

**Wirkung von Antikörperfragmenten (Diabodies)
auf das
Agglutinationsverhalten von Streptococcus mutans**

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

Dorit Hofmann
aus Köln

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Frentzen
2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Kistemann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. September 2010

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und präventive Zahnheilkunde
Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. Dr. S. Jepsen

Für meine Eltern und Dominique

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1 Einführung	8
1.2 Rolle von Streptococcus mutans bei der Kariesentstehung	8
1.3 Dentale Plaque als mikrobieller Biofilm	9
1.3.1 Plaque	10
1.3.2 Wachstumsmechanismen	12
1.3.3 Eigenschaften	16
1.4 Präventionsstrategien	18
1.4.1 Einführung	18
1.4.2 Mechanische Maßnahmen	19
1.4.3 Chemische Maßnahmen	19
1.4.3.1 Fluoride	19
1.4.3.2 Chlorhexidin	21
1.4.4 Antimikrobielle fotochemische Therapie	22
1.4.5 Immunisierung gegen Karies und Replacement-Theorie	24
1.4.5.1 Replacement-Theorie	25
1.4.5.2 Aktive Immunisierung	26
1.4.5.3 Mukosale Immunisierung	26

1.4.5.4	Lokale passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern	29
1.4.5.4.1	Biotechnologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper	29
1.4.5.4.2	Wirkungsmechanismus	31
1.5	Ziel der Arbeit	33
2.	Material und Methode	34
2.1	Versuchsvorbereitung	34
2.2	Versuche	40
2.3	Datenauswertung und Statistik	43
3.	Ergebnisse	45
3.1	Nachweis der Agglutination	45
3.2	Vergleich Dialyse vs. Präzipitat	50
3.3	Vergleich humaner Antikörper vs. Maus-Antikörper	55
3.4	Bewertung der REM-Aufnahmen	60
4.	Diskussion	61
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	67
7.	Danksagung	81
8.	Lebenslauf	82

Abkürzungsverzeichnis

A. naeslundii	Actinomyces naeslundii
aPDT	antimikrobielle photodynamische Therapie
Ca	Calcium
CaF ₂	Calciumfluorid
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CSP	Competence Stimulating Peptid
X	Chi
dia	Dialyse
dia / hu	humaner Diabody
dia / m	muriner Diabody
ELISA	Enzyme- linked Immuno-sorbent Assay
Fab	Fragment antigen binding
GTF	Glykosyltransferase
IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M
kDA	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
MG	Molekulargewicht
µl	Mikroliter
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ PO ₃ F	Sodiumfluorophosphat
p	Signifikanzniveau
PPP	Primary Pellicle Precursors
pret	Präzipitat
PRP	Prolin-reiche Proteine
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
SA I/II	Surface Antigen I/II
scFv	single chain fragment variable
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
S.m.	Streptococcus mutans
SnF	Zinnfluorid

1. Einleitung

1.1 Einführung

Obwohl die Kariesprophylaxe im Laufe der letzten Jahre einen immer größeren Stellenwert in der Zahnheilkunde hat, stellt Karies noch immer die häufigste Erkrankung der Zahnhartsubstanzen dar. Wissenschaftliche Forschungen zu diesem Thema basieren dabei auf der bereits 1899 von Miller erstmals vorgestellten chemoparasitären Theorie, nach der kariogene Mikroorganismen der Mundhöhle (Plaque) bei einem Überangebot von kariogenem Substrat (speziell niedermolekulare Kohlenhydrate) organische Säuren produzieren. Wirken diese lange genug auf die Zahnhartsubstanzen ein, so entmineralisieren sie diese (Miller, 1899).

Heute weiß man aber, dass die Entstehung von Karies ein multifaktoriell bedingtes Geschehen ist und mehrere Aspekte für den Krankheitsverlauf bzw. die eigentliche Erkrankung eine Rolle spielen. Vergleichbar mit Krankheiten wie z.B. Krebs, Diabetes oder Erkrankungen des kardiovaskulären Systems haben die genetische Disposition, Umwelteinflüsse sowie persönliche Verhaltensweisen darauf einen entscheidenden Einfluss.

1.2 Rolle von Streptococcus mutans bei der Kariesentstehung

Streptococcus mutans (S.m.) spielt aufgrund seiner Stoffwechsellistung bei der Kariesentstehung nach wie vor eine wichtige Rolle. Krasse hat 1986 hierzu folgende Thesen aufgestellt:

1. S.m. induziert im Tierversuch Karies.
2. Es besteht eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von S.m. im Speichel und in der Plaque und dem Auftreten von Karies.
3. Die Besiedelung der Zahnoberfläche mit S.m. geht zumeist der Entwicklung einer Karies voraus und ist auf kariös demineralisierten Zahnflächen höher als auf gesunden Zahnflächen.
4. Bei Patienten mit hoher Kariesprävalenz sind mehr Zahnflächen mit S.m. besiedelt als bei Patienten mit niedriger Prävalenz.

5. Gegen S.m. gerichtete antimikrobielle Maßnahmen reduzieren die Inzidenz der Karies drastisch (Krasse, 1996).

Doch als Folge wissenschaftlicher Studien scheint sich dieses Bild in gewisser Weise zu verändern. Demzufolge gilt nicht alleine die Anwesenheit von S.m. als Ursache für die Entstehung von Karies, sondern ist diese komplexe Erkrankung vielmehr zurückzuführen auf das vorhandene Ungleichgewicht, das zwischen der Zahnoberfläche und dem Biofilm herrscht (Fejerskov und Nyvad, 2003). Signifikante Faktoren für die Homöostase im Biofilm sind pH-Wert, Redoxpotential und das Angebot an Nährstoffen.

Die Störung der Homöostase innerhalb der oralen Mikroflora verhält sich hierbei zugunsten von S.m., so dass man von einer opportunistischen Infektion sprechen kann. Diese Infektion ist auf Mikroorganismen zurückzuführen, die endogenen Ursprungs sind, also nicht von außen in den Organismus gelangen.

Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass zwischen S.m. und der Karies kein absolutes Verhältnis besteht. So kann sich selbst eine hohe Anzahl von S.m. auf der Zahnoberfläche befinden, ohne dass Karies entsteht (Marsh und Martin, 1992). Die Komposition von Biofilmen in Bezug auf Anzahl und Vorkommen einer bestimmten Spezies ist abhängig von den vorherrschenden Wachstumsbedingungen. Diese scheinen schließlich darüber zu entscheiden, ob es zu einer Erkrankung oder Nichterkrankung des Wirtes kommt. P.D. Marsh nennt dies die ökologische Plaque-Hypothese (Marsh, 1994).

1.3 Dentale Plaque als mikrobieller Biofilm

In der Mundhöhle stellt sich Plaque in Form eines Biofilms dar. Der Begriff der Plaque ist fokussiert auf den mikrobiellen Belag, der sich auf den Zahnoberflächen entwickelt. Definiert ist Plaque als festhaftender, histologisch strukturierter Zahnbelag von lebenden und toten Mikroorganismen in einer polysaccharid- und glykoproteinreichen Matrix, die das Produkt mikrobieller Stoffwechselaktivität und Vermehrung darstellt (Plagmann, 1998).

Die dentale Plaque umfasst mehr als 500 verschiedene Spezies von Mikroorganismen. Bakterienzellen stellen dabei etwa 15-20% des Volumens der Plaque dar, die restlichen 75-80% werden von der Glykokalix-Matrix eingenommen. In die dreidimensionale Struk-

tur der Plaque eingegliedert sind Wasserkanäle, die Transportwege sowohl für Nährstoffe für Bakterien in tiefer gelegenen Schichten darstellen, als auch für metabolische Abfallprodukte, die in umgekehrter Richtung das System verlassen können (Marsh, 2005).

Spricht man von einem oralen Biofilm, so wird berücksichtigt, dass sich mikrobielle Gemeinschaften auf sämtlichen Oberflächen innerhalb der Mundhöhle, so auch auf der Wangenschleimhaut entwickeln können. Die Bildung eines Biofilms hat für die darin enthaltenen Mikroorganismen viele Vorteile, auf die später noch genauer eingegangen wird. Charakteristisch dafür ist eine Verschiedenartigkeit der vorkommenden Mikroorganismen, die die Voraussetzung für ein vorteilhaftes Zusammenleben darstellt (Babaahmady et al., 1997, Bowden und Hamilton, 1998, Frandsen et al., 1991, Socransky et al., 1998).

In einem Biofilm organisiert, leben Bakterienpopulationen quasi in einem Übergangsbereich, der zwischen einer festen und flüssigen Phase liegt, wobei sie Eigenschaften ausbilden, die sie beim Leben in einer wässrigen Kultur nicht besitzen (Costerton et al., 1995).

1.3.1 Plaque

Vor der Entwicklung von Plaque steht die Bildung des Pellikels. Dies ist beschrieben als ein homogener, azellulärer, bakterienfreier, proteinhaltiger Film, der die Zahnoberfläche bedeckt. Heute sind viele Bestandteile des Pellikels, hauptsächlich Proteine, identifiziert. Sie haben ihren Ursprung im Speichel, aus dem sie adsorbiert werden (Lendenmann et al., 2000).

Speichel besteht zum einen aus organischen Bestandteilen wie Ammoniak, Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Cholesterol und cAMP, sowie zum anderen aus den anorganischen Bestandteilen Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat, Chlorid, Fluorid, sowie Thiocyanid (Jenkins, 1978).

Die Zusammensetzung des Speichels variiert dabei abhängig davon, in welcher Speicheldrüse er gebildet wurde. Analog dazu ist auch das entstehende Pellikel in seiner inhaltlichen Zusammensetzung unterschiedlich, je nachdem in der Nähe von welcher Speicheldrüse es gebildet wurde (Listgarden, 1976).

Das Verhältnis von Speichel zu dentaler Plaque wird von Rudney als multifaktoriell, bzw. amphifunktionell beschrieben (Rudney, 2000). So findet durch den Speichel, die dentale Plaque betreffend, nämlich auch eine negative Selektion statt, da sich in ihm auch Proteine mit bakterizider, bakteriostatischer oder hemmender Aktivität befinden. Man zählt dazu z.B. Lysozyme, Lactoferrin, Peroxidase, Cystatin und s-IgA (Rudney, 1995).

Diese bewirken die Beschädigung von Membranen oder sogar die Lyse von Zellwänden, außerdem kann Eisen als Nährstoff zurückgehalten werden. Oxygenierende Moleküle wie Hypothiocyanit und Hypochlorid sind in der Lage, extra- und intrazelluläre Proteine zu zerstören. Ebenso werden Enzyme, die die Bereitstellung von Nährstoffen fördern, gehemmt. Für die Ausbildung eines Pellikels als Voraussetzung mikrobieller Kolonisation ist jedoch die Funktion der positiven Selektion von entscheidender Bedeutung. So ist der Speichel im ersten Stadium der Kolonisation für die Bereitstellung der Liganden für die jeweiligen Mikroorganismen zuständig und im weiteren Wachstum der Plaque bietet der Speichel Nährstoffe für die Katabolisierung.

Die Anheftung des Pellikels an die Zahnoberfläche beruht auf der elektrostatischen Anziehung zwischen negativ geladenen Phosphoproteinen des Speichels und positiv geladenen Ca-Ionen des Hydroxyapatits des Zahnschmelzes. Proteine des Speichels, die eine ungewöhnlich hohe Affinität zum Schmelz besitzen, werden PPPs (Primary Pellicle Precursors) genannt (Yao et al., 1999). Dabei handelt es sich um Prolin-reiche Proteine (PRPs), wozu Statherin und Histatin gehören. Neben den PRPs lassen sich hauptsächlich s-IgA, Muzin, Laktoferrin, Lysozym, Amylase, Karboanhydrase, Albumin IgM, IgG und Komplement C2 / C3 im Pellikel nachweisen.

Das Speichelprotein Muzin ist ein Glykoprotein, das einen Kohlenhydratanteil von 30-90% besitzt. Dementsprechend unterscheidet man zwischen MG1, einem Muzin mit niedrigem Molekulargewicht, und MG2, einem Muzin mit hohem Molekulargewicht. Das Verhältnis von MG1 zu MG2 im Pellikel beträgt circa 70:30. Muzin besitzt eine hohe Affinität zum Schmelz und es spielt bei der Adhäsion von Mikroorganismen eine wichtige Rolle (Zalewska et al., 2000, Slomiany et al., 1996, Levine, 1985).

Das Pellikel bildet sich innerhalb weniger Sekunden nach dem Zahndurchbruch, bzw. nach der Reinigung oder Politur der Zahnoberfläche (Al Hashimi und Levine, 1989). Es erreicht eine Schichtdicke von 1-3 μm . Die Bildung des Pellikels verläuft in zwei

Schritten. Zunächst kommt es zur Absorption vereinzelter Proteine aus dem Speichel. Dies führt nur zu einer geringen Dickenzunahme. In der daran anschließenden Phase kommt es zur Anlagerung größerer Proteinaggregate. Diese werden aufgrund ihrer Form SMGs (Micelle like Globules) genannt, da die einzelnen Proteine Micellen förmig zu Aggregaten zusammengefügt sind. Durch die Anlagerung dieser Aggregate ist eine erhebliche Dickenzunahme des Pellikes erkennbar (Young et al., 1999). Die Ausbildung eines Pellikels dient dem Zahnschmelz als Schutz, einerseits gegen Abrieb, andererseits gegen Demineralisation, da durch die Semipermeabilität des Pellikels die Remineralisation des Schmelzes gefördert wird. Für die Plaquebildung ist das Pellikel von entscheidender Bedeutung, da es das Muster der initialen mikrobiellen Kolonisation, bzw. der Primärkolonisation beeinflusst, welche den ersten Schritt in der Plaquebildung darstellt.

Die Mikroorganismen, die sich zuerst an das Pellikel anheften werden Primärkolonisatoren genannt. Dies geschieht bereits nach etwa 4 Stunden. Es handelt sich dabei um grampositive, aerobe Kokken (*S.sanguis*, *S.mitis*, *S.oralis*) (Nyvad und Kilian, 1987). Etwas später in diesem Stadium kommt es zur Adhäsion eines großen Volumens von Aktinomyzeten (Rosan und Lamont, 2000). *S.m.* zählt nicht zu den Primärkolonisatoren auf der Zahnoberfläche (Nyvad und Kilian, 1990).

Im Verlauf der Plaqueentwicklung lagern sich weitere Streptokokken, Aktinomyzeten, Veillonellen und Fusobakterien an. Ist die Plaque 7-10 Tage alt, so überwiegen Stäbchen und Filamente. Je älter die Plaque wird, desto mehr gewinnt sie einen anaeroben Charakter. Damit verbunden steigt auch ihre Pathogenität.

1.3.2 Wachstumsmechanismen

Am Anfang der Plaqueentwicklung stehen physikochemische Interaktionen zwischen der Zelloberfläche der Mikroorganismen und der Pellikel bedeckten Zahnoberfläche im Vordergrund. Diese Interaktionen sind nur schwach und die Adhäsion ist reversibel (Busscher und van der Mei, 1997). Später entstehende Interaktionen zwischen spezifischen Molekülen auf der Bakterienzelloberfläche, so genannten Adhesinen, und dazu komplementären Rezeptoren auf der Pellikeloberfläche stellen eine irreversible Verbindung dar (Jenkinson und Lamont, 1997). Adhesine können entweder Oberflächenproteine sein, oder sie sind mit den Fimbrien verknüpft.

Dabei ist zu beachten, dass Bakterien einer bestimmten Spezies mehr als nur eine Sorte von Adhesinen auf ihrer Zelloberfläche besitzen und somit an multiplen Interaktionen partizipieren können. Dabei kommen diese Verbindungen nicht nur zwischen Bakterium und Wirt vor, sondern auch zwischen verschiedenen Bakterien. Man spricht dabei von Cohäsion. So kommt es zur Cohäsion von späteren Kolonisatoren mit Mikroorganismen, die bereits mit dem Pellikel verbunden sind, da die Affinität späterer Kolonisatoren zu Primärkolonisatoren größer ist als die Affinität zum Pellikel. Dies führt zu einem Anstieg der Verschiedenartigkeit innerhalb des Biofilms und zur Ausbildung ungewöhnlicher morphologischer Strukturen wie Maiskolben und Rosetten (Kolenbrander et al., 2000). Gleichzeitig fördert die Cohäsion die funktionelle Organisation der Plaque und ermöglicht beispielsweise obligat anaerob lebenden Mikroorganismen das Überleben in einer aeroben Umgebung (Bradshaw et al., 1998).

Adhesine sind Proteine, die sich auf der Zelloberfläche des Mikroorganismus befinden oder mit den Fimbrien verbunden sind. Ihre Größe beträgt zwischen 35-380 kDa. Adhesine, die in der Vergangenheit besonders gut charakterisiert worden sind, gehören zur Gruppe der SA I/II (Surface Antigen I/II) (Bleiweis et al., 1992, Jenkinson und Lamont, 1997, Russell, 1992, Wizemann et al., 1999). Es sind relativ kleine Moleküle, die aus circa 1500-1566 Aminosäureresten bestehen und eine Größe von 165-210 kDa besitzen. Man findet diese Adhesine z.B. bei *S.mutans*, *S.sobrinus*, *S.gordonii*, *S.oralis* und *S.intermedius*. SA I/II ist in der Lage, Verbindungen mit Rezeptoren einzugehen, die sich im Speichel befinden, so z.B. Agglutinine, Glykoproteine, PRPs und Kollagen. SA I/II bewirkt auch die Coaggregation mit Mikroorganismen wie *A.naeslundii* und *P.gingivalis* (Jenkinson und Lamont, 1997, Rosan und Lamont, 2000).

Generell kann man sagen, dass frühe Kolonisatoren sowohl untereinander als auch mit Fusobakterien koaggregieren, wohingegen spätere Kolonisatoren, z.B. *Prevotella intermedia* und *Porphyromonas gingivalis*, eher die Tendenz haben, mit Fusobakterien zu koaggregieren, als untereinander. Fusobakterien sind schließlich in der Lage mit allen humanen oralen Mikroorganismen Koaggregationen zu bilden (Kolenbrander et al., 1989). Streptokokken spielen eine wichtige Rolle bei der Plaqueentwicklung, da *S.mitis*, *S.oralis* und *S.sanguis*, wie bereits erwähnt, zu den Primärkolonisatoren zählen und somit einen ersten Verbund zwischen den Mikroorganismen und dem Wirt darstellen. Sie nutzen dabei Muzine, PRPs, Prolin-reiche Peptide und α -Amylase als Rezeptoren.

