lektins des Keims *S. mutans* DSM 6178 für den terminalen Glykanrest des eingesetzten Verdrängungs-Glykokonjugats für die initial stärkere Inhibition verantwortlich ist. Insgesamt stellt sich die Verdrängungskurve für *S. mutans* DSM 6178 auffällig kongruent zu der des pflanzlichen Lektins PNA dar. Auch diese Tatsache deutet auf die besonders hohe Spezifität der lektinspezifischen Rezeptoren des Keims *S. mutans* DSM 6178 für endständige Galaktosyl-Reste, ähnlich der des pflanzlichen Lektins PNA, hin.

Beim Vergleich der beiden bakteriellen Homogenate im Protein-Gel erscheint für beide *S. mutans*-Subtypen jeweils ein individuelles Bandenmuster mit einer Vielzahl von Proteinbanden. Die im Blot ermittelten Bindungsspezifitäten kongruieren mit den Ergebnissen aus dem kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassay. *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 zeigen ausschließlich eine PNA-spezifische Bindungsaffinität gegenüber endständigen β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Resten. Durch das Blotten der zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden auf die in PNA-spezifischem Beschichtungs-Glykokonjugat (BSA-Gal-1,3-Gal-NAc) vorinkubierte PVDF-Membran treten für beide *S. mutans*-Subtypen zwei charakteristische Proteinbanden hervor. Diese für die β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Spezifität verantwortlichen Proteine besitzen ein Molekulargewicht von ca. 90 kDa und 155 kDa. Der Einsatz deglykosylierter Beschichtungs-Glykokonjugate ergab, dass all die anderen sichtbaren Proteinbanden auf nicht lektinabhängigen Bindungsmechanismen beruhen.

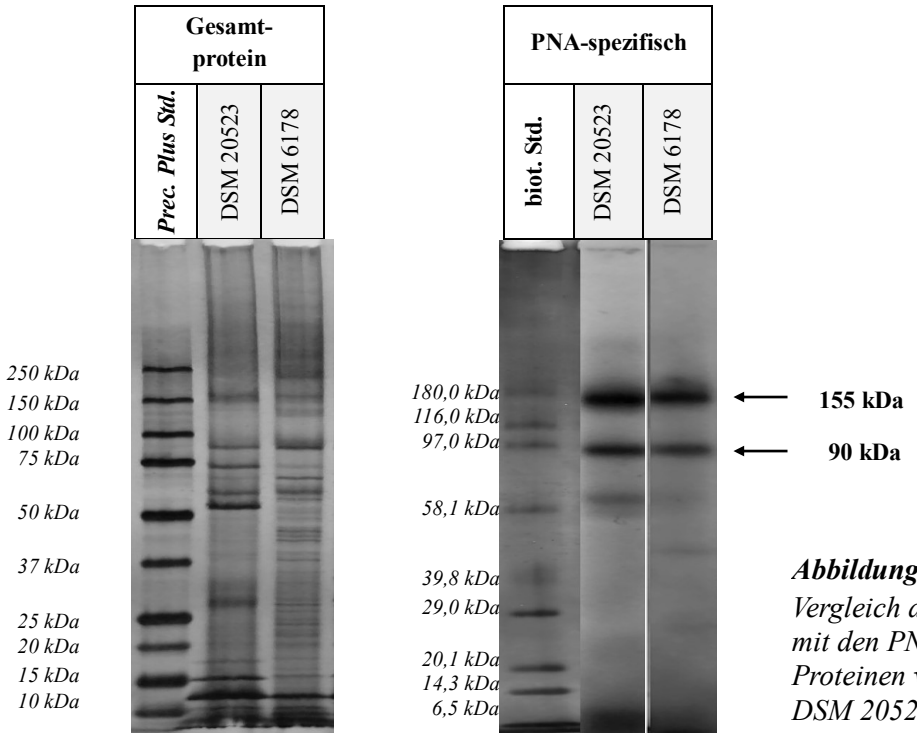


Abbildung 5-4:
Vergleich des Gesamtproteins mit den PNA-spezifischen Proteinen von S. mutans DSM 20523 und DSM 6178

Demnach konnten sowohl für *S. mutans* DSM 20523 als auch für DSM 6178 zwei identische Oberflächenmembranproteine mit ausgeprägter β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Spezifität identifiziert werden. Signifikante Intensitätsunterschiede in der Färbung der Proteinbanden werden nicht deutlich.

Die Molekulargewichte der in dieser Studie identifizierten Lektine entsprechen dabei in Größenordnung der, der bereits identifizierten glykanbindenden Proteine von *S. mutans* (GbpA, 75 kDa; GbpB, 90 kDa; GbpC, 70 kDa; GbpD, 76 kDa) [137]. Jedoch werden beim Vergleich verschiedener

Literaturquellen deutliche Unterschiede bezüglich des ermittelten Molekulargewichts deutlich [99, 127, 137]. Weitere Untersuchungen dieser in der Literatur beschriebenen glykanbindenden Proteine (GbpA-D) des Keims *S. mutans* bezüglich ihres Molekulargewichts und ihrer Bindungsspezifität sind notwendig, um einen eindeutigen Bezug zwischen ihnen und den in dieser Studie nachgewiesenen bakteriellen Lektinen herstellen zu können.

Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Spezifität von *S. mutans* korreliert mit den Beobachtungen früherer Speicheluntersuchungen [65, 115, 118, 190, 194]. In der von *Seemann* veröffentlichten Studie wurde der Speichel kariesfreier und kariesaktiver Kinder auf eine eventuell vorhandene Glykanspezifität untersucht. Dabei wurde eine mögliche Verdrängung der eingesetzten pflanzenspezifischen Lektine PNA, SNA, GNA, ConA, AAA und WGA mit bekannter Bindungsspezifität durch die Speichelproben evaluiert. Im Speichel kariesfreier Kinder konnte eine signifikant erhöhte Konzentration β-D-Galaktosyl-Reste-tragender Glykane festgestellt werden – die kohlenhydratvermittelte PNA-Bindung konnte durch die Speichelproben effektiv inhibiert werden [190]. Das deutlich verringerte Vorkommen von *S. mutans* in der Mundhöhle kariesfreier Individuen lässt sich demnach mit dem Vorliegen PNA-spezifischer Rezeptoren auf der bakteriellen Oberfläche von *S. mutans* in Verbindung bringen.

Des Weiteren zeigte der Speichel von Kindern mit hoher Kariesprävalenz eine signifikant höhere Inhibition einer kohlenhydratvermittelten SNA-Bindung. Kinder mit hoher Karieserfahrung besitzen demnach höhere Konzentrationen von Glykanen mit terminalen Sialyl-Resten im Speichel als kariesfreie Kinder. *Seemann* wertete dies als Zeichen einer gesteigerten Mukusproduktion (erhöhte Gesamtkonzentration an Speichelmuzinen) als Reaktion auf eine erhöhte Plaque-Belastung. Unter den Glykanstrukturen der Muzine ist die für SNA spezifische Sialinsäure eine der häufigsten Monosaccharide [79]. In den Glykoproteinen muköser Sekrete der Schleimhäute und der Speicheldrüsen maskiert sie in terminaler Stellung darunter liegende Rezeptoren für andere Lektine [186]. Erst nach Abspaltung durch Neuraminidasen, die häufige Pathogenitätsfaktoren von Bakterien darstellen, werden diese Rezeptoren freigelegt. Die genaue Bedeutung eines erhöhten Gehalts terminaler Sialylreste-tragender Glykane für die Entstehung von Karies ist bisher jedoch unklar. Auch in der vorliegenden Studie konnte für keine der beiden *S. mutans*-Subtypen eine SNA-Spezifität nachgewiesen werden.

Einen interessanten Aspekt stellt jedoch der Nachweis eines für *S. sanguis* spezifischen Adhäsins für terminale Sialinsäure dar [42, 154]. *S. sanguis* zählt zu den initialen Besiedlern der Plaqueflora. Durch das verstärkte Abfangen von *S. sanguis* in der Mundhöhle kariesaktiver Individuen (mit einem Überangebot an Sialylresten im Speichel), wäre eine erleichterte Bindung von anderen Mikroorganismen, wie *S. mutans* und *S. sobrinus* denkbar.

Beim Einsatz der GNA-, ConA- und AAA-spezifischen Verdrängungs-Glykokonjugate konnte auch mit zunehmender Konzentration des Verdrängungs-Glykokonjugats keine Verdrängung für *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 nachgewiesen werden.

5.3.5 VERGLEICH DER BINDUNGSSPEZIFITÄT - *S. MUTANS* VS. *S. SOBRINUS*

Während beide *S. mutans*-Subtypen DSM 20523 und DSM 6178 ein sehr ähnliches Bindungsverhalten aufweisen, lassen sich beim Vergleich mit *S. sobrinus* DSM 20381, einem weiteren Vertreter der Mutans-Streptokokken, deutliche Unterschiede in Bezug auf die Bindungsspezifität erkennen. Die für *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 nachgewiesene β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Spezifität kann für *S. sobrinus* DSM 20381 weder im kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassay noch im Blot nachgewiesen werden. Stattdessen zeigt *S. sobrinus* DSM 20381 eine ausgeprägte Bindungsspezifität gegenüber terminalen Mannose-Strukturen (in Form von Mannan). Im kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassay lässt sich das bakterielle Homogenat von *S. sobrinus* bereits in Gegenwart geringer Konzentrationen endständiger Mannose (Mannan) in seiner Lektinbindung an die feste Phase reduzieren. Bereits ca. 0,1 µg/ml Mannan reichen aus, um die 50%-Inhibition zu erreichen.

Interessant erscheint die Tatsache, dass beim Einsatz eines Verdrängungs-Glykokonjugats mit zentral gelegener Mannose-Struktur (Methyl-α-D-Mannopyranosid), anstelle der terminalen Mannose-Reste, keine signifikante Verdrängung festgestellt werden kann. Während Methyl-α-D-Mannopyranosid lediglich eine Monomannose darstellt, handelt es sich bei Mannan um ein Polysaccharid glykosidisch verbundener Mannose-Einheiten. Eine Oligomannose mit mehreren terminalen Mannose-Resten erscheint daher für die Inhibition *S. sobrinus*-spezifischer Oberflächenmembranproteine obligat.

In bisherigen Studien zur Speicheluntersuchung konnte bislang keine Mannose-Spezifität nachgewiesen werden. Dies lässt sich durch den primären Fokus der Untersuchungen auf den Speichel der großen Speicheldrüsen erklären. Dieser besteht zum überwiegenden Anteil aus Speichelmuzinen, dessen endständiger Mannose-Anteil lediglich im Bereich von etwa 1 % liegt.

Im Protein-Gel zeigt auch das bakterielle Homogenat von *S. sobrinus* ein individuelles Bandenmuster mit einer Vielzahl unterschiedlicher Proteinbanden. Insgesamt weisen *S. mutans* DSM 6178 und *S. sobrinus* DSM 20381 deutlich mehr Proteinbanden auf als *S. mutans* DSM 20523. Für den letztgenannten Keim ist auch eine deutlich höhere Proteingesamtkonzentration auffällig (doppelt so hoch als bei beiden anderen – vgl. Tabelle 4-1). Dies kann an einer insgesamt effektiveren Aufreinigung des Keims *S. mutans* DSM 20523 liegen.

Durch das Blotten der Proteinbanden auf vorbehandelte Membranen im Rahmen des Kontaktblots ließen sich diese auch für *S. sobrinus* DSM 20381 reduzieren. Die Intensität der spezifi-

schen biotinylierten Proteinbanden des Keims *S. sobrinus* DSM 20381 fällt im Vergleich zu den der beiden *S. mutans*-Subtypen deutlich schwächer aus. Die für die terminale Mannose-Spezifität verantwortlichen Oberflächenmembranproteine besitzen ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa und 45 kDa. Sie weisen damit ein deutlich geringeres Molekulargewicht auf als die für die β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Spezifität verantwortlichen Oberflächenmembranproteine der Keime *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178. Für beide Mutans-Streptokokken-Subtypen stellt sich jedoch die jeweils nachgewiesene Glykanspezifität im Vorhandensein jeweils zweier Oberflächenmembranproteine unterschiedlichen Molekulargewichts dar. So existiert bei allen drei untersuchten Mutans-Streptokokken jeweils mehr als ein Lektinisomer auf der bakteriellen Oberfläche, das für die entsprechende Bindungsspezifität verantwortlich zu sein scheint.

Analog zu *S. mutans* konnten auch für *S. sobrinus* in diversen Studien bereits glykanbindende Proteine identifiziert werden, dessen Molekulargewichte im Bereich von ca. 15-90 kDa liegen (GBP-1, 16 kDa; GBP-2, 87 kDa; GBP-3 68 kDa; GBP-4, 60 kDa; GBP-5, 49 kDa) [12]. Die in dieser Studie identifizierten Lektine des Keims *S. sobrinus* fallen genau in diesen Bereich. Jedoch sind auch hier weitere Untersuchungen notwendig, um einen Zusammenhang zwischen ihnen und den in der Literatur beschriebenen glykanbindenden Proteinen herstellen zu können.

Des Weiteren konnte für *S. sobrinus* DSM 20381 im Gegensatz zu beiden *S. mutans*-Subtypen eine schwache, durch Sialinsäure verdrängbare Spezifität gezeigt werden. Die Bindung des bakteriellen Homogenats an die feste Phase ließ sich in geringfügigem Ausmaß mit terminaler α-2,6-gebundenen Sialinsäure inhibieren. Zum Erreichen einer 50%igen Inhibition waren ca. 10 mg/ml N-Acetyl-Neuraminlactose notwendig. Eine Verdrängung durch endständige Sialyl-Reste fand somit nur mit Verdrängungs-Glykokonjugat nahe der eingesetzten Maximalkonzentration statt. Die deutlich schwächere Verdrängung des bakteriellen Homogenats von *S. sobrinus* durch endständige Sialyl-Reste im Gegensatz zu terminalen Mannose-Resten kann als eine weniger stark ausgeprägte Bindungsspezifität gegenüber des Glykans gedeutet werden. Durch den Einsatz eines dem Sialyl-Rest ähnlichen terminalen Glykanrests mit entsprechend größerer lektinspezifischer Übereinstimmung der Glykanstruktur ist eine effektivere Inhibition der Adhäsion vorstellbar.

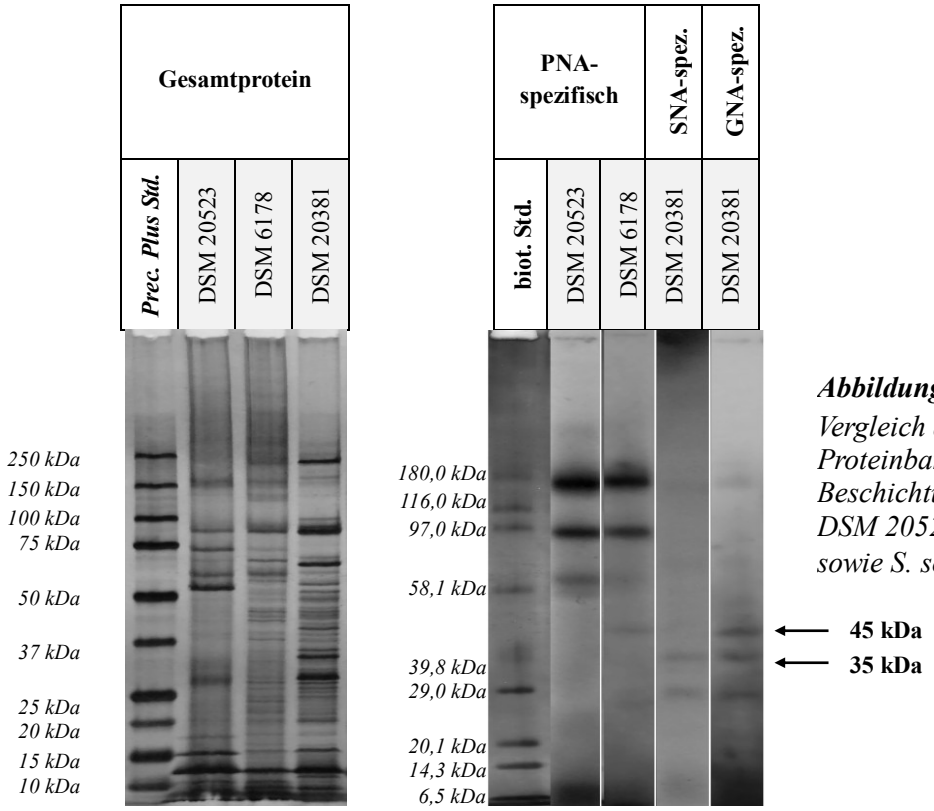


Abbildung 5-5:
Vergleich des Gesamtproteins mit den Proteinbanden auf spezifischer Beschichtung der Keime S. mutans DSM 20523 und DSM 6178 sowie S. sobrinus DSM 20381

S. sobrinus ist nachweislich weniger stark im Kariesgeschehen involviert als *S. mutans*. Während *S. mutans* mit 70-100 % am häufigsten in der kariogenen Plaque anzutreffen ist, findet man *S. sobrinus* nur in < 30 % der Fälle [124]. Dies steht im Zusammenhang mit der von *Seemann* nachgewiesenen erhöhten Konzentration von Glykanen mit terminalen Sialyl-Resten im Speichel kariesaktiver Kinder [190]. Die Sialinsäure-Spezifität von *S. sobrinus* korrespondiert mit seinem verminderten Auftreten im Vergleich zum nicht Sialinsäure-spezifischen *S. mutans*. Durch die ebenfalls nachgewiesene, stärker ausgeprägte Bindungsspezifität gegenüber terminalen Mannose-Strukturen und der Möglichkeit weiterer Bindungsspezifitäten ist die dennoch vorliegende Kariesaktivität zu begründen. Insgesamt ist die Sialyl-Spezifität für *S. sobrinus* jedoch vorsichtig zu bewerten. Weitere Untersuchungen wären diesbezüglich erforderlich.

Für die Proteinbanden auf SNA-spezifischer Beschichtung lässt sich eine Intensitätsreduktion auf dem deglykosylierten Beschichtungs-Glykokonjugat aufgrund der initial nur sehr schwachen Darstellung der Proteinbanden nur schwer beurteilen. Weiterer Klärung bedarf außerdem die Tatsache, dass die beiden nachgewiesenen Proteinbanden auf SNA-spezifischer Beschichtung ebenfalls auf der GNA-/ConA-spezifischen Membran zu erkennen sind.

Eine α-1,6-gebundene Fukose-Spezifität kann für alle drei Bakterien ausgeschlossen werden.

5.4 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Ziel dieser Studie war die Charakterisierung der bakteriellen Lektine der kariesaktiven Keime *S. mutans* und *S. sobrinus* bezüglich ihrer Glykanbindungsspezifität. Die Bindung über Glykokonjugate an Rezeptoren der Mundhöhle spielt bei der bakteriellen Adhäsion eine entscheidende Rolle. Um die Erkenntnisse über die Glykanbindungsspezifität der bakteriellen Oberflächenmembranproteine (Lektine) im Rahmen der Kariesprophylaxe ausnutzen zu können, soll durch kompetitive Hemmung mit Hilfe der Zuführung spezifischer Glykanstrukturen die Etablierung der Bakterienspezies *S. mutans* auf der Zahnoberfläche gezielt unterbunden werden, ohne dabei die residente, apathogene Standortflora zu beeinflussen.

Dazu wurden die ausgewählten Bakterienstämme in ausreichender Menge kultiviert, deren Lektine in Form eines bakteriellen Homogenats isoliert und anschließend in speziell dafür entwickelten (etablierten) Versuchsreihen spezifiziert. Durch den Einsatz fünf verschiedener Glykokonjugat-Strukturen konnten für *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 sowie *S. sobrinus* DSM 20381 sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede bezüglich ihres Bindungsverhaltens dargestellt werden.

Für jede der drei bakteriellen Subspezies war ein Bindungsspezifitätsnachweis möglich. Dabei zeigten die bakteriellen Homogenate beider *S. mutans*-Subtypen (DSM 20523 und DSM 6178) deutliche Gemeinsamkeiten in Bezug auf ihre Lektinspezifität. Während für beide Keime eine besonders ausgeprägte β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Spezifität nachgewiesen werden konnte, konnte beim Einsatz der weiteren Verdrängungs-Glykokonjugate trotz eingesetzter Maximalkonzentration keine Spezifität für *S. mutans* DSM 20523 und DSM 6178 festgestellt werden. Die bereits in anderen Studien vermutete terminale Galaktosyl-Spezifität von *S. mutans* konnte somit im Rahmen dieser Untersuchung bestätigt werden.