S.m., der zwar nicht zu den Primärkolonisatoren gehört, trägt ebenfalls einen wichtigen Beitrag zu der späteren Plaqueentwicklung bei. Für ihn ist vor allem α -Amylase von entscheidender Bedeutung für die Bindung zum Pellikel. Auf der Bakterienoberfläche finden sich haarartige Anhängsel, die proteinreich sind. Sie werden Fimbrien genannt, ihre Proteinuntereinheiten heißen dementsprechend Fimbrillen. Außer S.mutans sind auch S.mitis, S.salivarius, S.parasanguis, A.naeslundii und P.gingivalis im Besitz dieser Fimbrien (Socransky und Hafajee, 2000). Rezeptoren für Typ-1-Fimbrien stellen Statherin und PRPs dar. S.m. herausragende Rolle bei der Kariesentstehung ist in seiner Stoffwechsellleistung begründet. S.m. sezerniert Glucosyltransferase (GTF), ein Enzym, dass Glukan aus Sucrose generiert. GTF und Glukan sind gleichzeitig Teil des Pellikels und Glukan stellt eine spezifische Verbindungsmöglichkeit für S.m. und andere Mikroorganismen dar. Extrazelluläre Polysaccharide, die aus Sucrose gebildet werden, fördern die Cohäsion zwischen verschiedenen Arten von S.m., S.oralis und Neisseria pharynges. Coaggregation zwischen Aktinomyzes und S.m. wird auch durch Dextrane bewirkt.

Die Polymerproduktion lässt eine komplexe extrazelluläre Matrix entstehen, deren Bestandteil lösliche und unlösliche Glukane, Fruktane und anderen Heteropolymere sind. Diese Matrix kann biologisch aktiv werden, indem Nährstoffe, Wasser und Enzyme innerhalb des Biofilms zurückgehalten werden (Allison, 2003). Zellteilung führt außerdem zu einem laufenden Wachstum des dreidimensionalen, aus verschiedenen Bakterienspezies bestehenden Biofilms.

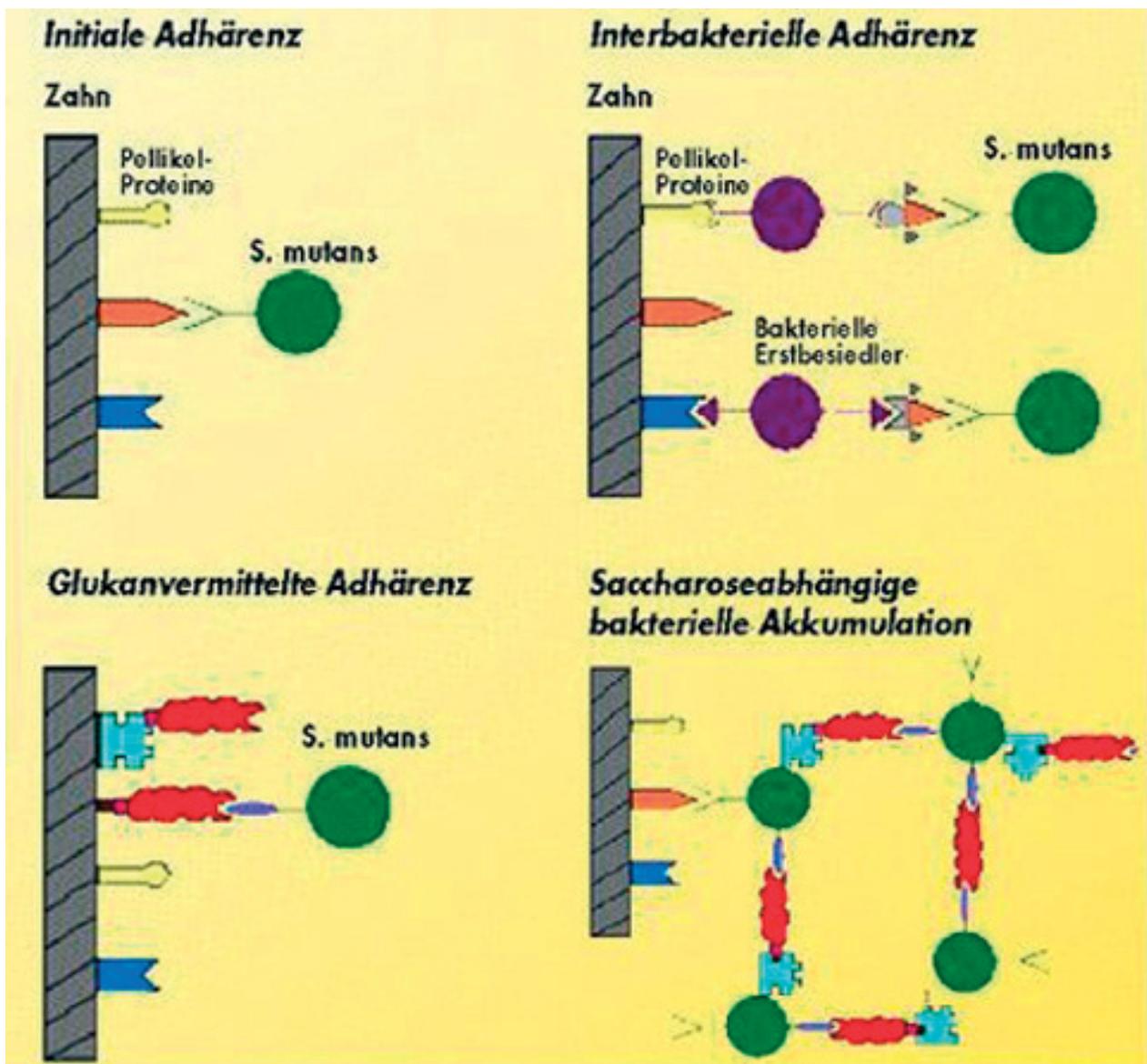


Abb. 1: Kolonisation der Zahnoberfläche durch *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). *S. mutans* Bakterien können über Oberflächenproteine (Adhäsine) an spezifischen Komponenten (Rezeptoren) der Pellikelschicht adhären. Ein charakteristisches Adhäsine von *S. mutans* ist das Oberflächenantigen SA I/II. Die Adhärenz von *S. mutans* an der Zahnoberfläche ist auch über glukanbindende Proteine denkbar. Ebenso besteht die Möglichkeit der interbakteriellen Anhaftung an bereits adhärenen Bakterien („Erstbesiedler“ der Zahnoberfläche: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*). Die Akkumulation von *S. mutans* an der Zahnoberfläche als Voraussetzung für die Entstehung eines pathogenen Biofilms erfordert die Zufuhr des Substrates Saccharose, um über bakterielle Glykosyltransferasen extrazelluläre Glukanpolymere zu bilden. Diese Glukanpolymere dienen zum einen als Energiedepot und regulieren zum anderen die Permeabilität des Biofilms. Alle dargestellten Möglichkeiten und Phasen der Besiedelung der Zahnoberfläche durch *S. mutans* können durch spezifische Antikörper inhibiert werden, die gegen Glykosyltransferasen oder bakterielle Oberflächenproteine gerichtet sind (aus: Hannig, 2004).



1.3.3 Eigenschaften

Wie bereits erwähnt, bietet die Tatsache, dass dentale Plaque in Form eines Biofilms organisiert ist, den darin lebenden Möglichkeiten und Vorteile, die bei einem Leben z.B. in einer Flüssigkultur nicht hätten. Der Biofilm bietet den kolonisierenden Mikroorganismen dabei Schutz vor konkurrierenden Bakterien und Umwelteinflüssen von außen, wie z.B. der Immunabwehr des Wirts und toxischen Substanzen. Die Möglichkeit einer Infektion durch eine exogene, pathogene Art wird reduziert, da die etablierte Mikroflora wie eine Barriere wirkt. Man nennt dies Kolonisations-Resistenz (McFarland, 2000).

Der Biofilm ist gekennzeichnet durch seine offene Architektur mit Kanälen, die von der Außenseite der Plaque zur Schmelzoberfläche führen (Wood et al., 2000). Diese offene Architektur kombiniert mit der Synthese extrazellulärer Matrix, bestehend aus einer Reihe von Exopolymeren, schafft eine komplexe Umwelt, in der das Eindringen und die Verteilung von Molekülen voraussagbar sind. Die Größe der Moleküle stellt dabei einen limitierenden Faktor für das Eindringen dar. So sind beispielsweise Dextrane in einer Größenordnung >10 kDa nicht in der Lage, einfach durch die Schicht der extrazellulären Polysaccharide zu diffundieren, sondern sie müssen sich vielmehr einen Weg zwischen den Mikrokolonien suchen. Im Gegensatz dazu sind 3 kDa große Dextrane zur Diffusion in der Lage. Dies erklärt das geringere kariogene Potential von Stärke im Verhältnis zu Sacchariden mit einem kleineren Molekulargewicht (Guggenheim et al., 2004). Ebenso bietet der Biofilm eine erhöhte Pufferkapazität, die dem Angriff saurer Substanzen entgegenwirkt. Die hydrophobe Oberfläche und die Präsenz von Exopolymeren in der Biofilm-Matrix ermöglichen den eingeschränkten Transport der polaren Säuren und erreichen das Entfernen der stark geladenen Moleküle aus dieser Lösung (Li et al., 2002). Die strukturelle Heterogenität und die Anwesenheit anaerober Nischen innerhalb des generell aeroben Biofilms reduzieren zudem die Effizienz selektiver antimikrobieller Agenzien.

Bakterien des Biofilms besitzen die Möglichkeit, sich wechselnden Umwelteinflüssen anzupassen. Dies beruht auf der Flexibilität der Struktur und der Physiologie der Zellen, welche in der Lage ist, sich z.B. auf Veränderungen der Temperatur und des pH-Werts einzustellen und einen Mangel an zugefügten Nährstoffen zu überbrücken (Allison, 2003). Bakterien in Biofilmen weisen einen Phänotyp auf, der sich von dem der planktonisch lebender Bakterien unterscheidet. Durch die Anlagerung von Bakterien an spezielle Re-

zeptoren kann eine signifikante Veränderung des Musters der Genexpression sowohl bei dem Bakterium, als auch bei der Wirtszelle bewirkt werden (Abraham et al., 1998, Boyd und Chakrabarty, 1995). Beispielsweise führt die Anwesenheit von *S.gordonii* und Speichel zur Induktion von Genen (*sspA/B*), die Adhesine kodieren, welche sich an Glykoproteine des Speichels binden und mit *A.supp.* koaggregieren (Du und Kolenbrander, 2000). Veränderungen im Proteinprofil konnten auch für *S.m.* nachgewiesen werden. Es kommt dabei zu einer Hochregulierung von Proteinen, die unter anderem für biochemische Funktionen wie die Sekretion von Proteinen und die Biosynthese von Fettsäuren und Aminosäuren verantwortlich sind. Außerdem kommt es zur Expression neuartiger Proteine, deren genaue Funktion bis jetzt noch unbekannt ist. Gene von *S.m.*, die mit der Synthese von Glukan und Fruktan in Verbindung stehen, werden in Biofilmen anders reguliert als in einer planktonischen Lösung (Li und Burne, 2001).

Mit Hilfe kleiner diffusionsfähiger Moleküle ist eine Zell-Zell-Kommunikation innerhalb des Biofilms möglich. Diese Kommunikation bewirkt, dass sich die Bakterien an Veränderungen der Umgebung anpassen können und so in der Lage sind, diese Veränderungen zu überleben. Dies erreichen sie beispielsweise durch die Regulierung der Genexpression, wie zuvor erläutert. Bei *S.m.* dienen so genannte CSP (Competence Stimulating Peptids) der Zell-Zell-Kommunikation (Li et al., 2002). Die chromosomale DNA hierfür stammt aus aufgelösten Zellen des Biofilms, wodurch die Möglichkeit zum horizontalen Gentransfer innerhalb des Biofilms zunimmt. Auch die Säuretoleranz von *S.m.* in Biofilmen ist durch die Zell-Zell-Kommunikation bedingt. In niedrigen pH-Bereichen sendet *S.m.* CSPs aus, so dass Zellen in der Nachbarschaft in der Lage sind, *S.m.* vor einem Säureangriff zu schützen.

Mikroorganismen in Biofilmen weisen eine Resistenz gegen antimikrobiell wirkende Agenzien auf, wie sie z.B. in Zahnpasten und Mundspüllösungen vorkommen (Pratten und Wilson, 1999). Dabei scheint das Alter des Biofilms eine wichtige Rolle zu spielen. Je älter der Biofilm ist, desto größer ist die Resistenz, da zum Beispiel CHX nur in der Lage ist, oberflächlich gelegene Plaqueschichten zu erreichen. Weiter im Inneren des Biofilms gelegene Bakterien bleiben geschützt. Auch zeigen sich in Biofilmen organisierte Bakterien Antibiotika (Amoxycillin, Doxycyclin, Metronidazol) gegenüber resistenter (Larsen, 2002). Als mögliche Ursache dafür kommen Mutationen in Betracht, die das Ziel des Medika-

ments betreffen und Zellen so resistent machen, sowie die Anwesenheit von Pumpen, die einen Abtransport bewirken und die Produktion modifizierter Enzyme. Die genauen Mechanismen, worauf die Resistenz gegenüber antimikrobiellen Agenzien beruht, müssen noch weiter analysiert werden.

1.4 Präventionsstrategien

1.4.1 Einführung

Karies ist eine bakterielle Infektionskrankheit. Der heutige Wissensstand zur Ätiologie und Pathogenese der Karies ist so gut, dass der Einsatz präventiver Maßnahmen zu einem deutlichen Kariesrückgang führt. Die primären Präventionsmaßnahmen zielen darauf ab, Neuerkrankungen zu verhindern. Das wird im Allgemeinen durch gesundheitsfördernde und protektive Maßnahmen erreicht (z.B. Fluoridapplikation, Ernährungsumstellung). Im Rahmen der sekundären Prävention sollen Schäden früh diagnostiziert werden (z.B. initiale Kariesläsionen durch Bissflügelaufnahmen) und damit die Anzahl der Manifestationen neuer Erkrankungen reduziert bzw. der Zahnhartsubstanzverlust begrenzt werden (Remineralisation, Fissurenversiegelung). Gleichzeitig soll durch entsprechende Mundhygienemaßnahmen die Plaque mechanisch von den Zahnoberflächen und Zahnzwischenräumen entfernt werden (Hellwig et al., 2003).

Neue Möglichkeiten bietet neben antimikrobiellen Spüllösungen (Reich, 2006) die antimikrobielle fotodynamische Therapie, durch die die Mikroorganismen inaktiviert werden (Frentzen et al., 2000).

Dadurch, dass es sich bei Karies um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung handelt, ist der Einsatz variabler Präventionsmaßnahmen impliziert.

Die Tatsache, dass Bakterien verantwortlich für die Kariesentstehung sind, hat die Entwicklung der Vakzin-Therapie vorangetrieben. Warum sollte es nicht wie bei vielen anderen bakteriell bedingten Erkrankungen möglich sein, durch eine entsprechende Impfung eine Erkrankung zu verhindern? Das folgende Kapitel soll einen Überblick über Präventionsstrategien der Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft geben.

1.4.2 Mechanische Maßnahmen

Diese Maßnahmen zielen darauf ab, Plaque von der Zahnoberfläche, bzw. von den Zahnzwischenräumen zu entfernen. Hierbei spielt die Zahnbürste eine wichtige Rolle, wobei die herkömmliche Handzahnbürste immer mehr durch die elektrische Zahnbürste ersetzt wird. Die neueren elektrischen Zahnbürsten basieren auf einer oszillierend-rotierenden Technologie und führen zu einer effektiven Zahnreinigung, da durch den kleineren Bürstenkopf besonders die Reinigung distaler, sowie lingualer bzw. palatinaler Gebissbereiche erleichtert wird. Elektrische Zahnbürsten ermöglichen dadurch manuell weniger geschickten Patienten oder behinderten Patienten eine gründliche Mundhygiene.

Auch auf Ultraschalltechnologie basierende elektrische Zahnbürsten sind mittlerweile verfügbar. Sie erzeugen Ultraschall von ca. 31.000 Schwingungen pro Minute und entwickeln so eine milde Kavitation. Durch diese Druckwellen erfolgt eine mechanische Destruktion der Plaque. Es werden somit auch die Bakterien von der Zahnoberfläche abgelöst, die nicht direkt von den Borsten erreicht werden (Hellwig et al., 2003).

Ein weiteres Hilfsmittel zur Reinigung der Interdentalräume und der approximalen Zahnflächen ist die Zahnseide, die in etlichen Variationen auf dem Markt erhältlich ist. So zum Beispiel gewachst, ungewachst, fluoridiert oder auch als Superfloss, d.h. als Zahnseide deren Mittelteil leicht aufgeschäumt ist. Bei weiten Interdentalräumen und frei liegenden Furkationen empfiehlt sich die Anwendung von Interdentalbürstchen und Zahnhölzern. Insbesondere Zahneinziehungen an Oberflächen im Bereich des Approximalraumes werden mit Interdentalbürstchen effektiv gesäubert (Hellwig et al., 2003).

1.4.3 Chemische Maßnahmen

1.4.3.1 Fluoride

Bei der Fluoridierung unterscheidet man zwischen systemischer und lokaler Fluoridierung. Bei der systemischen Fluoridierung verwendetes NaF findet sich u.a. in Trinkwasser, Speisesalz sowie in Form von Tabletten. Bei Maßnahmen lokaler Fluoridierung kommen NaF, $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$, SnF oder Aminfluoride zum Einsatz. Diese sind z.B. in Zahnpasten, Lacken (Duraphat[®] 2,5%, Colgate-Palmolive GmbH, Hamburg), Gelen (Elmex Gelee[®]

1,25%, GABA GmbH, Lörrach) oder Mundspüllösungen (Elmex Fluid® 1%, GABA GmbH, Lörrach) enthalten. Der präeruptive kariostatische Effekt durch systemische Fluoridgaben ist dabei geringer einzuschätzen als der posteruptive Kariesschutz durch lokale Fluoridierungsmaßnahmen. Außerdem ist die Wirksamkeit der Fluoride bei geringer bis mittlerer Kariesaktivität am höchsten. Gleichzeitig ist der kariostatische Effekt abhängig von Art und Häufigkeit der Fluoridierungsmaßnahmen. Um diesen Effekt auszunutzen ist es erforderlich, entweder erhebliche Mengen Kalziumfluorid als Depot zu etablieren oder häufig kleine Fluoridmengen zu verabreichen. Die Wirkung der Fluoride ist multifaktoriell. Dabei stellte sich im Laufe der Jahre heraus, dass die geringere Säurelöslichkeit des Schmelzes durch Fluoridierung von geringerer Wichtigkeit beim Schutz gegen Karies ist, als vielmehr die Hemmung der Demineralisation bzw. die Förderung der Remineralisation (Hellwig et al., 2003).

Durch den prä- und posteruptiven Einbau von Fluorid in das Apatitgitter wird die Säurelöslichkeit des Schmelzes herabgesetzt. Es kommt zu einer Umwandlung von Hydroxylapatit zu Fluorapatit, d.h. die Hydroxylionen werden in einer Substitutionsreaktion gegen Fluoridionen ausgetauscht. Dies bewirkt eine Verbesserung der Kristallinität, d.h. die Kristalle sind in ihrer Gitterstruktur perfekter aufgebaut und sie sind größer. Da die Höhe der Fluoridanreicherung in den oberflächlichen Schichten der Zähne jedoch nicht mit der erreichten Karieshemmung korreliert, wird heute die Hemmung der Demineralisation und Förderung der Remineralisation als Hauptwirkungsmechanismus der Fluoride angesehen. Eine wichtige Rolle spielt dabei das so genannte labile Fluoridreservoir, das sich in Form einer Kalziumfluoridschicht darstellt, die die Zahnoberfläche bedeckt. An der Zahnoberfläche herrscht ein dynamisches Gleichgewicht, das vom pH-Wert der Umgebung beeinflusst wird, indem dieser die Freisetzungskinetik des Fluoridions aus dem Kalziumfluorid bestimmt.

Im kariogenen Milieu, bei niedrigem pH-Wert, tritt eine Untersättigung der umgebenden Medien (Plaques, Speichel) in Bezug auf Fluorid ein, was dazu führt, dass diese aus der CaF_2 -Schicht freigesetzt wird. Das freie Fluorid an der Zahnoberfläche drängt aus thermodynamischen Gründen die Demineralisationsreaktion zugunsten der Remineralisationsreaktion zurück (Zimmer, 1997).

Auch auf die Plaque nehmen Fluoride erheblichen Einfluss. Bei niedrigem pH-Wert diffundiert Fluorwasserstoff in die Bakterienzelle und senkt so den intrazellulären pH-Wert. Da die Enzyme der Glykolyse ihr pH-Optimum im neutralen Bereich haben, ist die Hemmung der Stoffwechsellistung die Folge. Außerdem wird die Enolase spezifisch gehemmt, so dass kein Phosphoenolpyruvat gebildet wird und die Streptokokken keine Glukose aufnehmen können (Hellwig et al., 2003).

1.4.3.2 Chlorhexidin

Wegen seines breiten unspezifischen Wirkungsspektrums, der geringen systemischen Toxizität und der langen Wirkdauer ist Chlorhexidin noch immer der Goldstandard der oralen Antiseptika. CHX ist ein Biguanid. Es wird meist als Biguanidsalz verwendet, da es als Salz in Wasser und Alkohol gut löslich ist. In hoher Konzentration ist es primär bakterizid, in höheren Verdünnungen wird eine bakterio-statische Wirkung beobachtet. Es besitzt eine geringe Oberflächenspannung. Durch elektrostatische Bindungen vermag es an Zähnen, Schleimhäuten und Mikroorganismen zu adsorbieren (Hjeljord et al., 1973).

Die Adsorption, die auf den kationischen Charakter des CHX zurückzuführen ist, ist von langer anhaltender Dauer. Nach Spülungen mit einer 0,2%igen Chlorhexidinglucolatlösung wurde in vivo eine bakterio-statische Wirkung über einen Zeitraum von bis zu 12 Stunden beobachtet. Diese Anhaftung wird jedoch individuell durch die Stärke des Speichelflusses, die Konzentration der konkurrierenden Kationen wie Ca^{2+} im Speichel und die Anwesenheit von H^+ -Ionen, beispielsweise aus sauren Nahrungsbestandteilen, beeinflusst. Auch wird die antibakterielle Wirksamkeit des im Speichel frei verfügbaren CHX durch die Präsenz anionischer Substanzen eingeschränkt. Dies sind z.B. anionische Tenside in Zahnpasta. Die kationischen CHX-Moleküle lagern sich an anionische Phosphatgruppen in der bakteriellen Zellwand und an Carboxylgruppen der auf Schleimhäuten und Zähnen adhärenen Speichelproteine an. Dadurch kommt es einerseits zu einer Störung des intrazellulären Membrantransports (Hugo und Longworth, 1966), andererseits wird die für die Biofilmbildung notwendige Adsorption der Keime an die oralen Glykoproteine behindert.

Allerdings ist eine lang andauernde Anwendung aufgrund des Auftretens lokaler Nebenwirkungen nur in Ausnahmefällen indiziert. So kann es zu Verfärbungen der Zähne (Eley, 1999) und Schleimhäute, Geschmacksirritationen, Wundheilungsstörungen (Mariotti und Rumpf, 1999), Schleimhauterosionen sowie in seltenen Fällen zu allergischen Reaktionen kommen. CHX ist in Form von Mundspüllösungen in verschiedenen Konzentrationen, des Weiteren in Gelen und Lacken erhältlich.

1.4.4 Antimikrobielle Photodynamische Therapie

Eine Erweiterung der Maßnahmen der Kariesprävention könnte in Zukunft die antimikrobielle fotochemische Therapie darstellen. Durch die Verwendung von lichtaktivierbaren Wirkstoffen (Photosensibilisatoren) kann Laserlicht niedriger Leistungsdichte diese Stoffe derart verändern, dass sie zytotoxische Effekte an Mikroorganismen bewirken. Die in diesem Zusammenhang auftretenden Vorgänge sind sauerstoffabhängig (Konopka und Goslinski, 2007) und werden als antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) bezeichnet (Meisel und Kocher, 2005, Zeina et al., 2001). Nach Anlagerung des Photosensibilisators an die Bakterienmembran erfolgt eine Aktivierung mit Laserlicht. Der aktivierte Sensibilisator wird durch die absorbierte Lichtenergie in einen instabilen Zustand überführt, und es kommt zu einer Energieübertragung auf ein Sauerstoffmolekül. Dabei entsteht Singulett-Sauerstoff, der in der Lage ist, einen toxischen Effekt auf Mikroorganismen auszuüben und Bestandteile der Zellmembran, der Zellorganellen und des Zellkerns zu zerstören. Allerdings ist diese Wirkung lokal begrenzt und die Reaktion wird mit dem Ausschalten der Lichtzufuhr unterbrochen (Meisel und Kocher, 2005). Die photodynamische Therapie stellt seit vielen Jahren bereits eine wichtige Behandlungsmöglichkeit in der Krebstherapie dar. Dort werden tumorlokalisierende Photosensitizer appliziert, die dann durch Laserstrahlung aktiviert werden. So kann selektiv Gewebe mit einer hohen Affinität zum Photosensibilisator zerstört werden.

In der Zahnheilkunde bietet die antimikrobielle Photodynamische Therapie bereits viel versprechende Einsatzmöglichkeiten im Rahmen der systematischen parodontalen Therapie (Braun et al., 2007) oder auch der endodontischen Behandlung (Garcez et al., 2007). Dabei stellt dieser Behandlungsansatz eine die konventionellen Techniken ergänzende The-

rapiemethode dar. Außerdem ist sie ein probates Mittel zur Bekämpfung der versteckten Karies und kann dort ihre Wirksamkeit entfalten, „wo die Maßnahmen der mechanischen Plaquekontrolle ihre Grenzen erreicht haben“ (Lussi und Hotz, 1995). Praktisch gesehen sind dies Fissuren, Risse und Kavernen unterhalb der Schmelzdeckschicht. Deshalb soll die antimikrobielle Photodynamische Therapie vor allem Anwendung bei der Betreuung von Hochrisikopatienten finden.

Ziel der antimikrobiellen fotodynamischen Therapie bei der Kariesprophylaxe ist die selektive Ausschaltung potenzieller Karieserreger, ohne das Gesamtbiotop der Mundhöhle zu stören. Bisherige Untersuchungen beschränken sich zurzeit auf reine Flüssigkulturen. Die dabei angewendeten Photosensitizer (Toluidinblau, Methylenblau, Kristallviolett, Thiomin und Hämatoporphyrinester) erwiesen sich als geeignet auf grampositive und gramnegative Bakterien im Sinne eines photodynamischen Effekts zu wirken (Okamoto et al., 1992). Es kommt dabei zu einer fotodynamischen Schädigung der äußeren Membran und der Plasmamembran auf dem Boden einer Molekularmassenveränderung der Membranproteine, die eine Singulett-Sauerstoff induzierte Schädigung der DNA zur Folge hat (Bhatti et al. 1998, Okamoto et al. 1992). Der Bakterientod wird verursacht durch den Kaliumausstrom, der durch den Membrandefekt entsteht, welcher durch die freien Radikale induziert wurde und der Beeinträchtigung wichtiger Stoffwechselzentren. Ob die Ergebnisse der Versuche in Flüssigkulturen auf Mikroorganismen, die in Biofilmen organisiert sind, übertragbar sind, ist noch nicht erwiesen. Deren Verhalten im Rahmen der fotodynamischen Therapie sowie das von oralen Mikroorganismen, die sich während des Prozesses der Kariesausbreitung in zumindest teilzerstörten Zahnhartgeweben befinden, muss noch geklärt werden.

So ist es zum Beispiel vorstellbar, dass die Absorptionseigenschaften der Photosensitizer an die Mikroorganismen verändert sind. Ebenso kann sich das Transmissionsverhalten des Lichtes in Biofilmen anders darstellen. Möglich ist auch eine veränderte Selektivität der Absorption von Photosensitizern in Biofilmen.

Ist die antimikrobielle fotodynamische Therapie auch auf in Biofilmen organisierte Mikroorganismen anwendbar, so stellt sie eine neue Möglichkeit der Prophylaxe dar, da bisher nicht erreichte Areale in der Prävention einbezogen werden könnten und gleichzeitig durch die Begrenzung der bestrahlten Areale das Biotop Mundhöhle nicht verändert wird (Frentzen et al., 2000).

1.4.5 Immunisierung gegen Karies und Replacement-Therapie

Bei Präventionsstrategien steht im Vordergrund, dass es sich bei Karies um eine bakteriell bedingte Krankheit handelt, bei der *S.m.* eine wichtige Rolle spielt. Dieses Wissen führt zum einen zum nicht immunologischen Ansatz der Replacement-Therapie, wo *S.m.* durch eine nicht pathogene Mutante ersetzt wird. Zum anderen ergeben sich daraus immunologische Präventionsstrategien, die auf eine Immunisierung des Menschen gegen Karies abzielen. Dabei geht es um die mukosale Immunisierung, die aktive Immunisierung, sowie die lokale passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern. Sowohl bei aktiven als auch bei passiven Immunisierungsverfahren sind die Antikörper gegen die Virulenzfaktoren gerichtet, die für die Ausbildung eines pathogenen Biofilms verantwortlich sind. Dabei richtet sich die Aufmerksamkeit gegen drei Protein-Antigene: Oberflächenadhesine, die SA I/II (Surface antigen I/II) und synonym als Antigen B, P1, spaP, Pac, spaC, PAg bezeichnet werden, Glykosyltransferasen (GTF) und Glukan-bindende Proteine. Diese Protein-Antigene stehen nachweislich in Verbindung mit der Virulenz und Kolonisation der Zahnoberfläche (Jenkinson und Lamont, 1997).

Antikörper, die gegen diese Antigene gerichtet sind, führen zur Inhibition der bakteriellen Adhärenz und Akkumulation von *S.m.*, indem die spezifischen Rezeptorbindungsstellen der Oberflächenadhesine SA I/II oder die funktionellen Regionen der Glykosyltransferasen blockiert werden. Diese Glykosyltransferasen katalysieren die Hydrolyse von Saccharosemolekülen unter der Freisetzung von Glucose und Fruktose, sowie den Transfer des Glykosylrestes an die terminale Region der synthetisierten Glukanpolymere. Durch diese Produktion extrazellulärer Polysaccharide fördern sie die Etablierung des Erregers im Biofilm.

Es kommt durch Immunisierungsverfahren nicht zur Eliminierung von *S.m.*, sondern lediglich zu einer Blockade der Virulenzfaktoren. Die kariogene Mikroflora, die sich in Form von Plaque in der Mundhöhle befindet, wird jedoch nicht beeinflusst, da die Antikörper aufgrund ihrer Größe, es sind Makromoleküle, nicht die Möglichkeit haben, in den Biofilm zu diffundieren. Die Immunisierungsverfahren haben gemein, dass sie sich im Tierexperiment und *in vitro* als Prävention gegen Karies wirksam zeigen. Der Beweis ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen *in vivo* muss in Zukunft erbracht werden.

1.4.5.1 Replacement-Therapie

Die Replacement-Therapie stellt einen nicht immunologischen Ansatz der Kariesprävention dar, bei dem der natürliche Bakterienstamm *S.m.* durch eine nicht pathogene Mutante ersetzt wird. Dieser Ansatz wird von einer Forschungsgruppe um den Wissenschaftler Jeffrey Hillman erforscht (Hillman et al., 2000).

In den vorherigen Kapiteln wurde bereits erwähnt, dass *S.m.* bei der Kariesentstehung eine Schlüsselrolle spielt. Durch den Austausch von *S.m.* gegen eine gentechnisch modifizierte, nicht pathogene Mutante soll es zu einer Kariesreduktion kommen. Die Mutante besetzt dabei die ökologische Nische, die sonst von *S.m.* eingenommen wird, so dass es nicht zu einem Ungleichgewicht kommt. An die Mutante wird also einerseits die Anforderung gestellt, die ökologische Nische von *S.m.* mit hoher Affinität selektiv und dauerhaft zu kolonisieren, andererseits darf sie nicht pathogen sein und lokale und systemische Risiken und Nebenwirkungen verursachen. Sie muss genetisch stabil sein und keine Mutationen entwickeln. Das spezielle pathogene Potenzial von *S.m.* besteht in seinen azidogenen Eigenschaften, die kariöse Läsionen im Zahnschmelz zur Folge haben. Die Schmelz auflösende Säure ist dabei Milchsäure, die durch das Enzym Laktatdehydrogenase gebildet wird. Folglich wäre eine LDH-Mangelmutante ein geeigneter Ersatz für *S.m.* Doch zeigte es sich, dass das entstehende Ungleichgewicht im bakteriellen Metabolismus letale Folgen für die Mangelmutante hat (Chen et al., 1994, Hillman et al., 1994, Hillman et al., 1996).

Zur Lösung dieses Problems wurde die Mutante mit einer erhöhten Alkoholdehydrogenaseaktivität ausgestattet, so dass als Stoffwechselendprodukt Äthanol anstelle der Milchsäure entsteht. Im Tierexperiment kann gezeigt werden, dass *S.m.* aus der Plaque verdrängt, und die Zahnoberfläche stattdessen mit der Mutante selektiv kolonisiert wird, was eine Reduktion der Karies zur Folge hat (Hillmann et al., 2000). Gleichzeitig kommt es zu keinen pathologischen Veränderungen der inneren Organe. In der Zukunft muss nun bewiesen werden, inwiefern die Replacement-Therapie auf den Menschen übertragbar ist.

1.4.5.2 Aktive Immunisierung

Bei Impfungen mit aktiver Immunisierung werden dem Körper geringe, unschädliche Mengen eines Antigens zugeführt. Die Antigene werden dabei so verändert, dass sie den Organismus nicht mehr schädigen können. Dies wird unter anderem erreicht, indem man niedrige Dosen eines Produkts des infektiösen Agens einsetzt oder ein solches Produkt chemisch modifiziert, die Erreger vorher abtötet oder lebende, aber abgeschwächte (avirulente) Stämme verwendet. Oft genügen für eine Immunantwort auch nur Untereinheiten virulenter Viren oder Oberflächenantigene, die gentechnisch hergestellt werden können. Bei der aktiven Immunisierung wird somit eine Primärreaktion hervorgerufen, die zu keinen Krankheitssymptomen führt, aber die Bildung von Gedächtniszellen bewirkt. Beim nächsten Kontakt mit dem jeweiligen Antigen werden die entsprechenden Antikörper sofort gebildet und die Erkrankung wird dadurch verhindert (Lexikon der Biologie, 1999).

Bezüglich der Prävention von Karies erweist sich eine aktive Immunisierung jedoch als schwierig. Frühere parenterale Ansätze zur aktiven Immunisierung erwiesen sich als ungeeignet für die Anwendung am Menschen, da es zu Kreuzreaktionen der Streptokokken-Antigene mit menschlichem Herzmuskelgewebe kommen kann (Russell und Wu, 1990, van de Rijn et al. 1976, Wu und Russell 1990). In diesen Studien wurden ganze Bakterien oder relativ unspezifische Membranbestandteile als antigenes Material verwendet. Neuere Methoden der aktiven Immunisierung gegen Karies vermeiden die parenterale Applikation von antigenem Material und streben durch topische Applikation an den Tonsillen oder Speicheldrüsen bzw. intranasal die Stimulation der mukosalen Immunantwort an.

1.4.5.3 Mukosale Immunisierung

Durch die mukosale Immunisierung besteht die Möglichkeit, die Komplikationen, die bei parenteralen Injektionen entstehen können, zu umgehen. Es kommt zur Induktion einer sekretorischen Immunantwort, die auf die Blockade der Virulenzfaktoren gerichtet ist (Childers et al., 2002). Im mukosalen Immunsystem kommt es zur Bildung von sekretorischen IgA-Antikörpern (s-IgA). Es zeigte sich, dass Kinder IgA-Antikörper ab dem Moment bil-

den, wo mikrobielle Kolonisation in der Mundhöhle stattfindet. Diese sekretorischen Antikörper werden mit dem Speichel sezerniert, wenn eine Stimulation durch den Kontakt des Antigens mit dem Mukosa-assoziierten-lymphatischen Gewebe stattfindet (Hajishengallis und Michalek, 1999). Zu dem mukosalen Immunsystem gehören die Peyerschen Plaques sowie der Waldeyersche Rachenring. Die Sekretion von s-IgA kann auch durch die Stimulation des Darm-assoziierten Lymphgewebes oder des tonsillären lymphatischen Gewebes stattfinden (Mestecky et al., 1978, Michalek et al., 1976, Smith und Taubmann, 1987, Smith und Taubmann, 1990).