S. sobrinus zeigte hingegen ein völlig konträres Bindungsverhalten. Im Gegensatz zu den beiden *S. mutans*-Subtypen konnte hier keine terminale Galaktosyl-Spezifität nachgewiesen werden. Stattdessen erfolgte der in der Literatur bisher unbekannte Nachweis einer ausgeprägten Bindungsspezifität gegenüber terminalen Mannose-Strukturen in Form einer Oligomannose. Interessant ist die Tatsache, dass eine Monomannose allein für die Bindungsinhibition nicht ausreichend erscheint. Darüber hinaus konnte für *S. sobrinus* DSM 20381 eine weitere Lektinspezifität nachgewiesen werden. Durch terminale α-2,6-gebundene Sialinsäure ließ sich das bakterielle Homogenat jedoch nicht annähernd effektiv inhibieren als durch die bereits erwähnten terminalen Mannose-Reste. Diese insgesamt relativ schwache Bindungsspezifität an SNA-spezifische Glykokonjugate legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den endständigen Sialylsäure-Resten nur um eine für den entsprechenden Lektinrezeptor spezifische, sehr ähnliche Glykanstruktur handelt.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse gelang es, die für andere Bakterienspezies (z. B. *E. coli*) bereits bekannte Bindungsheterogenität sowohl interspezifisch zwischen Subspezies der Mutans-Streptokokken (*S. mutans* und *S. sobrinus*) als auch intraspezifisch innerhalb einer Subspezies am Beispiel von *S. sobrinus* DSM 20381 darzustellen. Es ist anzunehmen, dass sich auch auf der bakteriellen Oberfläche von *S. mutans*-Subtypen Lektine mit einer weiteren Bindungsspezifität befinden. Diese Frage bleibt aufgrund des in dieser Studie auf fünf verschiedene spezifische Glykokonjugate begrenzten Einsatzes zunächst offen.

Darüber hinaus konnte für alle eingesetzten Bakterienspezies jeweils mehr als ein Lektin unterschiedlichen Molekulargewichts für die jeweils spezifische Lektinbindung auf der bakteriellen Oberfläche identifiziert werden. Die Molekulargewichte der entsprechenden Lektine liegen dabei für *S. mutans* bei 90 kDa und 155 kDa, für *S. sobrinus* bei 35 kDa und 45 kDa. Diese spezifischen Lektine der drei untersuchten kariesätiologisch bedeutsamen Bakterien sind in Tabelle 4-5 mit ihren Molekulargewichten entsprechend ihrer Bindungsspezifität übersichtlich dargestellt. Aufgrund des nachgewiesenen heterogenen Bindungsverhaltens innerhalb der Mutans-Streptokokken erlangt die Einteilung in individuell verschiedene Subspezies durchaus Berechtigung.

Der in dieser Arbeit entwickelte Versuchsaufbau stellt ein geeignetes Verfahren zur Charakterisierung der bakteriellen Glykanbindungsspezifität auf biochemischer Ebene dar. Bei entsprechenden Vorkenntnissen ist durch den Einsatz standardisierter Routinemethoden eine reproduzierbare Analyse der bakteriellen Lektine im Zeitrahmen von ca. acht Tagen möglich. Dies umfasst die Gewinnung biotinylierter Oberflächenmembranproteine bereits kultivierter bzw. aus der Mundhöhle gewonnener Bakterien, deren Proteingehaltsbestimmung, die partielle Deglykosylierung eingesetzter Glykanstrukturen als Negativkontrolle sowie die Charakterisierung der Bindungsspezifität mit Hilfe des kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassays. Die genaue Charakterisierung der für die entsprechende Lektinbindung spezifischen Proteine bezüglich ihres Molekulargewichts mit Hilfe der Gelelektrophorese und anschließendem Kontaktblot würde weitere fünf Tage in Anspruch nehmen. Ein routinemäßiges Verfahren zur zuverlässigen Bestimmung bakterieller Bindungsspezifitäten im Rahmen der antiadhäsiven Therapie ist auf Basis des in dieser Studie entwickelten Versuchsablaufs gut vorstellbar.

5.5 PERSPEKTIVEN

Die Etablierung eines geeigneten Verfahrens zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien eröffnet neben den bereits etablierten Kariespräven-

tionsstrategien die Möglichkeit einer innovativen kariespräventiven Maßnahme durch eine mögliche orale Zufuhr antiadhäsiv wirkender Glykanstrukturen.

Die in dieser Arbeit demonstrierte Spezifizierung der Oberflächenmembranproteine zweier *S. mutans*-Subtypen sowie von *S. sobrinus* und deren dargestellte Bindungsinhibition durch das Vorhandensein spezifischer Glykane bildet einen weiteren Schritt auf dem Gebiet der antiadhäsiven Therapie im Bereich des Kariesgeschehens. Aufgrund der in dieser Studie erneut nachgewiesenen Bindungsheterogenität innerhalb und zwischen den einzelnen Bakterienspezies sind weiterführende Versuchsreihen notwendig, um die Bindungsspezifität der entsprechenden Bakterien in Bezug auf weitere Glykanstrukturen zu untersuchen.

Der hier vorgestellte Versuchsablauf soll als Grundlage zur Etablierung eines routinemäßigen, begrenzt aufwendigen Verfahrens dienen, um die Glykanbindungsspezifität spezifischer bakterieller Lektine schnell und zuverlässig zu bestimmen. Das Ziel im Rahmen einer antiadhäsiven Therapie ist dabei die Entwicklung eines komplexen Oligosaccharids mit einer Vielzahl spezifischer Glykanstrukturen zur individuenübergreifenden, gezielten Bindungsinhibition pathogener Mikroorganismen.

Wissenschaftliche Studien belegen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Präsenz kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien bei Individuen. In diesem Zusammenhang sei auch die individuenspezifische Ausstattung des Speichels mit genetisch determinierten Glykokonjugaten erwähnt, welche, durch direkten Einfluss auf die „Kariesanfälligkeit“ an der ungleichen Verteilung kariöser Läsionen innerhalb der Bevölkerung beteiligt sein könnte. Unter dem Aspekt der vorherrschenden Individuenspezifität wäre es somit denkbar, mit Hilfe einer Plaqueprobe, individuell die präsente Keimflora zu erfassen, um ihr gezielt mit entsprechenden komplementären Glykanstrukturen zu begegnen. Anstatt der relativ zeitaufwendigen initialen Isolation der bakteriellen Oberflächenmembranproteine kultivierter Bakterien stellt die direkte Untersuchung individuenspezifischer Plaqueproben eine deutliche Optimierung in Bezug auf den analytischen Zeitaufwand dar. Derartige Untersuchungsmöglichkeiten befinden sich bereits in derzeitiger Diskussion. So bietet die SELDI-TOF-Technik (*surface-enhanced laser desorption ionization – time-of-flight*) eine vielversprechende Methode zur quantitativen Proteinanalyse komplexer biologischer Strukturen mit einer hohen Sensitivität und Reproduzierbarkeit. Durch die Zufuhr entsprechender Glykanstrukturen wäre eine schnelle, gezielte und unkomplizierte Charakterisierung der Proteingemische denkbar. Auf dem Gebiet der Magnetresonanztomographie (MRT) ergeben sich Möglichkeiten zur Bestimmung der genauen Lokalisation der Oberflächenmembranproteine (Lektine) auf der bakteriellen Oberfläche durch die Anregung der Teilchen bei entsprechender Bindung zugeführter Glykanstrukturen.

Diese und weitere Ansatzmöglichkeiten sollten in Betracht gezogen werden, um auf dem Gebiet der Kariesprävention durch die gezielte Verabreichung eines individuellen „Glykan-Cocktails“ (Glykokonjugatgemisch) zur spezifischen Bindungsinhibition kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien im Sinne einer antiadhäsiven Therapie weitere Fortschritte zu erreichen.

Jedoch stellt sich wie auch bei anderen sich derzeit in Diskussion befindlichen potentiellen Präventionsstrategien die Frage nach den Auswirkungen durch eine mögliche Verschiebung in der Zusammensetzung der intraoralen Mikroflora und einer damit verbundenen Störung des ökologischen Gleichgewichts. Es ist anzunehmen, dass durch die Verhinderung der Adhäsion pathogener Mikroorganismen ein *shift* in der mikrobiellen Mundflora stattfindet, indem andere Bakterienspezies die zuvor von *S. mutans* besetzte Nische besiedeln und so einer erneuten Rekolonisation durch *S. mutans* entgegenwirken [70]. Da die bakterielle Adhäsion jedoch nicht ausschließlich auf einer glykanvermittelten Lektinbindung basiert, ist anzunehmen, dass die Mutans-Streptokokken nicht eliminiert, sondern lediglich auf ein „verträgliches“ Maß reduziert werden. In entsprechender Konzentration gehören sie zur apathogenen Mikroflora dazu.

Sehr wichtig erscheint weiterhin die Tatsache, dass der „Glykan-Cocktail“ ausschließlich hochspezifisch für die pathogenen Mikroorganismen ist, damit nicht die Bakterien der residenten Standortflora in ihrer Adhäsion behindert werden und so möglicherweise die Etablierung anderer Mikroorganismen mit pathologischem Potential begünstigen.

Im Gegensatz zur Gewinnung entsprechender Impfstoffe in Form von Antikörpern bzw. Antigenen oder gentechnisch manipulierten Keimen stellt die Produktion einer spezifischen Glykanmischung im Rahmen einer möglichen antiadhäsiven Therapie eine kosteneffektive, einfach umsetzbare Variante dar, dessen Anwendung dank einer minimal erforderlichen Patienten-Compliance für einen weltweiten Einsatz geeignet erscheint. In Bezug auf Kariesrisikogruppen (wie z. B. geistig oder physisch behinderte, immunsupprimierte oder Xerostomie-Patienten) sind auch Kombinationen verschiedener Kariespräventionsstrategien vorstellbar.