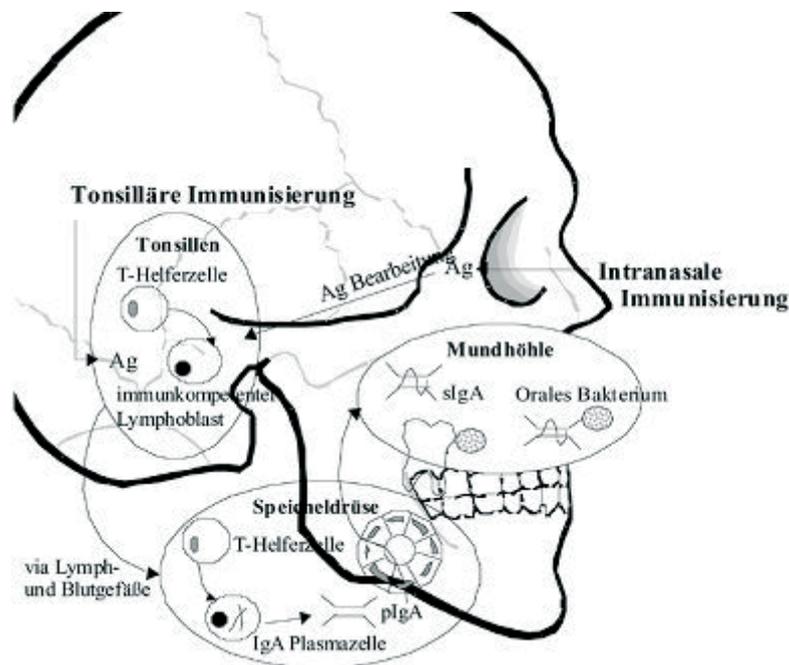


Abb. 2: Stimulation des mukosalen Immunsystems (Tonsillen) zwecks Induktion der Antikörpersekretion über den Speichel. Durch die intranasale oder tonsilläre Applikation von Antigenen (Ag) gegen *S.mutans* wird in den Tonsillen die Bildung und Ausschüttung von immunkompetenten Lymphoblasten angeregt. In den Speicheldrüsen differenzieren die Lymphoblasten zu Plasmazellen und bilden polymere IgA-Antikörper (pIgA), die als sekretorische IgA-Antikörper (sIgA) im Speichel sezerniert werden und spezifisch gegen *S.mutans* Bakterien gerichtet sind (aus: Hannig, 2004).

Das mukosale Immunsystem kann also unabhängig von den im Blut zirkulierenden immunkompetenten Zellen Antikörper bilden (Czerkinsky et al., 1987). Die intranasale und tonsilläre Applikation von Antigenen stellt eine innovative Möglichkeit zur mukosalen Immunisierung gegen S.m. dar (Fukuizumi et al., 1997, Fukuizumi et al., 1999, Fukuizumi et al., 2000, Russell et al., 1999, Wu und Russell, 1993). Verabreicht werden die Antigene zumeist in Form von Sprays. Dabei führt die intranasale Applikation, bei der die Tonsillen als regionales Immunsystem dienen, nur zu einer mäßigen Immunantwort, ohne dauerhafte Bildung von s-IgA im Speichel. Wird jedoch Cholera toxin als Adjuvans genutzt, wird ausreichend s-IgA produziert (Hajishengallis et al., 1995, Harokopakis et al., 1998, Russell, 1998, Russell et al., 1996). S.m.-Oberflächenantigene kombiniert mit der immunogenen Untereinheit B des Cholera toxins erhöhen die Immunogenität von intranasal applizierten Antigenen und bewirken so eine Steigerung der Antikörperproduktion im Speichel, ohne dabei toxische Effekte zu haben (Katz et al., 1993, Russell und Wu, 1991, Takahashi et al., 1990, Wu und Russell, 1993).

Die tonsilläre Applikation von Antigenen stellt ein neues Immunisierungsverfahren dar. Wird das Antigen auf die Gaumenmandel aufgetragen, führt dies zur Bildung einer ausreichenden Menge von s-IgA gegen S.m. und S.sobrinus im Speichel, ohne dass ein immunogenes Adjuvans benötigt wird. Die intraorale Kolonisation von S.m. wird so auf immunologischem Weg verhindert, ohne Kreuzreaktionen mit menschlichem Herzmuskelgewebe hervorzurufen (Hannig, 2004).

1.4.5.4 Lokale passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern

Die passive Immunisierung hat gegenüber der aktiven Immunisierung den Vorteil, dass Risiken vermieden werden. Im Gegensatz zur aktiven Immunisierung wird dabei kein immunologisches Erinnerungsvermögen induziert, sondern die Antikörper werden lokal auf die Zahnoberfläche appliziert, um so die Kolonisation von *S.m.* zu verhindern (Lehner et al., 1985, Ma et al., 1987).

Nachteilig bei diesem Verfahren ist jedoch, dass für eine topische Antikörperapplikation in der Mundhöhle sehr große Mengen monoklonaler Antikörper benötigt werden (Hannig, 2003).

1.4.5.4.1 Biotechnologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper

Die Gentechnologie ermöglicht es, rekombinante Proteine und immuntherapeutische Substanzen in transgenen Pflanzen in großen Mengen herzustellen (Collins und Shepherd, 1996, Conrad und Fiedler, 1998, Ma und Hein, 1996, Ma et al., 1995, Mason und Arntzen, 1995). Für die Bildung monoklonaler Antikörper werden z.B. Tabakpflanzen einer genetischen Transformation unterzogen, so dass sie die erforderlichen Gene exprimieren, die für die Kodierung der relevanten Antikörper benötigt werden. Ein spezieller Vorteil der Antikörperproduktion in transgenen Pflanzen ist darin zu sehen, dass Pflanzen auch komplexe, multimere Fremdproteine mit sehr hoher Genauigkeit reproduzieren können. Der Arbeitsgruppe um Ma et al. ist es gelungen, in transgenen Tabakpflanzen kombinierte sekretorische IgA- und IgG-Antikörper zu produzieren, die gegen das Oberflächenantigen SA I/II von *S.m.* gerichtet sind. Die rekombinanten, monoklonalen, pflanzlichen s-IgA/G Antikörper zeichnen sich, verglichen mit reinen IgG-Antikörpern, durch eine erhöhte Stabilität gegenüber der proteolytischen Degradation im Mundhöhlenmilieu aus (Ma et al., 1998).

Bei Guy's 13 handelt es sich um einen im Maussystem induzierten monoklonalen Antikörper, der in der Lage ist, spezifisch das SA I/II Protein von *S.mutans* und *S.sobrinus* zu erkennen (Smith und Lehner, 1989). Im Tierversuch zeigt er sich in der Lage, die Kolonisation von *S.m.* auf der Zahnoberfläche zu verhindern und damit die Entstehung von

Karies zu vermeiden (Lehner et al., 1985). Beim Menschen kann ein Maus-Antikörper jedoch eine ungewollte Antikörperreaktion hervorrufen (Saleh et al., 1990).

Durch einen Prozess, der als Chain-shuffling bezeichnet wird, kann mit Hilfe einer Phagendisplaybibliothek aus dem Maus-monoklonalen Antikörper Guy's 13 ein entsprechender humaner Diabody generiert werden (Kupper et al., 2005), (Abb. 3). Dazu nimmt man die variable Genregion des originalen monoklonalen Maus-Antikörpers Guy's 13 und entwickelt mit Hilfe von Chain-shuffling in Phagendisplaybibliotheken humane scFv (single chain fragment variable) und Diabody-Derivate (Ma et al., 1989). Die variable Gen-Region der schweren Kette von Guy's 13 wird dabei in eine Phagendisplaybibliothek eingebracht, die humane leichte Ketten enthält. Dadurch werden diejenigen leichten Ketten ausgewählt, die, in Kombination mit der entsprechenden schweren Maus-Kette, eine spezifische Bindung zum SA I/II zeigen. Dieser Nachweis wird durch ELISA bestätigt (Kupper et al., 2005). Schließlich wird die schwere Kette des Maus-Antikörpers durch das entsprechende humane Gegenstück ersetzt, indem die ausgewählten humanen leichten Ketten in eine humane Phagendisplaybibliothek für schwere Ketten eingebracht werden.

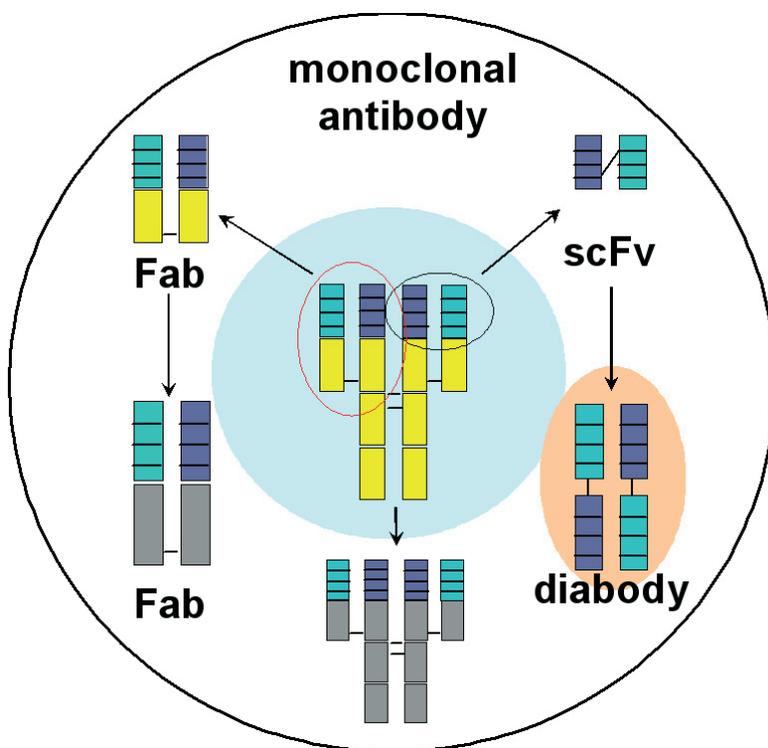


Abb. 3: Aus monoklonalen Antikörpern gewonnene rekombinante Fab-Fragmente und Diabodies (aus: Frentzen et al., 2006).

Antikörper bestehen aus 2 Fab-Fragmenten und einem Fc-Fragment. Die Fab-Fragmente sind in der Lage, das Antigen zu binden. Ein Fab-Fragment ist ein aus zwei Aminosäureketten (einer leichten und einer schweren Kette) aufgebautes Protein. Es besitzt jeweils eine konstante und eine variable Antikörperdomäne. Die variable Domäne nennt sich scFv (single chain fragment variable). Sie ist univalent. Durch Dimerisierung der scFv entstehen Diabodies, die im Gegensatz dazu divalent sind. Durch biotechnologische Prozesse besteht die Möglichkeit, aus monoklonalen Antikörpern rekombinante Fab-Fragmente und Diabodies zu generieren. Nebenstehende Abbildung soll dies schematisch darstellen.

1.4.5.4.2 Wirkungsmechanismus

Bereits in den 1970er Jahren gelang es im Tierversuch erstmals, den kariesprotektiven Effekt durch passive Immunisierung mit Antikörpern gegen S.m. zu induzieren (Lehner et al., 1978, McGhee et al., 1976, Michalek et al., 1975). Diese Antikörper interferieren mit den molekularen Mechanismen der bakteriellen Adhärenz und verhindern bei direkter Applikation auf die Schmelzoberfläche die Kolonisation des Zahnes durch S.m. Dabei werden die IgG-Antikörper, die gegen das Oberflächenantigen SA I/II gerichtet sind, in der Pellikelschicht angereichert und können von dort aus wirksam werden (Abb. 4).

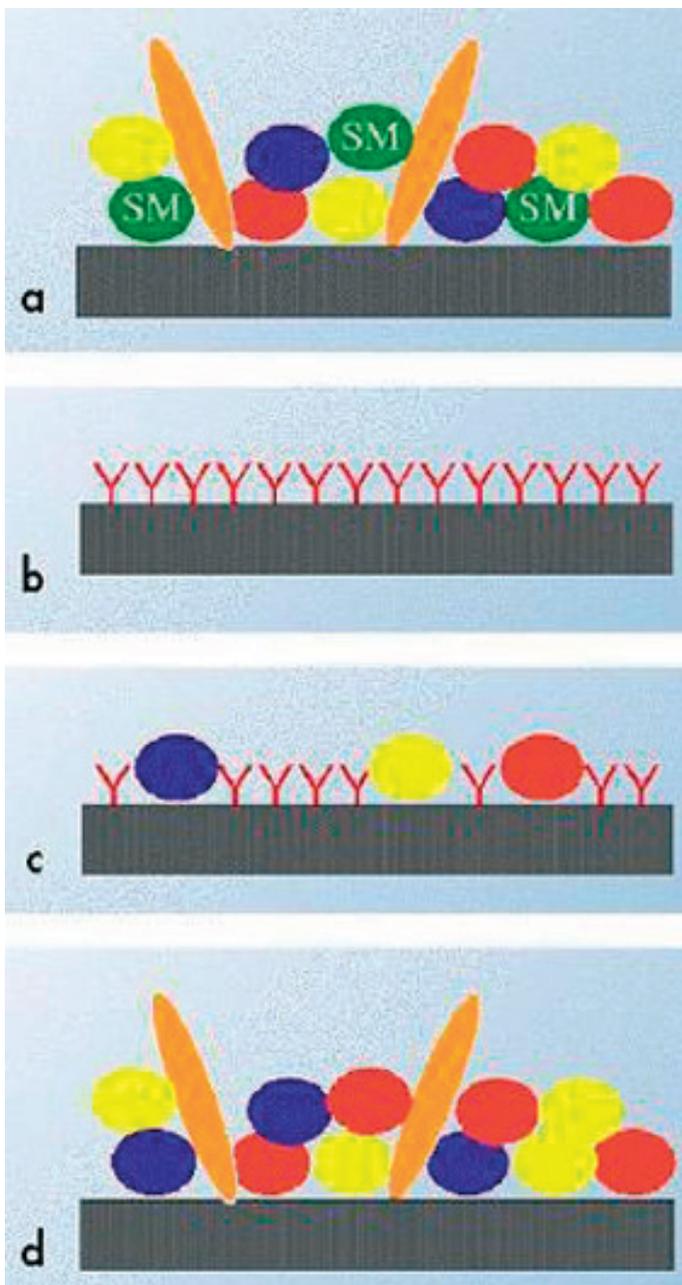


Abb. 4: Prinzip der topischen passiven Immunisierung gegen S.mutans. Im Bild a ist der Ausgangszustand schematisch dargestellt. Durch die Adhärenz verschiedener Bakterienpezies entsteht an der Zahnoberfläche ein mikrobieller Biofilm. Integraler Bestandteil dieses Biofilms sind S.mutans (SM) Bakterienzellen (a). Nach Entfernen des Biofilms durch professionelle Zahnreinigung werden sekretorische Antikörper (y), die gegen die Oberflächenadhäsine von S.mutans gerichtet sind, direkt auf die Schmelzoberfläche appliziert (b). Diese Antikörper verhindern die Adhärenz von S.mutans (c). Die neu formierte „mikrobielle Gemeinschaft“ befindet sich in einem ökologischen Gleichgewicht, für dessen Stabilität die Anwesenheit von Mutans-Streptokokken nicht mehr erforderlich ist (d) (aus: Hannig, 2004).

In den 1980er Jahren konnte in weiterführenden Experimenten der Nachweis dafür erbracht werden, dass sich durch die lokale intraorale Applikation von IgG-Antikörpern mit Spezifität gegen das bakterielle Oberflächenantigen SA I/II auch bei menschlichen Probanden das Auftreten von S.m. in der Plaque verhindern lässt (Ma et al., 1990, 1989). Es zeigte sich, dass die topische Applikation von Anti SA I/II-Antikörpern eine Rekolonisation der Mundhöhle mit S.m. über einen Zeitraum von bis zu 2 Jahren unterbindet (Ma et al., 1990). Dabei lässt sich der IgG-Antikörper jedoch überraschenderweise nur über eine Zeitdauer von bis zu 3 Tagen in der Mundhöhle der Probanden nachweisen. Der Langzeitschutz vor einer Rekolonisation der Mundhöhle mit S.m. lässt sich folglich nicht aus der Persistenz der Antikörper an der Zahnoberfläche erklären. Vielmehr scheint es durch diese Art der passiven Immunisierung zu einer Veränderung der bakteriellen Flora innerhalb des Plaque-Biofilms zu kommen, die sich inhibierend auf die Rekolonisation der Mundhöhle mit S.m. auswirkt (Lehner et al., 1992, Ma et al., 1990). Andere bakterielle Spezies blockieren möglicherweise die ökologische Nische, die üblicherweise von S.m. besetzt ist und verhindern dadurch die orale Wiederbesiedelung mit S.m.

Durch das Verfahren der topischen passiven Immunisierung lässt sich die konventionelle passive Immunisierung in Form der Injektion von Antikörpern umgehen. Unerwünschte systemische Nebeneffekte können so vermieden werden. Mit der kommerziellen Verfügbarkeit eines Karies-Vakzins für die topische Applikation könnte in einigen Jahren zu rechnen sein (Ma, 1999). Voraussetzung für die topische Antikörperapplikation ist, wie bereits erwähnt, die Verfügbarkeit sehr großer Mengen monoklonaler Antikörperfragmente mit humaner Kodierung.

1.5 Ziel der Arbeit

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass Antikörper zu einer Agglutination von *Streptococcus mutans* führen und so die Kolonisation der Zahnoberfläche mit diesem Mikroorganismus verhindern können. Mit Hilfe der in vitro Studie sollte der Nachweis erbracht werden, dass biotechnologisch hergestellte Antikörperfragmente sich entsprechend der konventionell generierten Antikörperprodukte verhalten. Gleichzeitig galt es herauszufinden, ob die Verwendung eines Maus-monoklonalen Antikörpers, das Agglutinationsverhalten von *S.m.* betreffend, zu anderen Ergebnissen führt als die Verwendung des entsprechenden humanen Antikörper-Derivats. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob sich Unterschiede im Agglutinationsverhalten ergeben, wenn anstatt der Dialyse des Antikörpers das jeweilige Präzipitat benutzt wird. Dies sollte zeigen, ob die Verdünnung des Antikörpers generell einen Einfluss auf die Agglutination hat. Es sollte zudem herausgefunden werden, ob sich die Gramfärbung zur Darstellung des Agglutinationsprozesses eignet und ob es außerdem von Nutzen ist, die Proben rasterelektronenmikroskopisch auszuwerten.

2. Material und Methode

2.1 Versuchsvorbereitung

Induziert man bakterielles Wachstum in einem geschlossenen System (Röhrchen, sog. „batch-Kultur“) erhält man eine für diese Zellpopulation typische Wachstumskurve (Madigan et al., 2001).

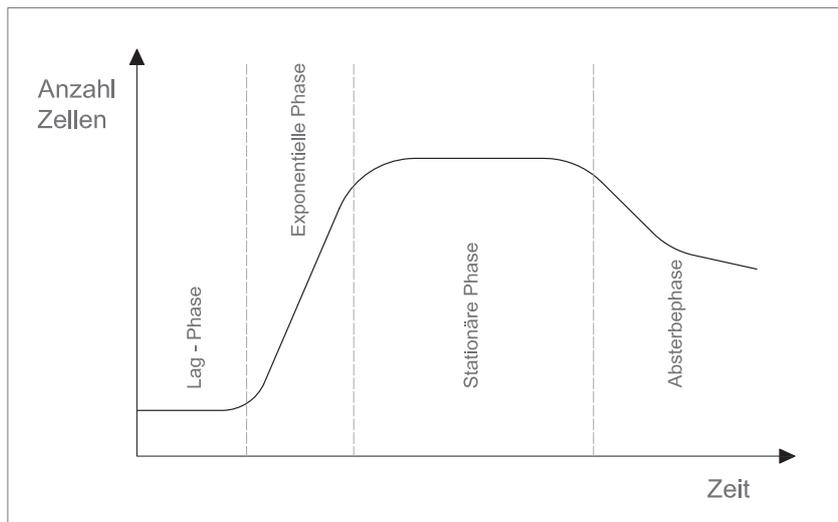


Abb. 5: Typische Wachstumskurve einer Bakterienkolonie. Man erkennt die Einteilung in verschiedene Phasen:

1. Lag-Phase
2. exponentielle Phase
3. stationäre Phase
4. Absterbephase

Die Bedingungen in diesem System ändern sich dauernd: Die Nährstoffkonzentration sinkt, die Zellbiomasse nimmt dagegen zu (Fritsche, 2002). Nach Überimpfen der Mikroorganismen in frisches Medium beginnt deren Wachstum nicht sofort. Es kommt zunächst zu einer Anpassung an das Milieu - die so genannte Anlauf- bzw. lag-Phase (englisch: to lag = sich anpassen) (Madigan et al., 2001, Fritsche, 2002). In dieser Phase synthetisieren die Zellen Ribosomen und Enzyme, die für die Verwertung der vorliegenden Nährstoffe im beimpften Medium notwendig sind. Die Dauer ist abhängig vom Alter der Population der eingeimpften Zellen und der Zusammensetzung des Kulturmediums (Fritsche, 2002). Hieran schließt sich die Phase des exponentiellen Wachstums an. Die Zellzahl verdoppelt sich in regelmäßigen Abständen. Die Wachstumsrate bleibt solange konstant, bis ein essentieller Nährstoff ins Minimum gerät (Munk, 2002, Fritsche, 2002). Die Geschwindigkeit des exponentiellen Wachstums variiert stark. Sie wird durch Temperatur und Zusammensetzung des Nährmediums sowie von genetischen Merkmalen der Mikroorganismen beeinflusst (Madigan et al., 2001). Bei schnell wachsenden Bakterien und günstigen Tem-

peraturen tritt die Limitation der exponentiellen Phase innerhalb eines Tages ein. Durch Nährstoffverbrauch und Anhäufung von hemmenden Stoffwechselprodukten geht das bakterielle Wachstum in die stationäre Phase über (Fritsche, 2002). Das Wachstum der Population wird begrenzt. Einige Mikroorganismen können während der stationären Phase langsam weiter wachsen. Dadurch befinden sich Zelltod und langsamer Zuwachs im Gleichgewicht, die Zellzahl bleibt gleich (Madigan et al., 2001, Fritsche, 2002). Bei Inkubation über die stationäre Phase hinaus verschiebt sich dieses Gleichgewicht zu Gunsten der absterbenden Zellen. Das Absterben der Mikroorganismen ist mit Autolyse verbunden und verläuft ebenfalls exponentiell. Jedoch ist die Geschwindigkeit hierbei viel geringer als beim exponentiellen Wachstum (Madigan et al., 2001).

Um Wachstumsraten einer Bakterienkultur zu erfassen, kann man sich der Trübungsmessung bedienen. Eine Trübung von Bakteriensuspensionen entsteht, weil Zellen das Licht, das durch die Suspension fällt, streuen. Diese Streuung des Lichts fällt umso stärker aus, je mehr Zellen sich in der Suspension befinden. Durch das Wachstum der Bakterien in ihrem Nährmedium und die dadurch entstehende Zellzunahme kommt es also zu einer Eintrübung des Nährmediums. Bei der Messung mit einem Spektralphotometer, einem Zelldichtemessgerät, wird die Menge an Licht gemessen, die nach dem Durchleiten durch die Probe austritt, ohne gestreut zu werden. Bei einzelligen Mikroorganismen sind die gemessenen Werte proportional zur Zellmasse und somit auch zur Zellzahl. Durch das Anlegen einer Eichkurve können für jeden Mikroorganismus individuell Rückschlüsse von den gemessenen Dichtewerten auf Zellmasse oder Zellzahl gezogen werden (Madigan et al., 2001).

Vorherige Versuchsreihen zur Ermittlung der Wachstumseigenschaften von *Streptococcus mutans* konnten zeigen, dass sich das Wachstum nach Ablauf von 8 Stunden nach Beimpfen von AB-Medium mit der Streptokokken-Suspension und anschließender Bebrütung im 37°C warmen Schüttelbad in einer exponentiellen Wachstumsphase befindet. Zur Standardisierung der Ergebnisse wurden dann Extinktionswerte mittels eines Zelldichtegerätes (WPA CO 8000, Biochrom, Cambridge, England) gemessen. Sie lagen im Bereich von 0,6 bis 0,8. Dieses Wissen legte den Zeitplan für die Versuchsreihe fest.

Die Beschleunigungsphase bei *Streptococcus mutans* ist sehr kurz und beträgt im Mittel nur bis zu 2 Stunden. Im Anschluss daran steigen die gemessenen Extinktionswerte sprunghaft an, bis sie ca. 9-15 Stunden nach der Beimpfung ihren höchsten Wert erreicht haben (Kordes, 2007). Während dieser Phase findet das – für die geplanten Versuche relevante – exponentielle Wachstum statt. Die Plateauphase ist nur sehr kurz auszumachen, da die Werte im Anschluss an den schnellen Anstieg fast direkt auch wieder abfallen. Der Werteabfall in der Absterbephase verläuft jedoch wesentlich langsamer als der Anstieg während des exponentiellen Wachstums. Das kann damit zusammenhängen, dass die Trübung auch durch Anhäufung bakterieller Stoffwechselprodukte oder durch die abgestorbenen Zellen selbst beeinträchtigt wird. Die Wachstumskurve wird zum Ende der Messungen also wieder flacher (Kordes, 2007). Exponentiell wachsende Zellen sind in der Regel am gesündesten und sollten daher für Untersuchungen auch aus dieser Phase entnommen werden (Madigan et al., 2001). Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche die Bakterien nach 8 Stunden entnommen. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Streptokokken im letzten Drittel der exponentiellen Phase.

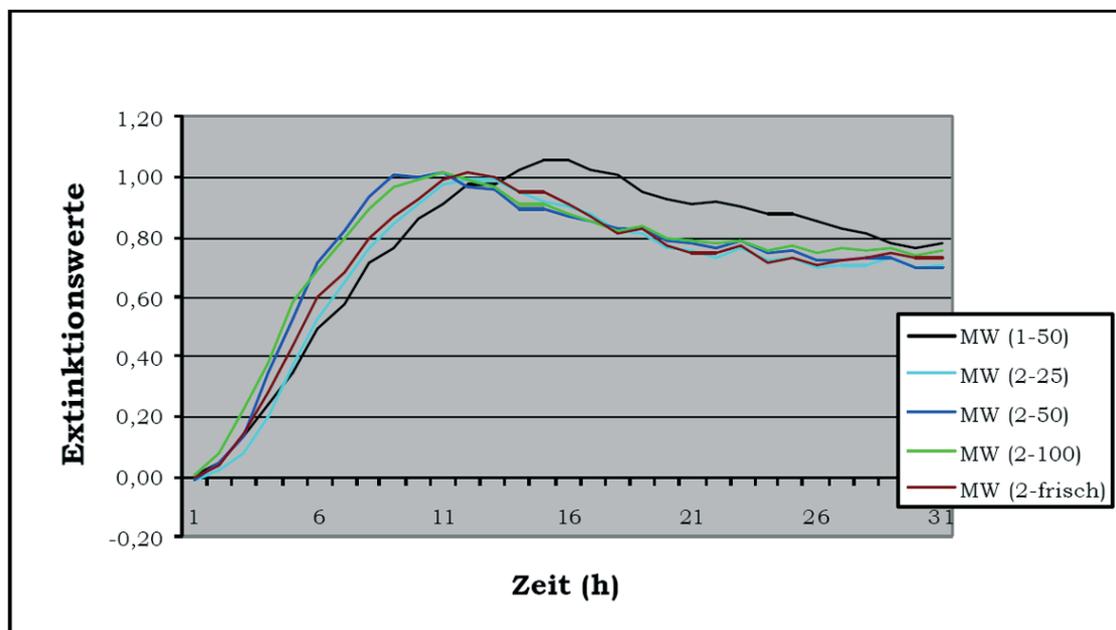


Abb. 6: Ermittelte Wachstumskurve von *S. mutans* aus den gemittelten Daten aller Zelldichtemessungen aus zwei Versuchsreihen (aus: Kordes, 2007)

Hierbei wurden durch fotometrische Messungen bestimmte Extinktionswerte gegen die Zeit aufgetragen. Man erkennt die für bakterielles Wachstum typische Einteilung in vier Phasen:

1. Lag-Phase, 2. exponentielle Phase, 3. stationäre Phase, 4. Absterbephase (vgl. Abb. 5)

Für die Durchführung der Versuchsreihe lagen zwei Expressionen monoklonaler Antikörper (Anti SA I / II) von Maus und Mensch vor (Abb. 7). Die erste Expression enthielt zum einen den humanen Antikörper in Form eines Präzipitates und als dessen Dialyse, also in verdünnter Form. Zum anderen enthielt die Expression den Maus-Antikörper als Präzipitat und dessen Dialyse. Die zweite Expression enthielt ebenfalls den humanen Antikörper als Präzipitat und Dialyse, sowie den Maus-Antikörper als Präzipitat und Dialyse. Es gab also insgesamt 8 Proben.

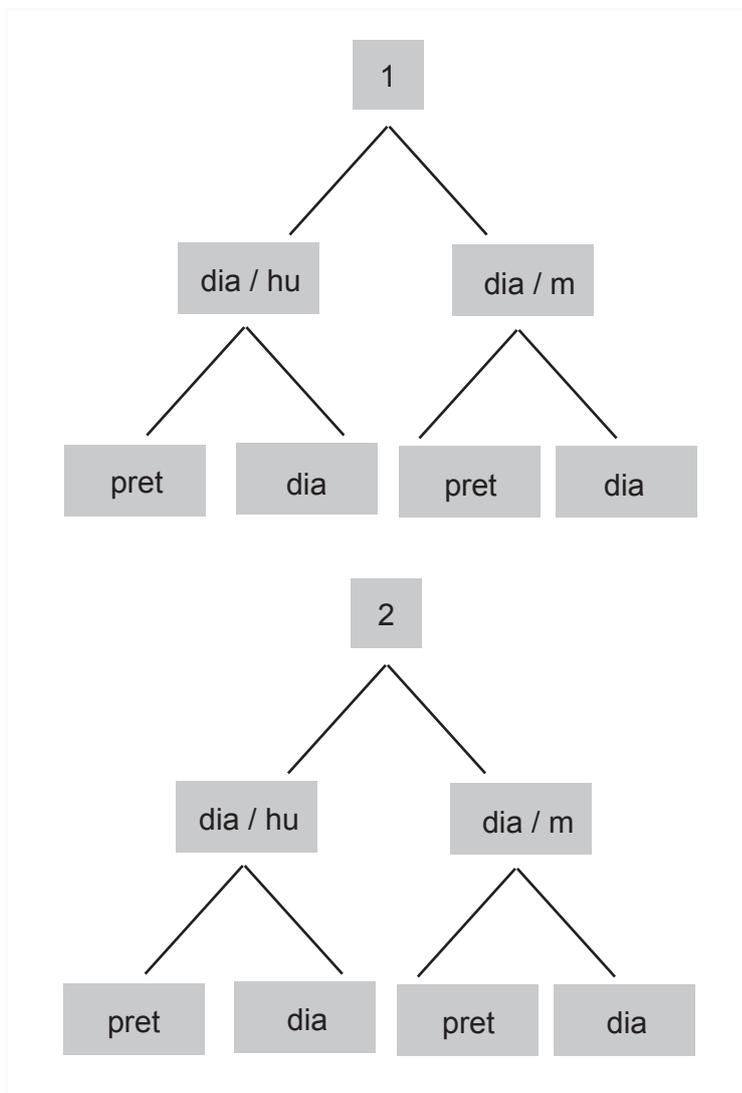


Abb. 7: Schema zur Darstellung der Art und Herkunft der in der Studie verwendeten Immunglobuline, welche in zwei Expressionen vorlagen.

In der ersten Expression wurden humane Diabodies (dia / hu) und Maus-Diabodies (dia / m) generiert. Der humane Diabody (dia / hu) lag zum einen als Dialyse (dia), zum anderen als Präzipitat (pret) vor. Der Maus-Antikörper (dia / m) lag ebenfalls als Dialyse (dia) und als Präzipitat (pret) vor. In der zweiten Expression wurde erneut ein humaner Diabody (dia / hu) und ein Maus-Diabody (dia / m) hergestellt. Dabei gab es auch jeweils eine Dialyse (dia) und das Präzipitat (pret) des Antikörpers.

1, 2	Expression
dia / hu	Dialyse Mensch
dia / m	Dialyse Maus
pret	Präzipitat
dia	Dialyse

	Expression 1	Expression 2
Maus	1 „dia m“ Guy's 13 Dialyse	2 „dia m“ Guy's 13 Dialyse
	23 pret / dia m pret 1	23 pret / dia m pret 2
Mensch	1 „dia hu“ Dialyse	2 „dia hu“ Dialyse
	24 pret / dia hu pret 1	24 pret / dia hu pret 2

Tab. 1: Kodierung der 8 Proben:

m	Maus
hu	Mensch
dia	Dialyse
pret/dia	Präzipitat der Dialyse

Aus der ersten Expression stammen die zwei Proben, die mit einer 1 markiert waren. Sie enthalten die Dialyse des humanen Antikörpers sowie die Dialyse des Maus-Antikörpers. Des Weiteren entstammen dieser Expression die Probe 23 pret 1, das Präzipitat des Maus-Antikörpers und die Probe 24 pret 1, das Präzipitat des humanen Antikörpers. Die Proben, die mit einer 2 markiert waren, sind der zweiten Expression zuzuordnen. Sie enthalten die Dialyse des humanen Antikörpers und die des Maus-Antikörpers. Die Präzipitate dieser Dialysen befinden sich entsprechend in den Proben 23 pret 2 (Maus) und 24 pret 2 (Mensch).

Die Antikörper-Proben stammten aus dem Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie Aachen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Barth. Es handelte sich hierbei um den humanen Antikörper D12 und den Maus-Antikörper Guy's 13. Mit Hilfe des Maus-Antikörpers Guy's 13, der nachweislich die Kolonisation von S.m. verhindert, konnte biotechnologisch ein entsprechender humaner Antikörper generiert werden. Dies geschah durch einen Prozess, den man als Chain-shuffling bezeichnet (vgl. Kapitel 1.4.5.4.1). Die so hergestellten Antikörper wurden anschließend durch ELISA auf ihre Spezifität gegenüber SA I/II und S.m. getestet. Die Reinheit der Antikörperfragmente wurde mittels Gelelektrophorese unter Benutzung von Comassie gefärbten SDS-Gelen überprüft (Kupper et al., 2005).

Die von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) gelieferten Streptokokken des Stammes Clarke 1924 DSM 20523 wurden im Vorfeld auf eine Agarplatte überimpft und im Brutschrank bei 37°C bebrütet. Nach der Koloniebildung wurden einzelne Streptokokkenkolonien mit der Impföse auf eine weitere Agarplatte übertragen und wiederum bebrütet. In der Folge konnten die Streptokokken in ein Glasröhrchen mit Nährmedium (AB-Medium III, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) überimpft werden, welches anschließend in einem Schüttelbad (Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) bei einer konstanten Temperatur von 37°C bebrütet wurde. Von dieser Lösung wurden nun kontinuierlich ca. alle 2 Tage 50 µl Streptokokkensuspension entnommen und in ein steriles Glasröhrchen mit 5 ml Nährmedium überimpft.

Aufgrund von Voruntersuchungen wurde eine optimale Bebrütungsdauer der Streptokokkensuspension in frischer Nährlösung vor den eigentlichen Versuchen von 16,5 h bei 37°C angenommen.

2.2 Versuche

Zunächst wurden 5 ml AB-Medium (WPA Bio wave®) in einem Röhrchen mit 100 µl Streptokokken-Suspension beimpft. Dieses Gemisch wurde im Anschluss für 8 Stunden im Schüttelbad bei einer Temperatur von 37°C bebrütet.

In der Zwischenzeit wurden 8 Objektträger und 5 Deckgläser für den Versuch vorbereitet. Um den Versuch unter aseptischen Verhältnissen ablaufen lassen zu können, wurden die Objektträger und Deckgläser zunächst mit 70%igem Alkohol gereinigt und anschließend mit Aqua dest. abgespült. Nach der Trocknung mit Hilfe von sterilem Filterpapier wurden die Gläser mit einem Bleistift beschriftet und bis zum Versuchsbeginn in Petrischalen unter einer sterilen Werkbank gelagert. Die Objektträger dienen zu dem Zweck, die zu einem späteren Zeitpunkt darauf pipettierten Proben unter einem Lichtmikroskop analysieren zu können. Mit Hilfe der auf die Deckgläschen pipettierten Proben sollte eine Analyse unter dem Rasterelektronenmikroskop erfolgen.