Eine besondere Zielgruppe stellen Mütter mit Kindern im Alter von etwa einem halben bis zweieinhalb Jahren dar, bei denen durch die Verabreichung antiadhäsiv wirkender Glykanstrukturen während des kritischen *window of infectivity* die Möglichkeit einer potentiellen Übertragung von Mutans-Streptokokken in dieser Zeit minimiert werden könnte. Studien belegen, dass Kinder, die bereits im Alter von zwei Jahren mit *S. mutans* infiziert wurden, mit vier Jahren signifikant mehr kariöse Läsionen (dmfs = 10,6 ± 5,3) bilden als jene, die später (dmfs = 3,4 ± 1,8) oder gar nicht (dmfs = 0,3 ± 1,1) infiziert wurden [6]. Dies belegt nicht nur die enge Beziehung zwischen Mutans-Streptokokken und Karies, sondern zeigt, dass eine signifikante Reduktion der Karieserfahrung durch eine Verhinderung bzw. durch ein Herauszögern der

initialen Besiedlung mit Mutans-Streptokokken während des *window of infectivity* erreicht werden kann [30].

Aufgrund der bakteriellen Vielfalt im menschlichen Organismus und der damit verbundenen Möglichkeit potentieller Infektionen erstreckt sich das Anwendungsgebiet der antiadhäsiven Therapie über ein weites Feld. Weitere wissenschaftliche Forschung in diesem Bereich ist notwendig, um neben der potentiellen Kariesprävention möglicherweise auch fachübergreifend auf dem Gebiet der Onkologie entscheidende Fortschritte zu erzielen. Denn auch im Rahmen der Tumormetastasierung wird die Affinität von Malignomzellen zu bestimmten Organen durch glykanspezifische Oberflächenlektine bestimmt [58, 197].

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zu den weltweit am häufigsten und am weitesten verbreiteten bakterienbedingten Erkrankungen des Menschen zählt trotz beachtlicher Präventionserfolge noch immer die Karies, deren Behandlung hohe Kosten im Gesundheitswesen verursacht. Derzeit ist auf dem Gebiet der Kariesprophylaxe eine eingetretene Stagnation zu beobachten. Innovative kariespräventive Maßnahmen zusätzlich zu den sich bereits in Anwendung befindlichen etablierten Strategien erscheinen daher notwendig, um die Ausbreitung dieser Volkskrankheit weiterhin zu minimieren. Da die Adhäsion und Etablierung pathogener Mikroorganismen auf der Zahnoberfläche den initialen Schritt im Infektionsgeschehen darstellt, gewinnt die antiadhäsive Therapie durch eine mögliche Verhinderung dessen an zunehmender Bedeutung. Bisher beschäftigen sich jedoch nur wenige wissenschaftliche Studien mit der Charakterisierung der Bindungsspezifität kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien.

Aufgrund der besonderen Bedeutung der Mutans-Streptokokken im Kariesgeschehen war es das Ziel dieser Studie, die adhäsionsvermittelnden Oberflächenmembranproteine (Lektine) zweier *Streptococcus mutans*-Subtypen und *Streptococcus sobrinus* bezüglich ihrer Bindungsspezifität zu untersuchen. Die bakteriellen Lektine der kultivierten Bakterienspezies wurden dazu in Form eines bakteriellen Homogenats weitestgehend isoliert und biotinyliert. Mit Hilfe des kompetitiven Lektinbindungs-Inhibitionsassays konnten die bakteriellen Homogenate bezüglich ihres Bindungsverhaltens gegenüber PNA-, SNA-, GNA-, ConA- und AAA-spezifischen Glykanstrukturen sowie einer möglichen konzentrationsabhängigen Verdrängung durch entsprechende Glykokonjugate charakterisiert werden. Das Blotten der zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine der bakteriellen Homogenate auf glykanspezifisch vorbehandelte PVDF-Membranen ermöglichte die qualitative Proteinanalyse all der für die spezifische Glykanbindung verantwortlichen Proteine. Durch den gleichzeitigen Einsatz deglykosylierter Glykanstrukturen war der Ausschluss all der Bindungsmechanismen, die dabei nicht auf einer Protein-Kohlenhydrat-Bindung (Lektinbindung) basierten, möglich.

Die vermutete Bindungsheterogenität innerhalb der Mutans-Streptokokken ließ sich sowohl interspezifisch zwischen den Subspezies *S. mutans* und *S. sobrinus* als auch intraspezifisch innerhalb einer Subspezies am Beispiel von *S. sobrinus* bestätigen. Es ist daher anzunehmen, dass die Mutans-Streptokokken über Lektine mit unterschiedlicher Bindungsspezifität in der Lage sind an die Wirtsoberfläche zu adhärieren. Die aus früheren Speicheluntersuchungen bekannte terminale Galaktosyl-Spezifität von *S. mutans* konnte im Rahmen dieser Studie bestätigt werden. Für *S. sobrinus* hingegen erfolgte der in der Literatur bisher unbekannte Nachweis einer ausgeprägten Bindungsspezifität gegenüber einer terminalen Mannose-Struktur, in Form einer Oligomannose. Darüber hinaus ließ sich das bakterielle Homogenat von *S. sobrinus* durch

terminale Sialinsäure inhibieren, allerdings in vergleichsweise deutlich schwächerem Ausmaß. Der Besitz einer terminalen Fukose-Spezifität konnte für alle drei bakteriellen Homogenate ausgeschlossen werden. Für jede der eingesetzten Bakterienspezies ließ sich jeweils mehr als ein Lektin unterschiedlichen Molekulargewichts für die spezifische Lektinbindung auf der bakteriellen Oberfläche identifizieren. Die ermittelten Molekulargewichte der entsprechenden Lektine liegen dabei für *S. mutans* bei 90 kDa und 155 kDa, für *S. sobrinus* bei 35 kDa und 45 kDa.

Aufbauend auf dem im Rahmen dieser Studie entwickelten in-vitro-Versuchsablaufs ist eine zukünftige routinemäßige Bestimmung der individuellen Bindungsspezifität vorherrschender kariesinduzierender Bakterien durchaus vorstellbar. Im Rahmen der Kariesprophylaxe kann so durch kompetitive Hemmung nach Zufuhr eines individuellen heterogenen „Glykan-Cocktails“ die Etablierung kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien auf der Zahnoberfläche gezielt unterbunden werden, ohne dabei die residente, apathogene Standortflora zu beeinflussen. Das Verhindern der zuckerabhängigen Volkskrankheit Karies mit Hilfe einer spezifischen „Zuckerlösung“ stellt demnach einen durchaus interessanten Aspekt in der zukünftigen Kariesprävention und/oder -therapie dar.

Schlagwörter:

Kariesprävention, antiadhäsive Therapie, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, Lektine, Glykanstrukturen

7 ABSTRACT

Caries remains one of the most common and widespread bacterial-induced diseases amongst humans. Although remarkable efforts are made it is still causing enormous costs in health systems. Due to the current stagnation within caries prevention continuing development of innovative preventive strategies and techniques seem to be indispensable to minimize further expansion of this disease. Since the adhesion of bacteria to the tooth surface represents the precondition of dental plaque formation and subsequent caries development the anti-adhesive therapy gains significant importance by a possible prevention. So far there are only few scientific studies concentrating on the characterization of the binding specificities of caries-inducing microorganisms available.

Within caries etiology the mutans streptococci are of distinctive importance. Thus, the aim of this study was to evaluate potential differences in glycan-binding specificities of two *Streptococcus mutans*-subspecies and *Streptococcus sobrinus*. Therefore the bacterial lectins of the primarily cultivated microbial strains were isolated and biotinylated in form of a purified fraction. A competitive enzyme-linked lectin-binding assay was used to identify the binding of the glycan-portion of the bacterial surface lectins towards PNA-, SNA-, GNA-, ConA- and AAA-specific glycan patterns as well as a potential inhibition by solubilized complementary glycans in dependence on their concentration. Blotting of the electrophoresis pretreated microbial proteins on glycan-specific PVDF-membranes enabled a qualitative protein-analysis of all bacterial lectins which are responsible for the specific glycan-binding. The exclusion of all non-protein-carbohydrate-based binding-mechanisms (non-lectin-bindings) was obtained by applying deglycosylated glycan patterns in the same experimental setup.

The expected heterogeneity within the mutans streptococci could be verified interspecifically between the *S. mutans*-subspecies and *S. sobrinus* as well as intraspecifically within one of the subspecies (*S. sobrinus*). These findings suggest that the mutans streptococci possess surface lectins with heterogeneous glycan-binding sites in order to adhere to oral surfaces. Earlier reported glycan-binding specificity for terminal galactose-residues could be confirmed in this study. Contrarily, the finding of a significant mannose-binding-specificity in form of an oligomannose of the *S. sobrinus*-subspecies is yet unknown. Additionally, terminal sialyl-residues were shown to inhibit *S. sobrinus* as well, but clearly in a comparable lesser degree. The possession of terminal fucose-specificity could be excluded for all of the tested mutans streptococci. In conclusion, each of the tested strains showed more than one surface lectin responsible for the specific lectin-binding with varied molecular weight (S. mutans 90 kDa/155 kDa, S. sobrinus 35 kDa/45 kDa).

Regarding the established experimental concept and technique this present in vitro study might be used as a future standard procedure for the identification of the individual binding-specificity of predominant caries-inducing microorganisms. In the field of caries prevention it supplies the ability to prevent the lectin-mediated adhesion of mutans streptococci to oral surfaces. This could be achieved through the competitive inhibition by a heterogenous individual "glycan-cocktail" without disturbing the resident non-pathogen oral flora. Preventing a sugar-depending disease with the help of a specific "sugar solution" provides a new perspective of future caries-preventive and/or therapeutical strategies.

Keywords:

caries prevention, anti-adhesive therapy, *streptococcus mutans*, *streptococcus sobrinus*, lectins, glycan pattern

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. (NC-IUB) NCoI. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JBCN) Newsletter. *The Journal of Biological Chemistry.* January 10, 1981 1981;256(1):12-14.

2. Abeygunawardana C, Bush CA, Cisar JO. Complete structure of the cell surface polysaccharide of Streptococcus oralis ATCC 10557: a receptor for lectin-mediated interbacterial adherence. *Biochemistry.* Jul 2 1991;30(26):6528-6540.