	1	2	Expression
A	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „dia hu“	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „dia hu“	1
B	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „dia m“	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „dia m“	1
C	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „pret / dia hu“	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „pret / dia hu“	1
D	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „pret / dia m“	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „pret / dia m“	1
E	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „dia hu“	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „dia hu“	2
F	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „dia m“	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „dia m“	2
G	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „pret / dia hu“	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „pret / dia hu“	2
H	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „pret / dia m“	20 µl S.m.- Suspension + 5 µl Antikörper „pret / dia m“	2

Tab. 2: Pipettierschema (A - H und 1 - 2 bezeichnen das Lochplattenraster)

Nachdem die Streptokokken-Suspension im Schüttelbad 8 Stunden bebrütet worden war, wurde zunächst die Extinktion mit Hilfe eines Zelldichtemessgerätes (WPA biowave CO 8000®) bestimmt. Anschließend wurden jeweils 20 µl der Streptokokken-Suspension mit 5 µl der Antikörper nach dem Schema der Tabelle 2 in eine Lochplatte (TC-Platte) pipettiert und erneut für eine Stunde im Schüttelbad bei 37°C bebrütet (Abb. 6). Die Felder A1-D1 und A2-D2 enthalten Antikörper, die der ersten Expression entstammen, die Felder E1-H1 und E2-H2 enthalten Antikörper aus der zweiten Expression.

Nach einer Stunde wurden die Lösungen auf die Deckgläser und Objektträger pipettiert. Die Deckgläser wurden mit Tropfen einer Größe von 10 µl beschickt. Deckglas I enthielt jeweils einen Tropfen der Lösungen A1-D1, Deckglas II jeweils einen Tropfen von E1-H1, Deckglas III jeweils einen Tropfen A2-D2, Deckglas IV jeweils einen Tropfen E2-H2 und Deckglas V jeweils einen Tropfen reiner S.m.-Suspension als Kontrollwert (Abb. 8).

I		II		III		IV		V	
A 1	B 1	E 1	F 1	A 2	B 2	E 2	F 2	S.m.	S.m.
C 1	D 1	G 1	H 1	C 2	D 2	G 2	H 2	S.m.	S.m.

Abb. 8: Schema der Anordnung der Versuchsproben auf den Deckgläsern

I-V Nummerierung der Deckgläser
 A1-H2 Versuchsprobenbezeichnung (vgl. Tab. 2)
 S.m. reine Streptokokkensuspension

Bei den Objektträgern war eine Tropfengröße von 5 µl ausreichend. Objektträger I1 enthielt einen Tropfen S.m., sowie einen Tropfen A1 und B1, I2 enthielt einen Tropfen S.m., sowie einen Tropfen A2 und B2, II1 enthielt einen Tropfen S.m., sowie einen Tropfen C1 und B1, II2 einen Tropfen S.m., sowie einen Tropfen C2 und B2, III1 enthielt einen Tropfen S.m. und einen Tropfen E1 und F1, III2 einen Tropfen S.m. und einen Tropfen E2 und F2, Objektträger IV1 enthielt einen Tropfen S.m. sowie einen Tropfen G1 und H1, IV2 enthielt einen Tropfen G2 und H2 (Abb. 9).

Als Vergleichswert wurde auf jeden Objektträger ein Tropfen reiner Streptokokken-Suspension pipettiert, von den fünf Deckgläsern war eines mit vier Tropfen reiner Streptokokken-Suspension beschickt worden, um auch dort eine Kontrollgruppe zu haben.

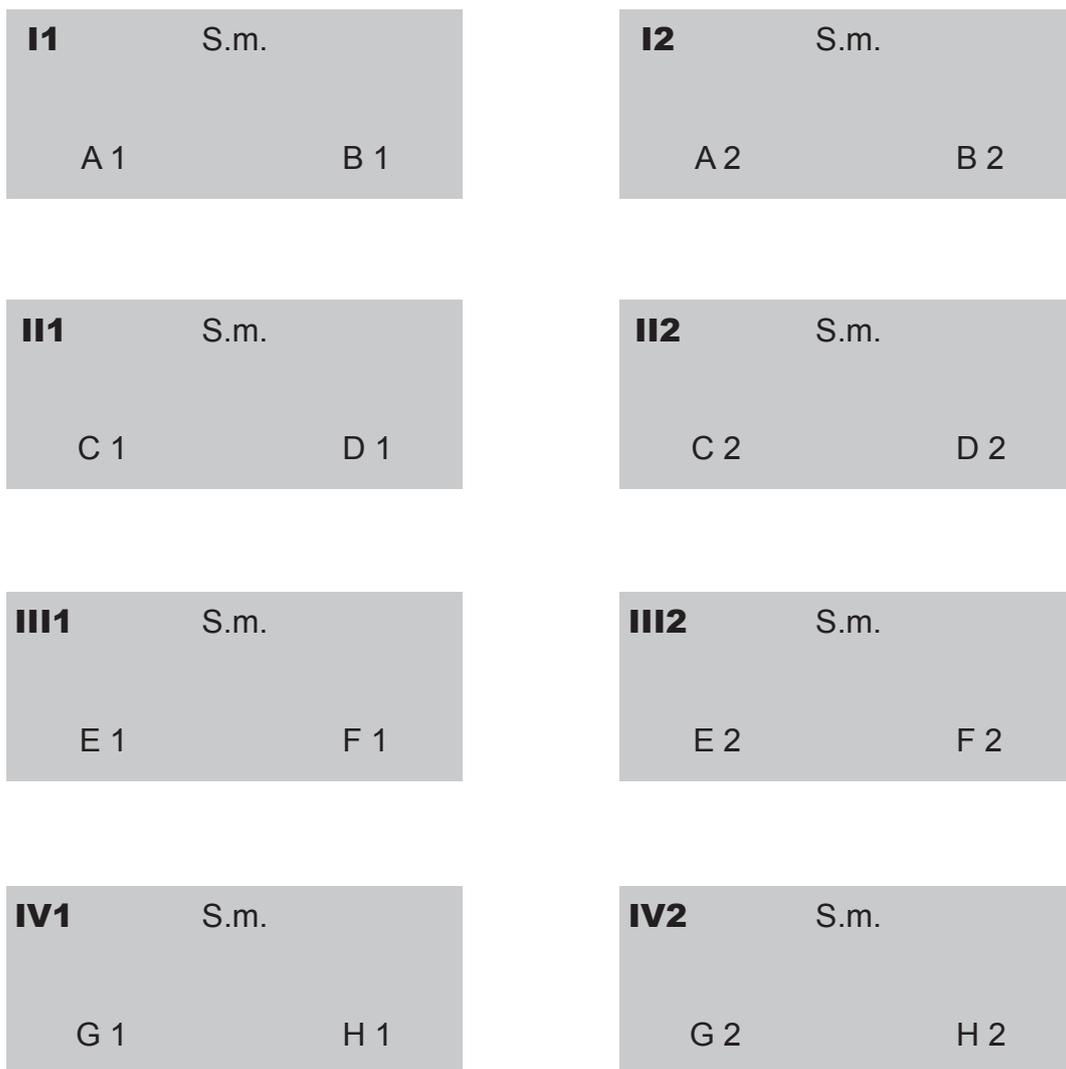


Abb. 9: Schema der Anordnung der Versuchsproben auf den Objektträgern
 I1-IV2 Nummerierung der Deckgläser
 A1-H2 Versuchsprobenbezeichnung (vgl. Tab. 2)
 S.m. reine Streptokokkensuspension

Die Objektträger und Deckgläser wurden in Petrischalen gelegt, mit sterilem Filterpapier abgedeckt und über Nacht zum Trocknen unter eine Werkbank gestellt.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit Gram's-Lösung (Diagnostik Merck) gefärbt. Dazu wurden die Objektträger zunächst für 1 Minute komplett mit Kristallviolett-Lösung bedeckt und anschließend mit Lugols'scher Lösung abgespült. Danach wurden sie mit derselben Lösung für 1 Minute bedeckt. Im Anschluss daran erfolgte das Abspülen mit destilliertem Wasser und das 15 Sekunden lange Abspülen mit Entfärbelösung. Daraufhin wurden die Objektträger wieder mit destilliertem Wasser abgespült

und mit Safranin-Lösung bedeckt. Nach einer Minute wurde diese Lösung mit Aqua dest. abgespült und die Objektträger 2 Stunden luftgetrocknet. Die gefärbten und getrockneten Proben wurden dann mit einem Lichtmikroskop (Dialux 20 EB[®], Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) unter Verwendung eines Blaufilters fotografisch dokumentiert. Dabei wurde zunächst von jeder Probe jeweils eine Aufnahme mit 10facher Objektivvergrößerung und Wasserimmersion gemacht. Außerdem wurden bei 1000facher Vergrößerung fünf für die jeweilige Probe typische Gesichtsfelder ausgesucht und ebenfalls fotografiert. Die Deckgläser wurden für die Betrachtung unter dem REM auf spezielle Probenteller (Cellstar[®]) geklebt und gesputtert. Bei der späteren Betrachtung unter dem REM wurden Aufnahmen jeder Probe in 20facher, 100facher, 2000facher, 3500facher, sowie 6000facher Vergrößerung gespeichert.

Die Versuchsreihe wurde insgesamt vier Mal durchgeführt. Die Proben der zweiten, dritten und vierten Versuchsreihe wurden allerdings nur mit Hilfe eines Lichtmikroskops analysiert und fotografisch dokumentiert. Auf die Betrachtung mit dem Rasterelektronenmikroskop wurde dagegen verzichtet, da nur das Lichtmikroskop für die Analyse relevante Ergebnisse erbrachte.

2.3 Datenauswertung und Statistik

Die Auswertung der Dias erfolgte durch die Darstellung der Ergebnisse in Vergleichstabellen. Zunächst wurde untersucht, bei welchen Proben Agglutination zu erkennen ist und bei welchen nicht (s. Kap. 3.1, Tab. 4). Ein (+) - Zeichen steht für vorhandene Agglutination, ein (-) - Zeichen besagt, dass keine Agglutination zu erkennen ist und ein (+/-) - Zeichen steht für den Fall, dass keine sichere Aussage bezüglich einer stattgefundenen Agglutination getroffen werden kann. Ein Feld ohne Zeichen findet sich in dem Fall, wenn eine Beurteilung der Situation nicht möglich war. Gründe dafür können eine ungenügende Färbung der Proben oder eine zu geringe Menge von Bakterien in der Probe sein (s. Tab. 3). Dabei ist für eine positive Bewertung das Vorhandensein von Agglomeraten ausschlaggebend, egal welcher Größe, welcher Menge und welcher Form. Außerdem ist bei diesem Vergleich noch nicht von Bedeutung, welchen Ursprungs und in welcher Verdünnung die Immunglobuline vorliegen. Es handelt sich also um reine ja/nein Entscheidungen, die zeigen sollen, ob Agglutination stattfindet oder nicht.

Im weiteren sollte dargestellt werden, ob die Verwendung des Präzipitats, bzw. der Dialyse, sich unterschiedlich auf die Agglutination auswirkt (s. Kap. 3.2, Tab. 5). Sie basiert dabei auf den Ergebnissen von Tabelle 4, d.h. es werden nur die dort positiv bewerteten Proben in die Auswertung mit einbezogen.

Darüber hinaus wurde getestet, ob die Herkunft des Antikörpers (Maus / Mensch) unterschiedliche Auswirkungen auf die Agglutination von *S.mutans* (s. Kap. 3.3, Tab. 6). Wiederum werden dort nur die Proben verglichen, die in Tabelle 4 positiv waren.

Die Ergebnisse statistisch überprüft.. Dies geschah unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms PASW Statistics® (ehemals SPSS®, SPSS Inc. Chicago, USA). Bei der Auswertung wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Das Signifikanzniveau wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der Agglutination

Beim Vergleich der Versuchsreihen muss beachtet werden, dass an den vier Tagen jeweils unterschiedliche Extinktionswerte der Bakteriensuspensionen vorlagen (Tab. 3). Die Bezeichnungen A-D entsprechen den vier Versuchsreihen, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden. Bei der ersten Versuchsdurchführung lag die Extinktion bei 0,20 (A), beim zweiten mal bei 0,40 (B), die Bakteriensuspension der dritten Versuchsreihe hatte einen Extinktionswert von 0,43 (C) und bei der vierten Versuchsdurchführung lag die Extinktion bei 0,60 (D) (Tab. 3). Eine geringere Extinktion ist gleichbedeutend mit einer geringeren Zelldichte, das heißt einer geringeren Anzahl von Bakterien. Die Extinktionen betragen:

Versuchsreihe	Extinktion
A	0,20
B	0,40
C	0,43
D	0,60

Tab. 3: Extinktionswerte der Primärsuspension bei den Versuchsreihen A - D

Um beurteilen zu können, ob die eingesetzten Immunglobuline zu einer Agglutination von *Streptococcus mutans* führen, wurden die mikroskopischen Aufnahmen der Proben, bei denen Immunglobuline zu der Streptokokken-Suspension hinzugefügt wurden, mit denen verglichen, die nur die reine Bakteriensuspension enthielten, also als Kontrolle fungierten. Zu diesem Zweck wurde eine Vergleichstabelle aufgestellt, um die Ergebnisse grafisch besser darstellen zu können.

Die Auswertung der Vergleichstabelle ergibt, dass Immunglobuline in der Lage sind, eine Agglutination von S.m. zu bewirken (Abb. 10 a/b). Agglomerate finden sich in der überwiegenden Zahl der Proben.

	Immunglobulin															
	dia / hu				pret / hu				dia / m				pret / m			
Reihe	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Expression 1	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	+	+/-	+	+/-	+	-	+	+	+
	+/-	+	-	+	-	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	+	+/-	+
Expression 2	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	+	-	+	-	+	+/-	-
	+	+	+	+	-	-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	-	+	+

Tab. 4: Nachweis der Agglutination. Vergleich der Proben nach Zugabe der verschiedenen Antikörper mit der Kontrolle, also reiner S.m.-Suspension. Von den insgesamt 64 Proben konnten 47 mit eindeutig positiv, bzw. negativ bewertet werden. Bei 17 Proben konnte keine sichere Aussage bezüglich der Agglutination getroffen werden. Agglutination fand bei 31 der 47 Fälle, keine Agglutination bei 16 der 47 Fälle statt.

dia / hu Dialyse des humanen Immunglobulins
 pret / hu Präzipitat des humanen Immunglobulins
 dia / m Dialyse des Maus- Immunglobulins
 pret / m Präzipitat des Maus- Immunglobulins

A -D Versuchsreihe

(+) Agglutination zu erkennen
 (-) keine Agglutination zu erkennen
 (+/-) keine sichere Aussage, ob Agglutination stattgefunden hat

			Gesamt
messung	keine Verklumpung	Anzahl	16
		% innerhalb von messung	100,0%
		% innerhalb von pret	34,0%
		% der Gesamtzahl	34,0%
	Verklumpung	Anzahl	31
		% innerhalb von messung	100,0%
		% innerhalb von pret	66,0%
		% der Gesamtzahl	66,0%
Gesamt	Anzahl		47
	% innerhalb von messung		100,0%
	% innerhalb von pret		100,0%
	% der Gesamtzahl		100,0%

Tab. 5: Kreuztabelle

Verteilung der Proben, in der Agglutination (Verklumpung) bzw. keine Agglutination, unabhängig von Verdünnung und Herkunft (Maus, bzw. humaner Antikörper), stattgefunden hat. In 31 (66%) von 47 (100%) Fällen, bei denen eine sichere Aussage bezüglich der Agglutination getroffen werden konnte, fand Agglutination statt. In 16 (34%) der 47 Fälle fand keine Agglutination statt.

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	3,058 ^a	1	,080
Kontinuitätskorrektur ^b	2,066	1	,151
Likelihood-Quotient	3,172	1	,075
Exakter Test nach Fisher			
Zusammenhang linear-mit-linear	2,992	1	,084
Anzahl der gültigen Fälle	47		

Tab. 6: Chi-Quadrat-Test.

Zusammenhang des Agglutinationsverhaltens von Dialyse im Gegensatz zu Präzipitat. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Häufigkeiten ($\chi^2 = 3,06$ und $p = 0,08$).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse (Tabelle 5) zeigt, dass Agglutination in 66% der Fälle (31) stattgefunden hat. In 33% der Fälle (16) trat dagegen keine Agglutination auf. Dieser Unterschied des Auftretens ist nicht zufällig ($p < 0,04$). Die Nullhypothese, dass die Kategorie Verklumpung und die Kategorie Nicht-Verklumpung jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% auftreten, ist mit einer 4,1%igen Irrtumswahrscheinlichkeit abzulehnen.

Tabelle 6 zeigt das Ergebnis der Auswertung der ersten Untersuchung hinsichtlich der Frage, ob die Verwendung der Dialyse bzw. des Präzipitats das Agglutinationsverhalten beeinflusst. Die Hypothese, dass die Agglutination von der Messung mit Dialyse oder Präzipitat unabhängig ist, kann auf einem Signifikanzniveau von $p = 0,08$ zwar nicht verworfen werden, jedoch ist dieser Zusammenhang damit als marginal signifikant zu bezeichnen ($\chi^2 = 3,06$). Detailliertere Erkenntnisse bezüglich dieser Hypothese liefern die folgenden Tabellen (Tab. 7 und 8).

Bei einem Vergleich der Versuchsreihen untereinander fällt auf, dass die Anzahl der Bewertungen, insbesondere der positiven Bewertungen bei Versuch D, also dem Versuch, als die Bakteriensuspension eine Extinktion von 0,6 aufwies, am höchsten war. Dies deutet darauf hin, dass zur Untersuchung des Agglutinationsverhaltens, eine Zelldichte, die in dieser Größenordnung liegt, optimal ist. Dort befinden sich weder zu wenige Bakterien in der Probe, die kaum Agglutinationen entstehen lassen, noch sind so viele Zellen vorhanden, dass keine einzelnen Agglomerate mehr zu erkennen sind.

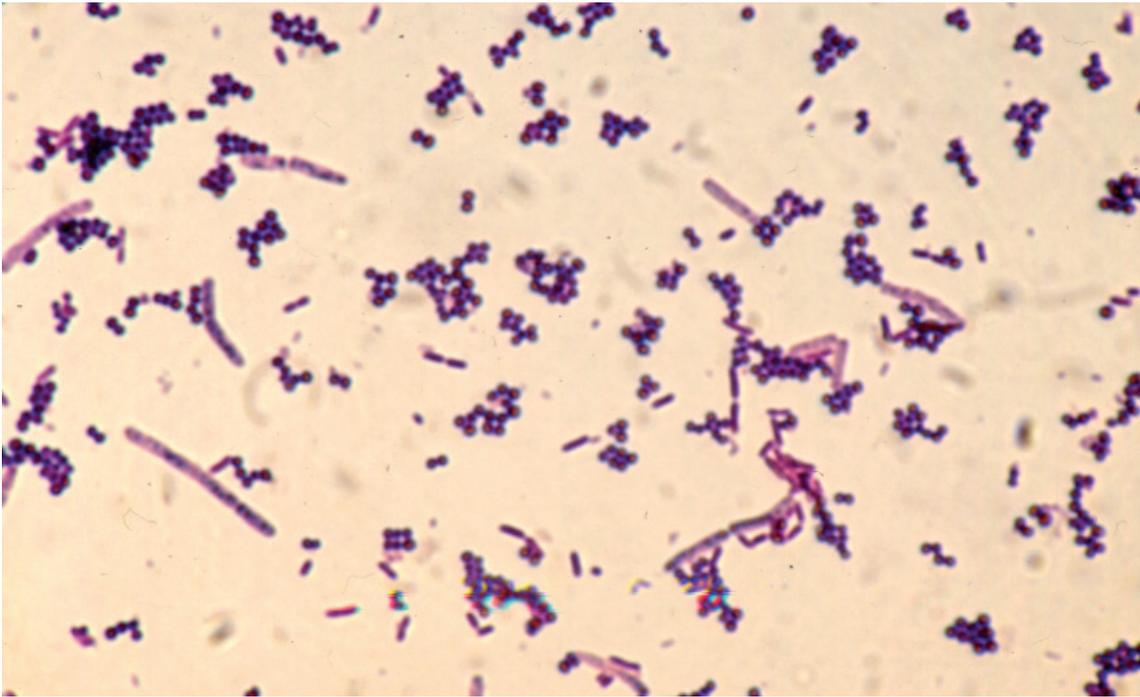


Abb. 10 a: Kontrolle reine S.m.-Suspension
Gramfärbung, Wasserimmersionsmikroskopie, 1000fache Vergrößerung
Zu erkennen sind einzelne Streptokokken und Agglomerationen kleiner Anzahl und geringer Größe.

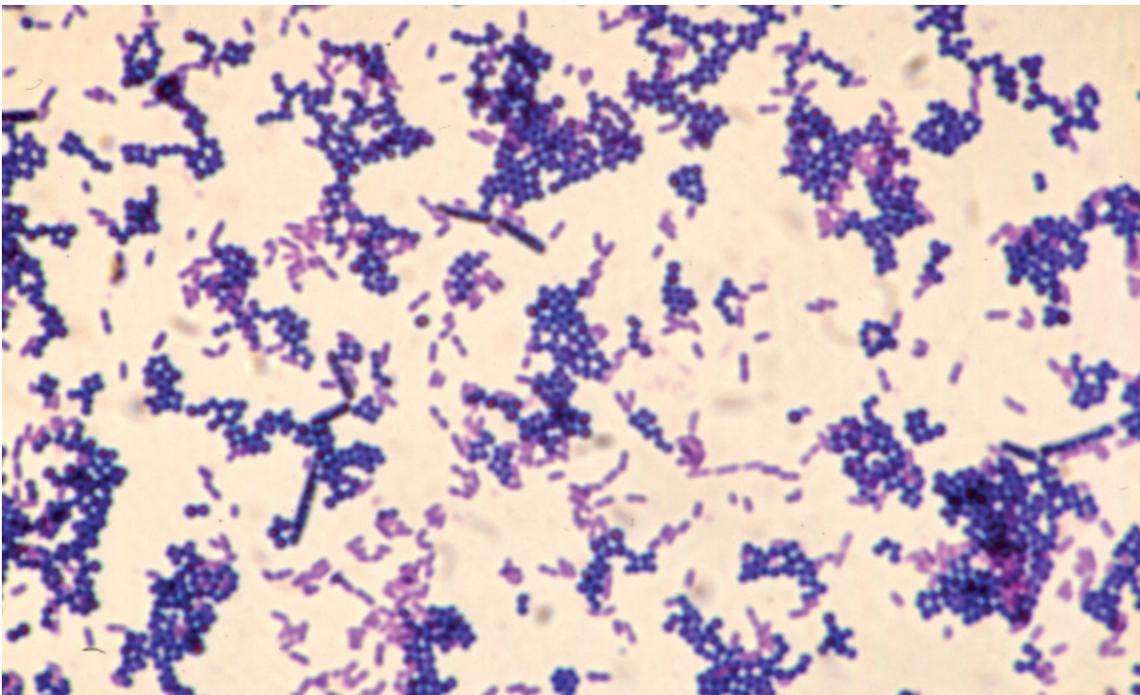


Abb. 10 b: Streptokokken-Suspension versetzt mit dem Präzipitat des humanen Antikörpers (pret / hu 1)
Gramfärbung, Wasserimmersionsmikroskopie, 1000fache Vergrößerung
Die Streptokokken liegen hier in überwiegend in stark ausgeprägten Agglomerationen vor.

3.2 Vergleich Dialyse vs. Präzipitat

Die folgende Tabelle soll verdeutlichen, ob die Verwendung der Dialyse im Gegensatz zur Verwendung des entsprechenden Präzipitats zu Unterschieden hinsichtlich der Agglutination führt. Dabei ist zu beachten, dass nur diejenigen Proben in den Vergleich miteinbezogen werden, bei denen laut Tabelle 4 eine Agglutination stattgefunden hat. Ausschlaggebend für eine positive (+) Bewertung ist dabei die Größe der Agglomerate, nicht die jeweilige Menge der Agglomerate. Das heißt, zeigt die Dialyseprobe viele kleine Agglutinate und die Probe mit dem Präzipitat wenige große Agglomerate, so wird Letztere positiv bewertet.

A: keine auswertbaren Proben

B:

dia / m 1	=	dia / hu 1'	-	dia / hu 2	-	dia / m 2	-
pret / m 1	=	pret / hu 1'	+	pret / hu 2	+	pret / m 2	+

C:

dia / hu 2	-
pret / hu 2	+

D:

dia / hu 1'	-	dia / m 1	-	dia / m 1'	=
pret / hu 1'	+	pret / m 1	+	pret / m 1'	=
dia / hu 2	=	dia / hu 2'	=	dia / m 2'	+
pret / hu 2	=	pret / hu 2'	=	pret / m 2'	-

Tab. 7: Vergleich der Agglutination nach Zugabe des Präzipitats, bzw. der Dialyse. (+) bei der Probe, bei der mehr Agglutination im Sinne von größeren Agglomeraten stattgefunden hat. Man erkennt, dass Proben, die mit dem Präzipitat versehen wurden, die Bildung größerer Agglomerate zeigen. Je höher die Verdünnung des Immunglobulins, desto geringer fällt die Agglutination aus.

A - D	Versuchsreihen	dia	Dialyse	1	entspr. A1 - D1 (vgl. Tab. 2)
+	mehr Agglutination	pret	Präzipitat	1'	entspr. A2 - D2 (vgl. Tab. 2)
-	weniger Agglutination	hu	Mensch	2	entspr. E1 - H1 (vgl. Tab. 2)
=	gleich viel Agglutination	m	Maus	2'	entspr. E2 - H2 (vgl. Tab. 2)

Die Auswertung zeigt, dass die Verwendung der Dialyse im Gegensatz zur Verwendung des jeweiligen Präzipitats nicht immer zu unterschiedlich starken Agglutinationen führt (Abb. 11 a-d). Gibt es verschieden ausgeprägte Agglutinationen, so findet sich die stärkere Agglutination hauptsächlich bei den Proben mit dem Präzipitat. Dort finden sich dann in der Regel größere Agglomerationen als bei der Vergleichsprobe mit der Dialyse.

			messung		Gesamt
			-1,00	1,00	
pret	dia	Anzahl	6	1	7
		% innerhalb von pret	85,7%	14,3%	100,0%
		% innerhalb von messung	85,7%	14,3%	50,0%
	pret	Anzahl	1	6	7
		% innerhalb von pret	14,3%	85,7%	100,0%
		% innerhalb von messung	14,3%	85,7%	50,0%
Gesamt		Anzahl	7	7	14
		% innerhalb von pret	50,0%	50,0%	100,0%
		% innerhalb von messung	100,0%	100,0%	100,0%

Tab. 8: Kreuztabelle

Ergebnisse der Verteilung des Agglutinationsverhaltens („1“ = mehr Agglutination, „-1“ = weniger Agglutination) zwischen Dialyse (dia) und Präzipitat (pret). Bei 6 der insgesamt 7 Proben fand bei dem Präzipitat mehr Agglutination statt. Entsprechend fand lediglich bei einer Probe mehr Agglutination bei der Dialyse statt.

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	7,143 ^a	1	,008		
Kontinuitätskorrektur ^b	4,571	1	,033		
Likelihood-Quotient	7,925	1	,005		
Exakter Test nach Fisher				,029	,015
Zusammenhang linear-mit-linear	6,633	1	,010		
Anzahl der gültigen Fälle	14				

Tab. 9: Chi-Quadrat-Test.

Zusammenhang des Agglutinationsverhaltens von Präzipitat im Gegensatz zu Dialyse. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Häufigkeiten ($\chi^2 = 7,14$ und $p = 0,03$).

Die statistische Auswertung zeigt, dass das Auftreten der Kategorie „+“ und „-“ nicht gleich häufig ist ($\chi^2 = 7,14$). Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei $p = 0,03$ bei einer zweiseitigen Signifikanz. Die Kategorien treten also nicht mit gleicher Wahrscheinlichkeit auf.

Beide Ergebnisse deuten also darauf hin, dass die Verdünnung des Immunglobulins Einfluss auf das Ausmaß der Agglutination zu haben scheint. Je größer die Verdünnung des Immunglobulins ist, desto geringer fällt die Agglutination aus.

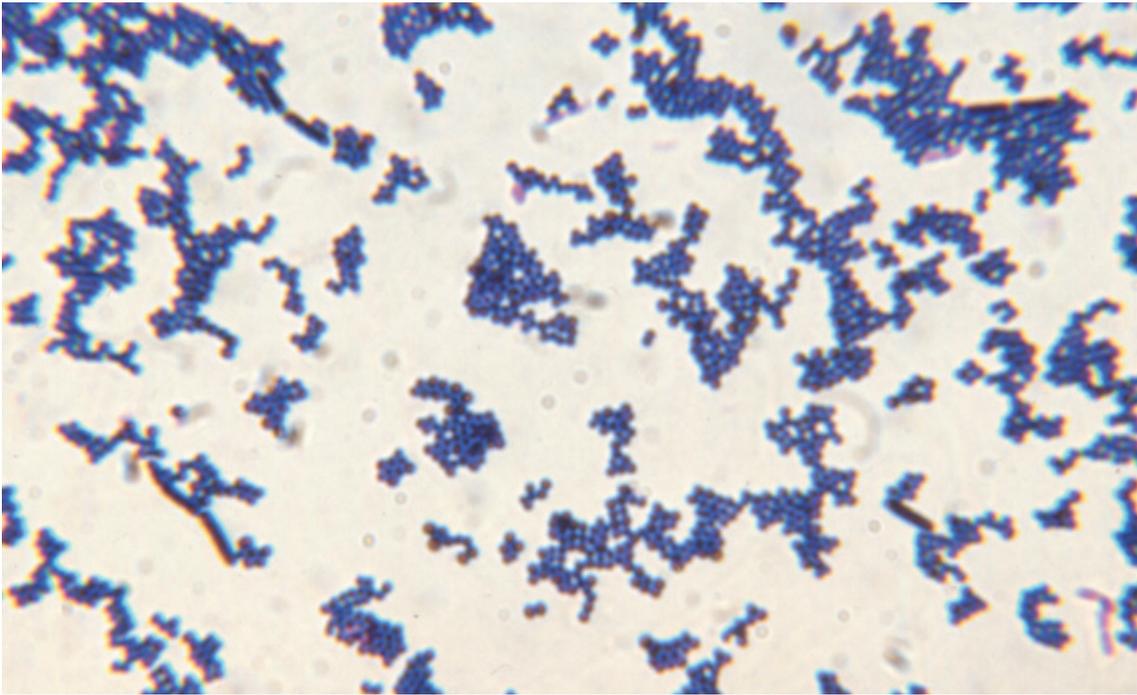


Abb. 11 a: Streptokokken-Suspension versetzt mit der Dialyse des humanen Antikörpers (dia / hu 1)
Gramfärbung, Wasserimmersionsmikroskopie, 1000fache Vergrößerung
Die Streptokokken liegen in mittelgroßen Agglomeraten vor.

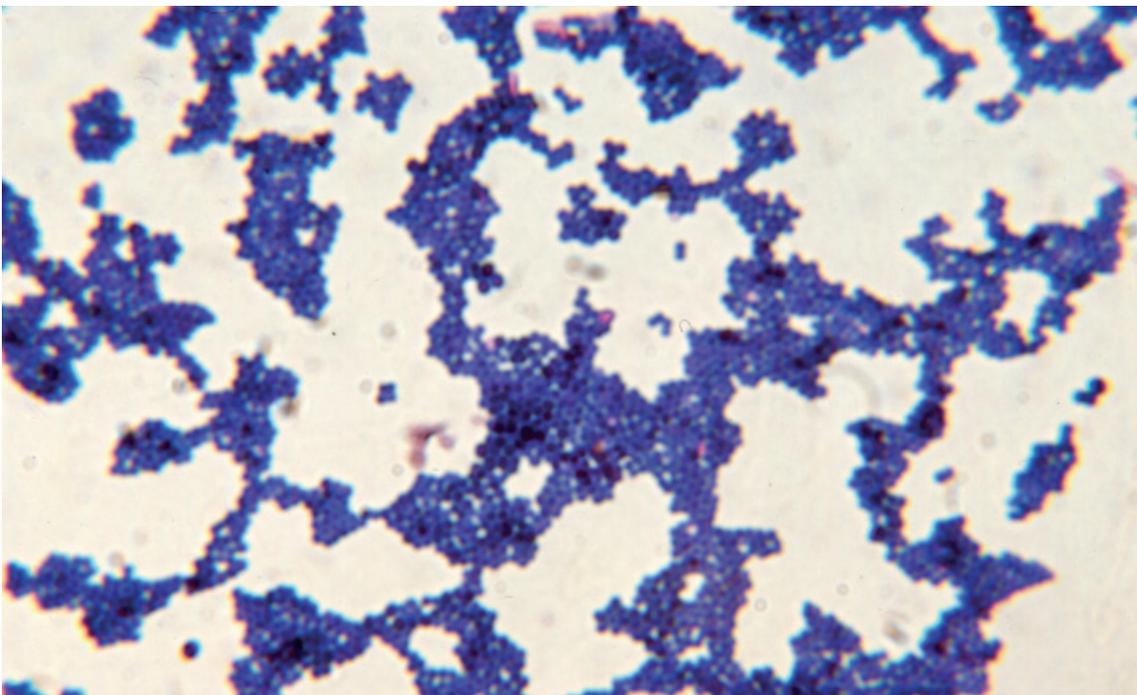


Abb. 11 b: Streptokokken-Suspension versetzt mit dem Präzipitat des humanen Antikörpers (pret / hu 1)
Gramfärbung, Wasserimmersionsmikroskopie, 1000fache Vergrößerung
Die Streptokokken liegen in großen Agglomeraten vor.

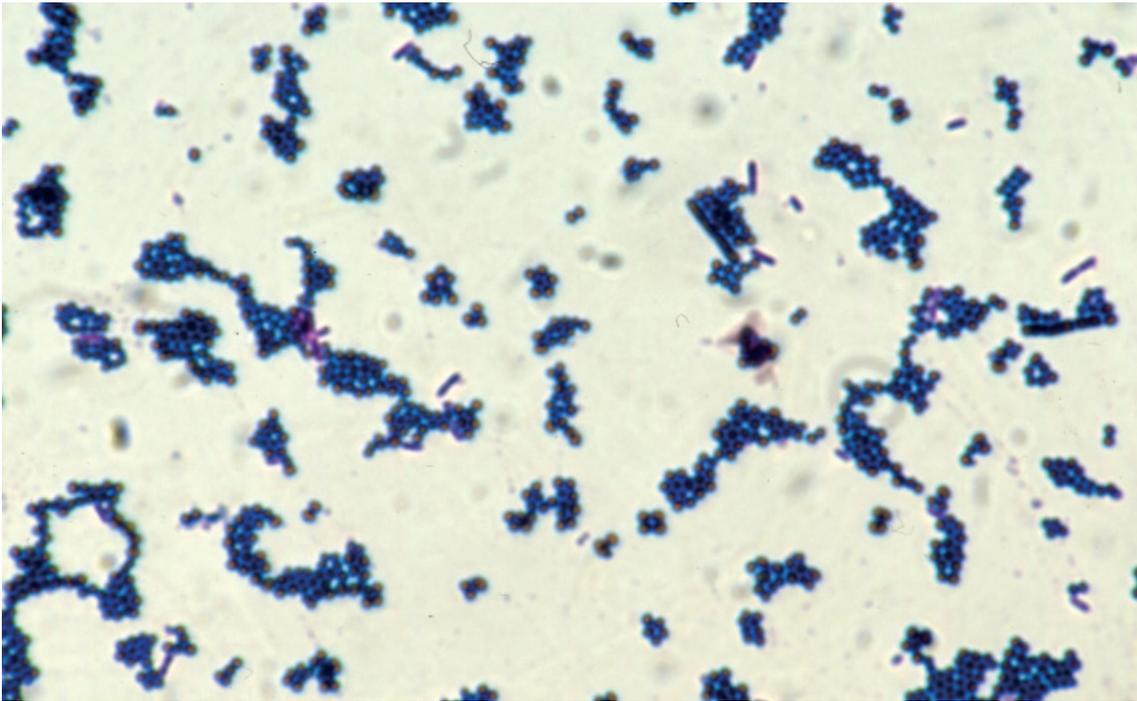


Abb. 11 c: Streptokokken-Suspension versetzt mit der Dialyse des Maus-Antikörpers (dia / m 1)
Gramfärbung, Wasserimmersionsmikroskopie, 1000fache Vergrößerung
Die Streptokokken liegen in mittelgroßen Agglomeraten vor.