3. Absolom DR, Lamberti FV, Policova Z, Zingg W, van Oss CJ, Neumann AW. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol.* Jul 1983;46(1):90-97.

4. Ackermans F, Klein JP, Ogier J, Bazin H, Cormont F, Frank RM. Purification and characterization of a saliva-interacting cell-wall protein from Streptococcus mutans serotype f by using monoclonal-antibody immunoaffinity chromatography. *Biochem J.* May 15 1985;228(1):211-217.

5. Aguirre A, Mendoza B, Reddy MS, Scannapieco FA, Levine MJ, Hatton MN. Lubrication of selected salivary molecules and artificial salivas. *Dysphagia.* 1989;4(2):95-100.

6. Alaluusua S, Renkonen OV. Streptococcus mutans establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. *Scand J Dent Res.* Dec 1983;91(6):453-457.

7. Anderson MH. Changing paradigms in caries management. *Curr Opin Dent.* Mar 1992;2:157-162.

8. Appelbaum B, Golub E, Holt SC, Rosan B. In vitro studies of dental plaque formation: adsorption of oral streptococci to hydroxyaptite. *Infect Immun.* Aug 1979;25(2):717-728.

9. Arends J, Jongebloed WL. The enamel substrate-characteristics of the enamel surface. *Swed Dent J.* 1977;1(6):215-224.

10. Aronson M, Medalia O, Schori L, Mirelman D, Sharon N, Ofek I. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with Escherichia coli by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside. *J Infect Dis.* Mar 1979;139(3):329-332.

11. Axelsson P, Lindhe J. Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol.* May 1978;5(2):133-151.

12. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(2):89-99.

13. Beighton D, Hayday H, Russell RRB, Whiley RA. Streptococcus macacae sp. nov. from the dental plaque of monkeys (Macaca fascicularis). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1984;34:332-335.

14. Bennick A, McLaughlin AC, Grey AA, Madapallimattam G. The location and nature of calcium-binding sites in salivary acidic proline-rich phosphoproteins. *J Biol Chem.* May 25 1981;256(10):4741-4746.

15. Berkowitz RJ, Jordan HV, White G. The early establishment of Streptococcus mutans in the mouths of infants. *Arch Oral Biol.* Mar 1975;20(3):171-174.

16. Bernardi G, Kawasaki T. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns. *Biochim Biophys Acta.* Aug 13 1968;160(3):301-310.

17. Black G. Gelantineforming microorganisms. *Independent Practitioner.* 1886;546.

18. Börsch G. Der Gastrointestinaltrakt als Immunorgan. *Klin Wschr.* 1984;62:699-709.

19. Botha FS, Botha SJ, Kroon J, Steyn PL. Caries prediction factors in children with primary dentition. *SADJ.* Aug 2001;56(8):348-352.

20. Bowen WH, Cohen B, Cole MF, Colman G. Immunization against dental caries. *Br Dent J.* Jul 15 1975;139(2):45-58.

21. Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro. *J Dent Res.* Sep 1989;68(9):1298-1302.

22. Bratthall D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling Streptococcus mutans. *Odontol Revy.* 1970;21(2):143-152.

23. Bronner F. Dental aspects of old age. An oral biologist discusses the impact of aging. *J Am Soc Geriatr Dent.* Autumn 1977;13(1):14, 25-16.

24. Buddecke E. *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin*: Walter de Gruyter. Berlin; 1981.

25. Bullen JJ, Rogers H. J. Leigh. Ion-binding proteins in milk and resistance to Escherichia coli infections in infants. *Brit Med J.* 1872;1:69-75.

26. Bunting RW, Palmerlee, F. The role of Bacillus acidophilus in dental caries. *J. Am. Dent. Assoc.* 1925;12:381-411.

27. Burger O, Weiss E, Sharon N, Tabak M, Neeman I, Ofek I. Inhibition of Helicobacter pylori adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002;42(3 Suppl):279-284.

28. Busscher HJ, van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res.* Apr 1997;11(1):24-32.

29. Carlen A, Olsson J, Borjesson AC. Saliva-mediated binding in vitro and prevalence in vivo of Streptococcus mutans. *Arch Oral Biol.* Jan 1996;41(1):35-39.

30. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res.* Jan 1993;72(1):37-45.

31. Childers N, Tong G, Li F, Dasanayake AP, Kirk K, Michalek SM. Humans immunized with Streptococcus mutans antigens by mucosal routes. *J Dent Res.* 2001;81(1):48-52.

32. Chrispeels MJ, Raikhel NV. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell.* Jan 1991;3(1):1-9.

33. Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci.* 1983;12:III-VII, 1-152.

34. Cisar JO, Takahashi Y, Ruhl S, Donkersloot JA, Sandberg AL. Specific inhibitors of bacterial adhesion: observations from the study of gram-positive bacteria that initiate biofilm formation on the tooth surface. *Adv Dent Res.* Apr 1997;11(1):168-175.

35. Clark WB, Bammann LL, Gibbons RJ. Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces. *Infect Immun.* Mar 1978;19(3):846-853.

36. Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol.* 1924:141-146.

37. Coykendall AL. Four types of Streptococcus mutans based on their genetic, antigenic and biochemical characteristics. *J Gen Microbiol.* Aug 1974;83(2):327-338.

38. Coykendall AL. Proposal to elevate the subspecies of Streptococcus mutans to species status based on their molecular composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1977;27:26-30.

39. Coykendall AL. Streptococcus sobrinus nom. rev. and Streptococcus ferus nom. rev.: habitat of these and other mutans streptococci. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983;33:883-885.

40. Coykendall AL. Classification and identification of the viridans streptococci. *Clin Microbiol Rev.* Jul 1989;2(3):315-328.

41. Demuth DR, Golub EE, Malamud D. Streptococcal-host interactions. Structural and functional analysis of a Streptococcus sanguis receptor for a human salivary glycoprotein. *J Biol Chem.* May 5 1990;265(13):7120-7126.

42. Demuth DR, Lammey MS, Huck M, Lally ET, Malamud D. Comparison of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis receptors for human salivary agglutinin. *Microb Pathog.* Sep 1990;9(3):199-211.

43. Drews J. *Konzentration Lektin-spezifischer Speichelglykane im Verlauf einer experimentellen Gingivits* [Zahnmedizinische Dissertation]. Berlin: Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin, Zentrum für Zahnmedizin Campus Virchow-Klinikum der Medizinischen Fakultät der Charité; 2005.

44. Drucker DB, Melville TH. Fermentation end-products of cariogenic and non-cariogenic streptococci. *Arch Oral Biol.* May 1968;13(5):565-570.

45. Dua VK, Rao BN, Wu SS, Dube VE, Bush CA. Characterization of the oligosaccharide alditols from ovarian cyst mucin glycoproteins of blood group A using high pressure liquid chromatography (HPLC) and high field 1H NMR spectroscopy. *J Biol Chem.* Feb 5 1986;261(4):1599-1608.

46. Eckert R, He J, Yarbrough DK, Qi F, Anderson MH, Shi W. Targeted killing of Streptococcus mutans by a pheromone-guided "smart" antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* Nov 2006;50(11):3651-3657.

47. Eggen KH, Rolla G. Further studies on the composition of the acquired enamel pellicle. *Scand J Dent Res.* Dec 1983;91(6):439-446.

48. Einwag J. Epidemiologie der Karies (unter besonderer Berücksichtigung der Polarisierung des Kariesbefalls). Entwicklungen und Perspektiven. In: (IME) IMuE, ed. *Kariesprophylaxe für alle?!* Frankfurt; 1994.

49. Ellen RP, Lepine G, Nghiem PM. In vitro models that support adhesion specificity in biofilms of oral bacteria. *Adv Dent Res.* Apr 1997;11(1):33-42.

50. Ellen RP, Sivendra R. In vitro attachment, salivary agglutination, and surface fibril density of fresh Actinomyces isolates from two distinct oral surfaces. *J Dent Res.* May 1985;64(5):799-803.

51. Ericsson Y. Progress in caries prevention. *Caries Res.* 1978;12 (Suppl):1-112.

52. Fan MW. Effect of neuraminidase on the adherence of S. mutans to salivary pellicle. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* Jul 1993;28(4):209-211, 254.

53. Fauchard P. *Le Chirurgien Dentiste*. Paris; 1728.

54. Fitzgerald RJ. Dental research in gnotobiotic animals. *Caries Res.* 1968;2:139-146.

55. Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc.* Jul 1960;61:9-19.

56. Forester H, Hunter N, Knox KW. Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of Streptococcus mutans. *J Gen Microbiol.* Sep 1983;129(9):2779-2788.

57. Franz H. The ricin story. *Adv Lectin Res.* 1988;1:10-25.

58. Franz H. Schwerpunkt: Immunologie - Lektine. *mta.* 1992;7(11):1230-1236.

59. Gibbons RJ, ed. *Adhesion of Bacteria to Surfaces of the Mouth*. Chichester, England: Ellis Horwood, Ltd; 1980. R.C.W. Berkeley JML, J. Melling, P.R. Rutter, and B. Vincent, ed. Microbial Adhesion to Surfaces.

60. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res.* May 1989;68(5):750-760.

61. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI. Strains of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus attach to different pellicle receptors. *Infect Immun.* May 1986;52(2):555-561.

62. Gibbons RJ, Dankers I. Inhibition of lectin-binding to saliva-treated hydroxyapatite, to buccal epithelial cells, and to erythrocytes by salivary components. *Am J Clin Nutr.* Aug 1982;36(2):276-283.

63. Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of Streptococcus mutans JBP to apatitic surfaces. *J Dent Res.* Sep 1989;68(9):1303-1307.

64. Gibbons RJ, Houte JV. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annu Rev Microbiol.* 1975;29:19-44.

65. Gibbons RJ, Qureshi JV. Inhibition of adsorption of Streptococcus mutans strains to saliva-treated hydroxyapatite by galactose and certain amines. *Infect Immun.* Dec 1979;26(3):1214-1217.

66. Gibbons RJ, van Houte J. Dental caries. *Annu Rev Med.* 1975;26:121-136.

67. Gilleron M, Venisse A, Riviere M, Servin P, Puzo G. Carbohydrate epitope structural elucidation by 1H-NMR spectroscopy of a new Mycobacterium kansasii phenolic glycolipid antigen. *Eur J Biochem.* Oct 24 1990;193(2):449-457.

68. Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, et al. The Vipeholm dental caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand.* 1954;11:232-264.

69. Hajishengallis G, Koga T, Russell MW. Affinity and specificity of the interactions between Streptococcus mutans antigen I/II and salivary components. *J Dent Res.* Sep 1994;73(9):1493-1502.

70. Hajishengallis G, Michalek SM. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. *Oral Microbiol Immunol.* Feb 1999;14(1):1-20.

71. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. *Microbiol Rev.* Jun 1980;44(2):331-384.

72. Hamilton IR, Bowden G. Effect of fluoride on oral microorganisms. In: Eksstrand J FO, Silverstone L, ed. *Fluoride in dentistry*. Munksgaard, Kopenhagen; 1988:77-103.

73. Hannig M. Bildung, Funktion und Bedeutung der Pellikel. *Oralprophylaxe*; 1994.

74. Hannig M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig.* 1999;3:88-95.

75. Hannig M. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci.* 2005;113:2-13.

76. Harris R. Biology of the Children of Hopewood House, Bowral, Australia. 4. Observations on Dental-Caries Experience Extending over Five Years (1957-61). *J Dent Res.* Nov-Dec 1963;42:1387-1399.

77. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ.* Sep 5 1998;317(7159):657-660.

78. Hay DI, E. C. Moreno, ed. *Statherin and the acidic proline-rich proteins*. Florida, USA: CRC Press; 1989. O. TJ, ed. Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology; No. 1.

79. Herp A, Borelli C, Wu AM. Biochemistry and lectin binding properties of mammalian salivary mucous glycoproteins. *Adv Exp Med Biol.* 1988;228:395-435.

80. Hillman JD. Genetically modified Streptococcus mutans for the prevention of dental caries. *Antonie Van Leeuwenhoek.* Aug 2002;82(1-4):361-366.

81. Hillman JD, Mo J, McDonell E, Cvitkovitch D, Hillman CH. Modification of an effector strain for replacement therapy of dental caries to enable clinical safety trials. *J Appl Microbiol.* May 2007;102(5):1209-1219.

82. Hillman JD, Socransky SS. Replacement therapy of the prevention of dental disease. *Adv Dent Res.* Oct 1987;1(1):119-125.

83. Hojo S, Huguchi M, Araya S. Glucan inhibition of diffusion in plaque. *J Dent Res.* Jan-Feb 1976;55(1):169.

84. Imfeld TN. Identification of low caries risk dietary components. *Monogr Oral Sci.* 1983;11:1-198.

85. Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(2):175-200.

86. Jorge AO, Totti MA, de Almeida OP, Scully C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. *J Oral Pathol Med.* Feb 1993;22(2):54-56.

87. Kage A, Fimme S, Bernimoulin JP, et al. Oligosaccharides in mucosal host defense: model, method, and first data. *Adv Exp Med Biol.* 1995;371B:1177-1182.

88. Kage A, Weitzel, D., Köttgen, E. Novel Competitive Lectin-Binding Inhibition Assay For Quantitative Characterization of Glycoconjugates Using Different Peroxidase Labeled Lectins. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1989;27(9):703.

89. Kelly C, Evans P, Ma JK, et al. Sequencing and characterization of the 185 kDa cell surface antigen of Streptococcus mutans. *Arch Oral Biol.* 1990;35 Suppl:33S-38S.

90. Kelly CG, Younson JS. Anti-adhesive strategies in the prevention of infectious disease at mucosal surfaces. *Expert Opin Investig Drugs.* Aug 2000;9(8):1711-1721.

91. Keyes PH. Recent advances in dental caries research: bacteriology. *Int Dent J.* 1962;12:443-464.

92. Keyes PH. Research in dental caries. *J Am Dent Assoc.* Jun 1968;76(6):1357-1373.

93. Kishimoto E, Hay DI, Gibbons RJ. A human salivary protein which promotes adhesion of Streptococcus mutans serotype c strains to hydroxyapatite. *Infect Immun.* Dec 1989;57(12):3702-3707.

94. Kishimoto E, Hay DI, Gibbons RJ. Inhibition of adhesion-promoting activity of a human salivary protein which promotes adhesion of Streptococcus mutans JBP to hydroxyapatite. *FEMS Microbiol Lett.* Dec 15 1991;69(1):19-22.

95. Kishore U, Eggleton P, Reid KB. Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins. *Matrix Biol.* Mar 1997;15(8-9):583-592.

96. Klimm W. *Kariologie*. München: Carl Hanser Verlag; 1997.

97. Kocourek J, Horejsi V. Defining a lectin. *Nature.* 03/1981 1981;290(5803):188.

98. Kocourek J HV. Defining a lectin. *Nature.* 03/1981 1981;290(5803):188.

99. Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries. *Vaccine.* May 15 2002;20(16):2027-2044.

100. Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, Iwaki M. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of Streptococcus mutans serotype c. *Infect Immun.* Feb 1990;58(2):289-296.

101. Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *Faseb J.* Mar 1993;7(5):406-413.

102. König KG. [Etiology of caries with emphasis on the role of sugars]. *Dtsch Zahnarztl Z.* Oct 1987;42(10 Suppl 1):S20-29.

103. König KG. *Karies und Parodontopathien*. Stuttgart: Thieme Verlag; 1987.

104. König KG, Mühlemann HR. The cariogenicity of refined and unrefined sugar in animal experiments. *Arch Oral Biol.* Nov 1967;12(11):1297-1298.

105. Köttgen E, Reutter W, Tauber R. Endogene Lectine des Menschen und ihre Zuckerliganden. Zellbiologische und klinische Bedeutung. *Med Klin (Munich).* 2003;98:717-738.

106. Krasse B, Gahnberg L, Bratthall D. Antibodies reacting with Streptococcus mutans in secretions from minor salivary glands in humans. *Adv Exp Med Biol.* 1978;107:349-354.

107. Krasse B, Jordan HV, Edwardsson S, Svensson I, Trell L. The occurrence of certain "caries-inducing" streptococci in human dental plaque material with special reference to frequency and activity of caries. *Arch Oral Biol.* Aug 1968;13(8):911-918.

108. Kristoffersson K, Grondahl HG, Bratthall D. The more Streptococcus mutans, the more caries on approximal surfaces. *J Dent Res.* Jan 1985;64(1):58-61.

109. Lamont RJ, Demuth DR, Davis CA, Malamud D, Rosan B. Salivary-agglutinin-mediated adherence of Streptococcus mutans to early plaque bacteria. *Infect Immun.* Oct 1991;59(10):3446-3450.

110. Lamont RJ, Rosan B. Adherence of mutans streptococci to other oral bacteria. *Infect Immun.* Jun 1990;58(6):1738-1743.

111. Leach SA, Saxton CA. An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors. *Arch Oral Biol.* Nov 1966;11(11):1081-1094.

112. Lee SF, Progulske-Fox A, Erdos GW, et al. Construction and characterization of isogenic mutants of Streptococcus mutans deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). *Infect Immun.* Nov 1989;57(11):3306-3313.

113. Lehner T. Immunological aspects of dental caries and periodontal disease. *Br Med Bull.* May 1975;31(2):125-130.

114. Lembke A, Pause B. Über die kariostatische Wirksamkeit von D(+)-galactose. *Z Stomatol.* Jun 1989;86(4):179-189.

115. Levine MJ, Herzberg MC, Levine MS, et al. 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.* Jan 1978;19(1):107-115.

116. Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA, et al. Structural aspects of salivary glycoproteins. *J Dent Res.* Feb 1987;66(2):436-441.

117. Levine MJ, Tabak LA, Reddy MS, Mandel ID. *Nature of salivary pellicles in microbial adherence. Role of salivary mucins.* Washington: Mergenhagen, S. E.Rosan, B.; 1985

118. Ligtenberg AJ, Veerman EC, de Graaff J, Nieuw Amerongen AV. Saliva-induced aggregation of oral streptococci and the influence of blood group reactive substances. *Arch Oral Biol.* 1990;35 Suppl:141S-143S.

119. Liljemark WF, Schauer SV. Studies on the bacterial components which bind Streptococcus sanguis and Streptococcus mutans to hydroxyapatite. *Arch Oral Biol.* Sep 1975;20(9):609-615.

120. Lindquist B, Emilson CG. Colonization of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *Caries Res.* Mar-Apr 2004;38(2):95-103.

121. Lis H, Sharon N. Lectins as molecules and as tools. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:35-67.

122. Listgarten MA. Structure of the micorbial flora associated with periodontal health and disease in man. *J Periodontol.* 1976;47:1-18.

123. Littleton NW, Kakehashi S, Fitzgerald RJ. Recovery of specific "caries-inducing" streptococci from carious lesions in the teeth of children. *Arch Oral Biol.* May 1970;15(5):461-463.

124. Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev.* Dec 1986;50(4):353-380.

125. Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta.* Sep 19 2002;1572(2-3):198-208.

126. Lund B, Marklund BI, Stromberg N, Lindberg F, Karlsson KA, Normark S. Uropathogenic Escherichia coli can express serologically identical pili of different receptor binding specificities. *Mol Microbiol.* Mar 1988;2(2):255-263.

127. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping Streptococcus mutans biofilm architecture. *FEMS Microbiol Lett.* Mar 2007;268(2):158-165.

128. Ma JK. The caries vaccine: a growing prospect. *Dent Update.* Nov 1999;26(9):374-380.

129. Ma JK, Hunjan M, Smith R, Kelly C, Lehner T. An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against Streptococcus mutans. *Infect Immun.* Oct 1990;58(10):3407-3414.

130. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* Jul 1994;8(2):263-271.

131. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* Feb 2003;149(Pt 2):279-294.

132. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006;6 Suppl 1:S14.

133. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* Sep 1995;15(3):169-175.

134. Marthaler TM. Epidemiological and clinical dental findings in relation to intake of carbohydrates. *Caries Res.* 1967;1:222-238.

135. Marthaler TM. Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res.* May-Jun 2004;38(3):173-181.

136. Marthaler TM, O'Mullane, D. M, Vrbic, V. The prevalence of dental caries in Europe 1990-1995. ORCA Saturday afternoon symposium. *Caries Res.* 1995;30(237-55).

137. Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Ooshima T. Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of Streptococcus mutans. *Oral Microbiol Immunol.* Feb 2007;22(1):30-35.

138. Mayhall CW. Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth. *Arch Oral Biol.* Dec 1970;15(12):1327-1341.

139. Meckel AH. The formation and properties of organic films on teeth. *Arch Oral Biol.* Jul-Aug 1965;10(4):585-598.

140. Melo NS, Nimtz M, Conradt HS, Fevereiro PS, Costa J. Identification of the human Lewis(a) carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (Vaccinium myrtillus L.). *FEBS Lett.* Sep 29 1997;415(2):186-191.

141. Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol.* Jul 1987;7(4):265-276.

142. Mestecky J, McGhee JR, Arnold RR, Michalek SM, Prince SJ, Babb JL. Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen. *J Clin Invest.* Mar 1978;61(3):731-737.

143. Micheelis W, Reich, E. *Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III). Ergebnisse, Trends und Problemanalysen auf der Grundlage bevölkerungsrepräsentativer Stichproben in Deutschland 1997*. Köln: Deutscher Ärzte Verlag; 1999.

144. Micheelis W, Schiffner, U. *Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Neue Ergebnisse zu oralen Erkrankungsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland 2005.* Vol 31: Deutscher Zahnärzte Verlag; 2006.

145. Miller WD. *Die Mikroorganismen der Mundhöhle*. 1 ed. ed. Leipzig: G. Thieme; 1892.

146. Moisset A, Schatz N, Lepoivre Y, et al. Conservation of salivary glycoprotein-interacting and human immunoglobulin G-cross-reactive domains of antigen I/II in oral streptococci. *Infect Immun.* Jan 1994;62(1):184-193.

147. Montgomery R, Conway, T. W., Spector, A. A. Biochemistry. A case-oriented approach. St. Louis, Missouri: The C. V. Mosby Company; 1990:314-322.

148. Montreuil J. Spatial conformation of glycans and glycoproteins. *Biol Cell.* 1984;51(2):115-131.

149. Munro GH, Evans P, Todryk S, Buckett P, Kelly CG, Lehner T. A protein fragment of streptococcal cell surface antigen I/II which prevents adhesion of Streptococcus mutans. *Infect Immun.* Nov 1993;61(11):4590-4598.

150. Mysore JV, Wigginton T, Simon PM, Zopf D, Heman-Ackah LM, Dubois A. Treatment of Helicobacter pylori infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound. *Gastroenterology.* Dec 1999;117(6):1316-1325.

151. Nagata K, Shibata, S. Inoshita, E. Tamagawa, H., Shizukuishi, E. Tsunemitsu, A. The effect of daily mouth rinsing with galactose on dental plaque formation. *J Dent Health.* 1982;32(4):104-107.

152. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Role of glucose side chains with serotype-specific polysaccharide in the cariogenicity of Streptococcus mutans. *Caries Res.* Jul-Aug 2005;39(4):262-268.

153. Navazesh M, Christensen C, Brightman V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *J Dent Res.* Jul 1992;71(7):1363-1369.

154. Neeser JR, Grafstrom RC, Woltz A, Brassart D, Fryder V, Guggenheim B. A 23 kDa membrane glycoprotein bearing NeuNAc alpha 2-3Gal beta 1-3GalNAc O-linked carbohydrate chains acts as a receptor for Streptococcus sanguis OMZ 9 on human buccal epithelial cells. *Glycobiology.* Feb 1995;5(1):97-104.

155. Newbrun E. Sugar and dental caries: a review of human studies. *Science.* 1982;217:418-423.

156. Newbrun E. Cariology 3rd ed. *Quintessenz, Chicago*; 1989.

157. Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res.* 1987;21(4):297-309.

158. Nikiforuk G. *Understanding Dental Caries.* Vol 1. Basel: Karger; 1985.

159. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res.* Oct 1987;95(5):369-380.

160. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* 1990;24(4):267-272.

161. Ofek I, Hasty DL, Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Oct 15 2003;38(3):181-191.

162. Ofek I, Mirelman D, Sharon N. Adherence of Escherichia coli to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature.* Feb 17 1977;265(5595):623-625.

163. Ofek I, Sharon N. Adhesins as lectins: specificity and role in infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;151:91-113.

164. Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, Hamada S, Koga T. Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c Streptococcus mutans, implicated in dental caries. *Mol Microbiol.* May 1989;3(5):673-678.

165. Ooshima T, Hashida T, Fuchihata H, Fujiwara T, Yoshida T, Izumitani A. Effect of experimental hyposalivation on the induction of dental caries in rats infected with Streptococcus mutans. *Caries Res.* 1990;24(6):446-451.

166. Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T, Kawabata S, Sobue S, Fujiwara T. Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of Streptococcus mutans. *J Dent Res.* Jul 2001;80(7):1672-1677.

167. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, et al. Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc.* Mar 1955;50(3):259-272.

168. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, et al. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res.* Apr 1954;33(2):147-174.

169. Perch B, Kjems E, Ravn T. Biochemical and serological properties of Streptococcus mutans from various human and animal sources. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol.* Jun 1974;82(3):357-370.

170. Porter JR. Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol Rev.* Jun 1976;40(2):260-269.

171. Pruitt KM, Adamson M. Enzyme activity of salivary lactoperoxidase adsorbed to human enamel. *Infect Immun.* Jul 1977;17(1):112-116.

172. Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch.* Vol 260. Auflage: Walter de Gruyter; 2004.

173. Quirynen M, Bollen CM. 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.* Jan 1995;22(1):1-14.

174. Rabilloud T, Carpentier G, Tarroux P. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis.* Jun 1988;9(6):288-291.

175. Ranke E, Ranke, B. Zum Problem der Kariesfreiheit bei schlechter Mundhygiene. *Dtsch Zahnärztl Zeitschr.* 1984;39:33.

176. Redinbaugh MG, Turley RB. Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal Biochem.* Mar 1986;153(2):267-271.

177. Rittman BR, Mackenzie IC, Rittman GA. Lectin binding to murine oral mucosa and skin. *Arch Oral Biol.* 1982;27(12):1013-1019.

178. Ritz HL. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch Oral Biol.* Dec 1967;12(12):1561-1568.

179. Roitt I, Lehner T. *Immunology of oral dieseases.* Vol 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1983.

180. Russell MW. Purification and properties of a protein surface antigen of Streptococcus mutants. *Microbios.* 1979;25(99):7-18.

181. Russell MW, Childers NK, Michalek SM, Smith DJ, Taubman MA. A Caries Vaccine? The state of the science of immunization against dental caries. *Caries Res.* May-Jun 2004;38(3):230-235.

182. Russell RR. Glucan-binding proteins of Streptococcus mutans serotype c. *J Gen Microbiol.* May 1979;112(1):197-201.

183. Sanderink R. Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie. *Quintessenz.* 2005;vol. 1.

184. Sato C, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. Identification of oligo-N-glycolylneuraminic acid residues in mammal-derived glycoproteins by a newly developed immunochemical reagent and biochemical methods. *J Biol Chem.* Jan 30 1998;273(5):2575-2582.

185. Scannapieco F. A. LMJ. Saliva and dental pellicles. In: Genco RJ GH, Cohen DW, ed. *Contemporary Periodontics*. St. Louis: Mosby; 1990.

186. Schauer R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology (Jena).* 2004;107(1):49-64.

187. Scheie AA, Eggen KH, Rolla G. Glucosyltransferase activity in human in vivo formed enamel pellicle and in whole saliva. *Scand J Dent Res.* Jun 1987;95(3):212-215.

188. Scheinin A, Makinen KK, Ylitalo K. Turku sugar studies. V. Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. *Acta Odontol Scand.* 1976;34(4):179-216.

189. Schlegel HG, Fuchs, G. *Allgemeine Mikrobiologie.* Vol 8. Stuttgart: Thieme; 2006.

190. Seemann R. *Antiadhäsive Speichelfaktoren und Kariesbefall zehnjähriger Kinder* [Zahnmedizinische Dissertation]. Berlin: Abteilung für Zahnerhaltung & Präventivzahnmedizin, Zentrum für Zahnmedizin - Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität; 1996.

191. Seemann R. Ist Karies erblich? *Prophylaxe Impuls.* 1997;1:19-27.

192. Seemann R. Plaque. In: Roulet JF, Zimmer S, eds. *Prophylaxe und Präventivzahnmedizin*. Stuttgart: Thieme Verlag; 2002:34-38.

193. Seemann R, Kluck I, Kage A. An in vitro microbial-based model for studying caries-preventive agents. *Acta Odontol Scand.* Feb 2006;64(1):27-30.

194. Seemann R, Zimmer S, Bizhang M, Kage A. Differences in the salivary glycan pattern between children with high and low caries susceptibility. *Caries Res.* Mar-Apr 2001;35(2):156-161.

195. Sharon N. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Lett.* Jun 15 1987;217(2):145-157.

196. Sharon N, Eshdat Y, Silverblatt FJ, Ofek I. Bacterial adherence to cell surface sugars. *Ciba Found Symp.* 1981;80:119-141.

197. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* Nov 2004;14(11):53R-62R.

198. Sheiham A. Dietary effects on dental diseases. *Public Health Nutr.* Apr 2001;4(2B):569-591.

199. Shklair IL, Keene HJ. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of Streptococcus mutans. *Arch Oral Biol.* Nov 1974;19(11):1079-1081.

200. Sims W. Taxonomy of streptococcus mutans. In: Hamada S, Michalek, S. M., Kiyono, H., Menaker, L., McGhee, J. R., ed. *Microbiology and Immunology of Streptococcus mutans*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1961:21-24.

201. Slomiany BL, Murty VL, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdzinski K, Mandel ID. Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. *Arch Oral Biol.* 1986;31(3):187-191.

202. Smith DJ, King WF, Barnes LA, Trantolo D, Wise DL, Taubman MA. Facilitated intranasal induction of mucosal and systemic immunity to mutans streptococcal glucosyltransferase peptide vaccines. *Infect Immun.* Aug 2001;69(8):4767-4773.

203. Smith DJ, King WF, Wu CD, Shen BI, Taubman MA. Structural and antigenic characteristics of Streptococcus sobrinus glucan binding proteins. *Infect Immun.* Nov 1998;66(11):5565-5569.

204. Smith DJ, Taubman MA. Effect of local deposition of antigen on salivary immune responses and reaccumulation of mutans streptococci. *J Clin Immunol.* Sep 1990;10(5):273-281.

205. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Oct 1985;150(1):76-85.

206. Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC, Bortnick L, Rosenthal E, Macdonald JB. The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch Oral Biol.* May-Jun 1963;8:275-280.

207. Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, van Houte J. Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontal Res.* Mar 1977;12(2):90-106.

208. Sønju T, Glantz P. Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. *Arch Oral Biol.* 1975;20:687-691.

209. Staat RH, Peyton JC. Adherence of oral streptococci: evidence for nonspecific adsorption to saliva-coated hydroxylapatite surfaces. *Infect Immun.* Jun 1984;44(3):653-659.

210. Steinberg D, Feldman M, Ofek I, Weiss EI. Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. *J Antimicrob Chemother.* Jul 2004;54(1):86-89.

211. Steinberg D, Kopec LK, Bowen WH. Adhesion of actinomyces isolates to experimental pellicles. *J Dent Res.* Jun 1993;72(6):1015-1020.

212. Stephan RM. Effects of different types of human foods on dental health in experimental animals. *J Dent Res.* Sep-Oct 1966;45(5):1551-1561.

213. Svanborg Edén C. A, B., Aniansson, G., Lindstedt, R., deMan, P., Nielsen, A., Leffler, H., Wold, A. Inhibition of bacterial attachment: Examples from the urinary and respiratory tracts. *Current Topics in Microbiol and Immunol.* 1990;151:167-184.

214. Takahashi Y, Ruhl S, Yoon JW, Sandberg AL, Cisar JO. Adhesion of viridans group streptococci to sialic acid-, galactose- and N-acetylgalactosamine-containing receptors. *Oral Microbiol Immunol.* Aug 2002;17(4):257-262.

215. Tamesada M, Kawabata S, Bian Z, Fujiwara T, Kimura S, Hamada S. Modification of sucrose dependent cell adherence by deletion and reintroduction of the gtf genes in Streptococcus mutans. *Adv Exp Med Biol.* 1997;418:665-668.

216. Tanzer JM, Fisher, J. Competition of a Rough Non-cariogenic Streptococcus salivarius-like Strain with Streptococcus mutans in Dental Plaque. In: Christiansen SEHaP, ed. *Basic Concepts of Streptococci and Streptococcal Diseases*. Chertsey, England: Reedbooks; 1982:124-125.

217. Tanzer JM, Krichevsky MI, Keyes PH. The metabolic fate of glucose catabolized by a washed stationary phase caries-conducive streptococcus. *Caries Res.* 1969;3(2):167-177.

218. Taubman MA, Nash DA. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. *Nat Rev Immunol.* Jul 2006;6(7):555-563.

219. Ten Cate JM, Duijsters PP. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. *Caries Res.* 1983;17(3):193-199.

220. Theilade E, Theilade J, Mikkelsen L. Microbiological studies on early dento-gingival plaque on teeth and Mylar strips in humans. *J Periodontal Res.* Jan 1982;17(1):12-25.

221. Thomas EL, Milligan TW, Joyner RE, Jefferson MM. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infect Immun.* Feb 1994;62(2):529-535.

222. Tolson ND, Daley TD, Wysocki GP. Lectin probes of glycoconjugates in human salivary glands: 1. *J Oral Pathol.* Aug 1985;14(7):523-530.

223. Tomasi TB, Jr., Bienenstock J. Secretory immunoglobulins. *Adv Immunol.* 1968;9:1-96.

224. Turner A, Chen SN, Joike MK, Pendland SL, Pauli GF, Farnsworth NR. Inhibition of uropathogenic Escherichia coli by cranberry juice: a new antiadherence assay. *J Agric Food Chem.* Nov 16 2005;53(23):8940-8947.

225. Uhlenbruck G, Gross R, Koch OM, Lee CK. Die Bedeutung von Lektinen für den Adhäsionsmechanismus von Bakterien. *Deutsches Ärzteblatt.* 1983;80(5):27-32.

226. Uhlenbruck G, Klein PJ. Die praktische Bedeutung von Lektinen. *Sonderdruck Deutsches Ärzteblatt - Ärztliche Mitteilungen.* 1984;4:1-2.

227. Van Houte J, Gibbons RJ, Banghart SB. Adherence as a determinant of the presence of Streptococcus salivarius and Streptococcus sanguis on the human tooth surface. *Arch Oral Biol.* Nov 1970;15(11):1025-1034.

228. van Leeuwenhoek A. Microscopial observations of the structure of teeth and other bones: Made and communicated, in a letter by Mr. Anthony Leeuwenhoek. *Philosoph Transact.* 1687;140(1002).

229. Weiss EI, Kozlovsky A, Steinberg D, et al. A high molecular mass cranberry constituent reduces mutans streptococci level in saliva and inhibits in vitro adhesion to hydroxyapatite. *FEMS Microbiol Lett.* Mar 12 2004;232(1):89-92.

230. Weiss EL, Lev-Dor R, Sharon N, Ofek I. Inhibitory effect of a high-molecular-weight constituent of cranberry on adhesion of oral bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002;42(3 Suppl):285-292.

231. Westermeier R. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations.* Vol 4th, Revised and Uptated Edition Wiley; 2004.

232. Whelton H. Introduction: The Anatomy and Physiologie of Salivary Glands. In: W. M. Edgar DMOM, ed. *Saliva and oral health*. 2nd ed. ed. London, Great Britain: Brit Dent J; 1996:1-8.

233. Whiley RA, Russell RRB, Hardie JM, Beighton D. Streptococcus downei sp. nov. for strains previously described as Streptococcus mutans serotype h. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988;38:25-29.

234. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:513-552.

235. Wu AM, Song SC, Tsai MS, Herp A. A guide to the carbohydrate specificities of applied lectins-2 (updated in 2000). *Adv Exp Med Biol.* 2001;491:551-585.

236. Yamanaka A, Kimizuka R, Kato T, Okuda K. Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol.* Jun 2004;19(3):150-154.

237. Zero DT. Sugars - the arch criminal? *Caries Res.* May-Jun 2004;38(3):277-285.

238. Zinkernagel RM. Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. *Semin Immunol.* Jun 2000;12(3):163-171; discussion 257-344.

9 ANHANG

9.1 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

A.	*Actinobacillus*
AAA	*Anguilla anguilla* Agglutinin
Ag I/II	Antigen I/II
Asn	Asparagin
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
ConA	Concanavalin A
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
dmfs	*decayed missing filled surfaces* im Milchgebiss
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*deoxyribonucleic acid*
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E.	*Escherichia*
ECL	*Enhanced Chemo-Luminescence*
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assay*
EPS	Extrazelluläre Polysaccharide
Fuc	Fukose
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
GBP1-5	*glucan binding protein 1-5* von *S. sobrinus*
GbpA-D	*glucan binding protein A-D* von *S. mutans*
GFTB-D	Glukosyltransferasen B-D
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
GNA	*Galanthus nivalis* Agglutinin

HL-Antigen	humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
MALDI-TOF	*matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight*
MALT	*mucosa associated lymphoid tissue*
Man	Mannose
MG1	*high-molecular-weight mucin glycoprotein*
MG2	*low-molecular-weight mucin glycoprotein*
MRT	Magnetresonanztomographie
NDM	*high-molecular-weight non-dialysable material*
Neutravidin-POD	Neutravidin-Peroxidase
NMR	*nuclear magnetic resonance*
OD	optische Dichte
PES	Polyethersulfon
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNA	Peanut Agglutinin
PRP	*proline rich protein*
PVDF	Polyvinyldifluorid
RNA	*ribonucleic acid*
S.	*Streptococcus*
SDS-PAGE	Sodium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SELDI-TOF	*surface-enhanced laser desorption ionisation - time of flight*
Ser	Serin
S-HA	*saliva-coated hydroxyapatite*
s-IgA	sekretorisches Immunglobulin A
SNA	*Sambucus nigra* Agglutinin
STAMPs	*specifically/selecively targeted antimicrobial peptides*
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimide
Thr	Threonin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
WHO	World Health Organisation

9.2 DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *PD Dr. Rainer Seemann* für die Überlassung des äußerst interessanten Dissertationsthemas und die intensive Unterstützung von Beginn der Vorbereitungen bis zur Vollendung dieser Arbeit. Ich danke ihm für sein Vertrauen sowie für die Kontaktherstellung zu seinem damaligen Doktorvater *PD Dr. Andreas Kage*.

Ihm möchte ich für die wissenschaftliche Betreuung und seine stete Begeisterungsfähigkeit bei der Durchführung dieser Arbeit danken. Seine Fachkompetenz sowie seine wertvollen Anregungen während der gesamten Zeit haben diese Arbeit wesentlich bereichert.

Ich danke *Kathleen Grüttner* für ihre engagierte Unterstützung bei der Einarbeitung und Durchführung der labortechnischen Arbeiten, für ihre konstruktive Kritik sowie für die jederzeit gewährte Hilfestellung bei der Interpretation meiner Ergebnisse.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die kreative und von nicht selbstverständlichem Einsatz geprägte Zusammenarbeit bedanken. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme, die Möglichkeit der Nutzung der wissenschaftlichen Laboratorien und die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Herrn *Dr. Thomas Kersten* für seine liebenswerte und zuverlässige Unterstützung beim Kultivieren der Mikroorganismen. Frau *Vera Kanitz* aus der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin der Charité möchte ich für die freundliche Überlassung ihrer Laborräume im Rahmen der Keimanzucht danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund *Fabian Amos* für die Geduld und das Verständnis danken mit denen er mich beim Erstellen der Arbeit begleitet und unterstützt hat. Vielen Dank für das gewissenhafte und mühevolle Korrekturlesen sowie für die Beantwortung all meiner computer-technischen Fragen.

Für die motivierenden Worte zwischendurch und das rege Interesse am Fortgang meiner Arbeit danke ich all meinen Freunden sowie meiner gesamten Familie.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium und die Dissertation ermöglicht haben und mir stets die Kraft geben, jedes Ziel erreichen zu können.

9.3 CURRICULUM VITAE

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

Berlin, den 18. November 2009

9.4 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Viviane Schüler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *„Glykanbindungsspezifität von Lektinen kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 18. November 2009

Viviane Schüler