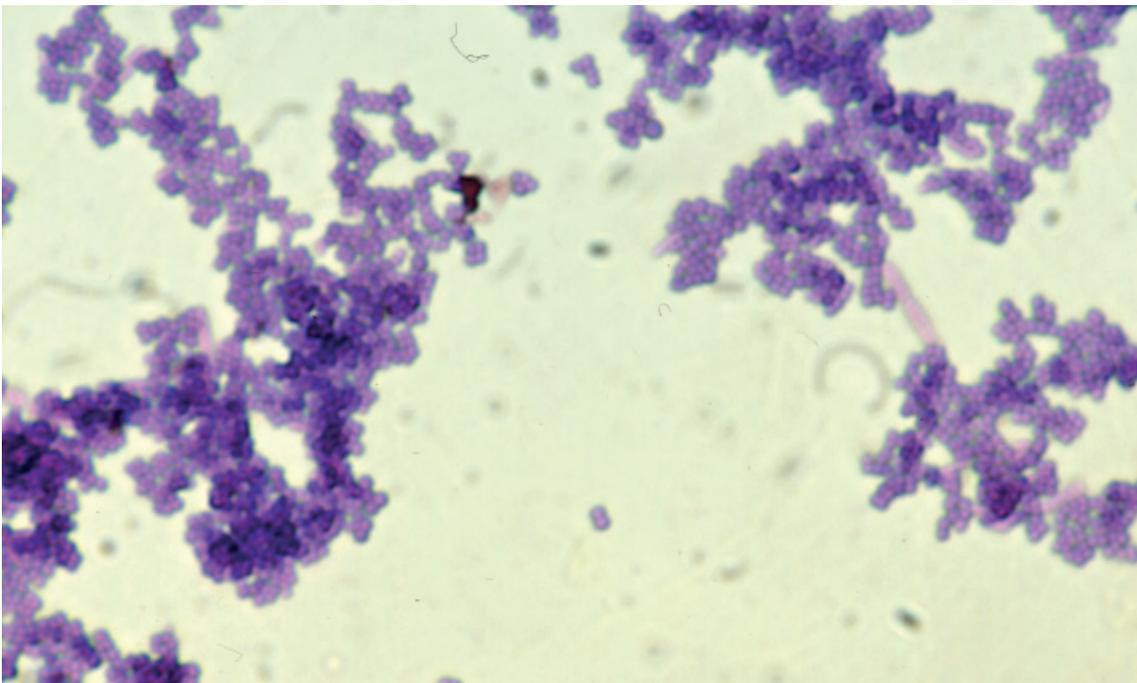


Abb. 11 d: Streptokokken-Suspension versetzt mit dem Präzipitat des Maus-Antikörpers (pret / m 2)
Gramfärbung, Wasserimmersionsmikroskopie, 1000fache Vergrößerung
Die Streptokokken liegen in großen Agglomeraten vor.

Abb. 11 a-d: Der Vergleich der Proben, die mit der Dialyse versetzt wurden (11 a und 11 c), jeweils humanen und Maus-Ursprungs, mit Proben, die mit dem Präzipitat versehen wurden (11 b und 11 d), zeigt stärkere Agglutination auf Seiten der Proben mit dem Präzipitat.

3.3 Vergleich humaner Antikörper vs. Maus-Antikörper

Die sechste Tabelle gibt Aufschluss darüber, ob es einen Unterschied bezüglich der Agglutination gibt, je nachdem ob zur S.m.-Suspension humane Antikörper oder Maus-Antikörper gegeben wurden. Wieder gibt es eine positive Bewertung für diejenige Probe, bei der eine stärkere Agglutination im Sinne von größeren Agglomeraten stattgefunden hat. Ansonsten gelten die gleichen Bedingungen wie bei der vorherigen Tabelle.

A: keine auswertbaren Proben

B:

pret / hu 1'	+	dia / hu 2	=	pret / hu 2	-
pret / m 1'	-	dia / m 2	=	pret / m 2	+

C: keine auswertbaren Proben

D:

dia / hu 1'	-	pret / hu 1	=	pret / hu 1'	+
dia / m 1'	+	pret / m 1	=	pret / m 1'	-
dia / hu 2	+	dia / hu 2'	-	pret / hu 2'	-
dia / m 2	-	dia / m 2'	+	pret / m 2'	+

Tab. 10: Vergleich der Proben nach Zugabe des humanen Immunglobulins, bzw. des Maus-Antikörpers jeweils in Form des Präzipitats und der Dialyse. (+) bei der Probe, bei der mehr Agglutination im Sinne von größeren Agglomeraten stattgefunden hat. Der Ursprung des Immunglobulins lässt keinen Unterschied im Ausmaß der Agglutination erkennen.

A - D	Versuchsreihen	dia	Dialyse	1	entspr. A1 - D1 (vgl. Tab. 2)
+	mehr Agglutination	pret	Präzipitat	1'	entspr. A2 - D2 (vgl. Tab. 2)
-	weniger Agglutination	hu	Mensch	2	entspr. E1 - H1 (vgl. Tab. 2)
=	gleich viel Agglutination	m	Maus	2'	entspr. E2 - H2 (vgl. Tab. 2)

			messung		Gesamt
			-	1	
hu	maus	Anzahl	3	4	7
		% innerhalb von hu	42,9%	57,1%	100,0%
		% innerhalb von messung	42,9%	57,1%	50,0%
	human	Anzahl	4	3	7
		% innerhalb von hu	57,1%	42,9%	100,0%
		% innerhalb von messung	57,1%	42,9%	50,0%
Gesamt		Anzahl	7	7	14
		% innerhalb von hu	50,0%	50,0%	100,0%
		% innerhalb von messung	100,0%	100,0%	100,0%

Tab. 11: Kreuztabelle

Ergebnisse der Verteilung des Agglutinationsverhaltens („1“ = mehr Agglutination, „-1“ = weniger Agglutination) zwischen Maus und human. Bei 4 der insgesamt 7 Proben fand bei der Maus mehr Agglutination statt. Entsprechend fanden bei drei Proben mehr Agglutination bei dem humanen Antikörper statt.

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,286 ^a	1	,593
Kontinuitätskorrektur ^b	,000	1	1,000
Likelihood-Quotient	,287	1	,592
Exakter Test nach Fisher			
Zusammenhang linear-mit-linear	,265	1	,606
Anzahl der gültigen Fälle	14		

Tab. 12: Chi-Quadrat-Test.

Zusammenhang des Agglutinationsverhaltens von Maus-Antikörpern in Gegensatz zu humanen Antikörpern. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Häufigkeiten ($\chi^2 = 0,29$ und $p = 0,59$).

Die Auswertung der Vergleichstabellen ergibt, dass nicht immer erkennbare Unterschiede zwischen den Proben bestehen (Abb. 12 a-d). Die statistische Auswertung der Ergebnisse bestätigt dies.

Stärkere Agglutination kam bei den Proben, die mit dem Maus-Antikörper versetzt wurden, häufiger vor (4:3). Die Verteilungen des Vorkommens von schwächeren zu stärkeren Agglutinationen unterschieden sich jedoch zwischen verwendeten Maus- und humanen Antikörpern nicht signifikant ($\chi^2 = 0,29$ und $p = 0,59$).

Es zeigt sich, dass es keine eindeutige Tendenz zur Bildung von Agglomeraten in Abhängigkeit der unterschiedlichen Herkunft der Antikörper gibt. Man kann also nicht sagen, dass ein humanes Immunglobulin anders auf das Agglutinationsverhalten von *Streptococcus mutans* wirkt, als ein Immunglobulin, das von einer Maus stammt.

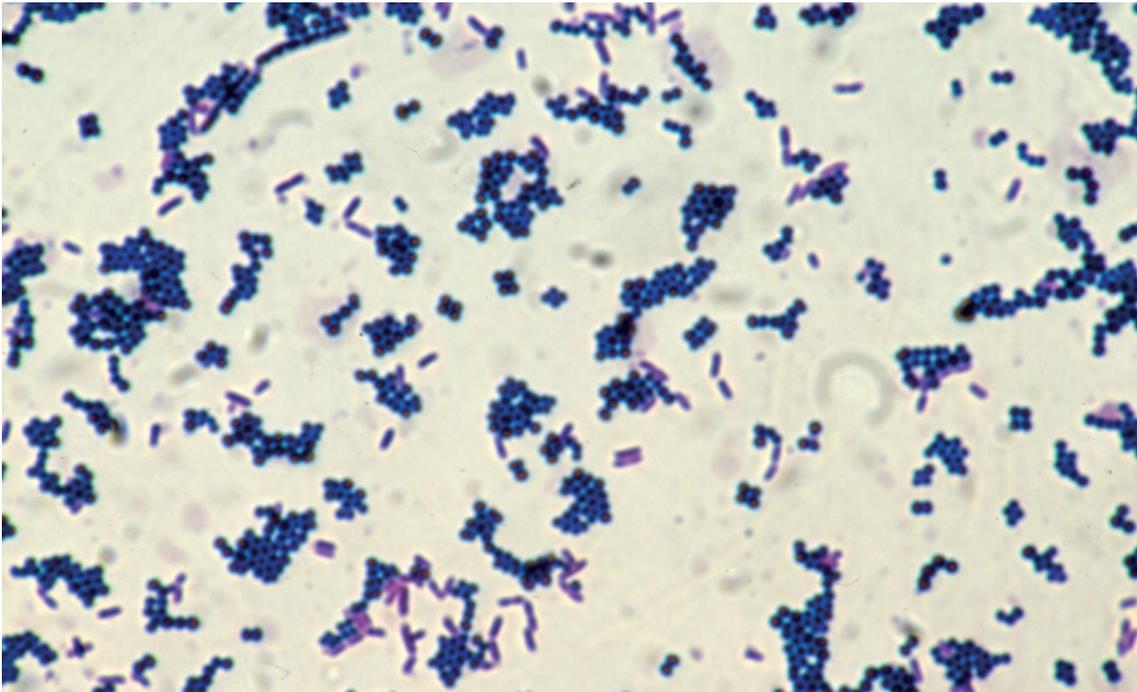


Abb. 12 a: Streptokokken-Suspension versetzt mit dem Präzipitat des Maus-Antikörpers (pret / m 1)
Gramfärbung, Wasserimmersionsmikroskopie, 1000fache Vergrößerung
Streptokokken liegen in mittelgroßen Agglomeraten vor.

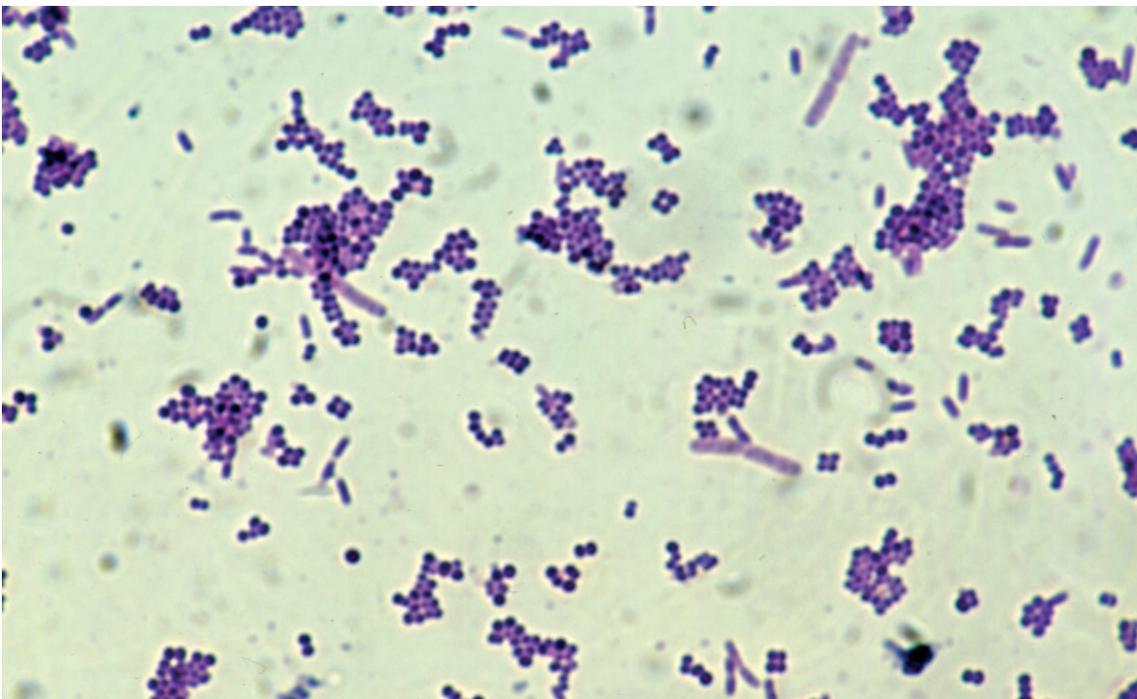


Abb. 12 b: Streptokokken-Suspension versetzt mit dem Präzipitat des humanen Antikörpers (pret / hu 1)
Gramfärbung, Wasserimmersionsmikroskopie, 1000fache Vergrößerung
Streptokokken liegen in mittelgroßen Agglomeraten vor.

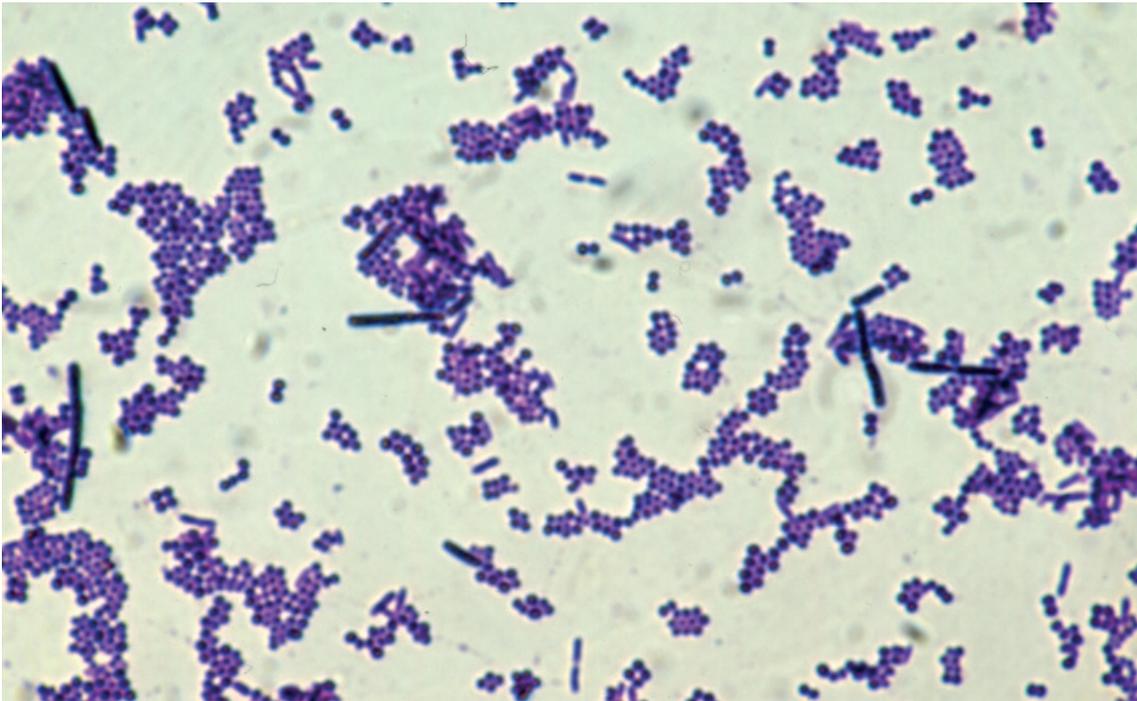


Abb. 12 c: Streptokokken-Suspension versetzt mit der Dialyse des humanen Antikörpers (dia / hu 1)
Gramfärbung, Wasserimmersionsmikroskopie, 1000fache Vergrößerung
Streptokokken liegen in mittelgroßen Agglomeraten vor.

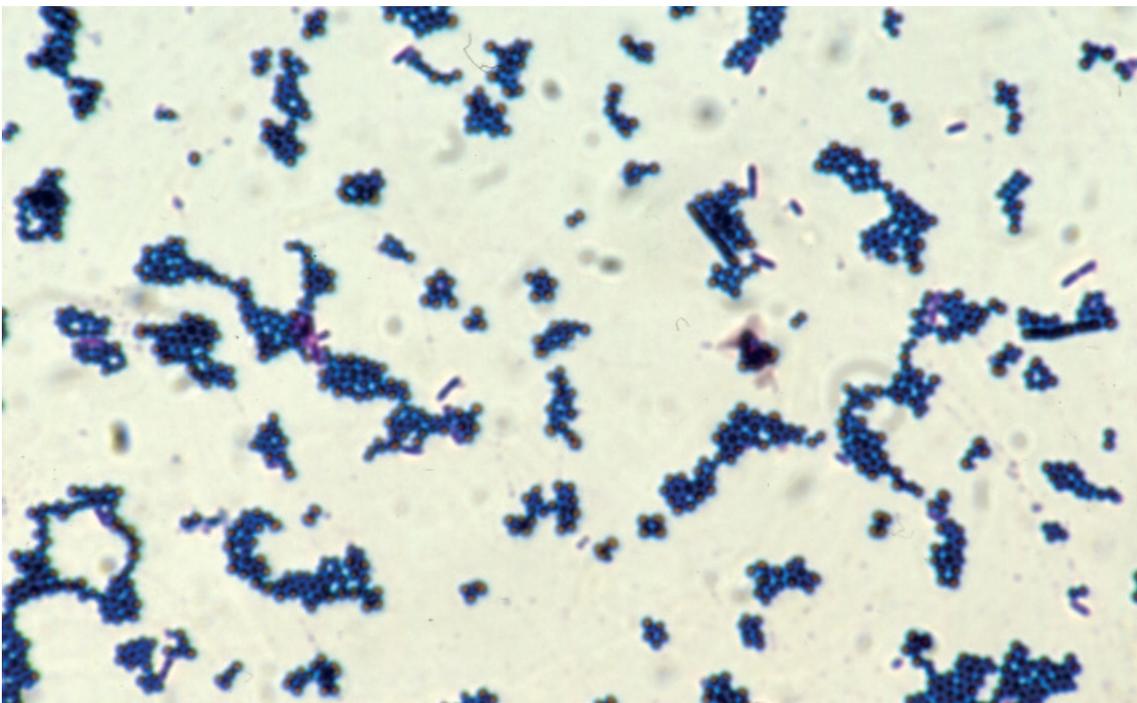


Abb. 12 d: Streptokokken-Suspension versetzt mit der Dialyse des Maus-Antikörpers (dia / m 1)
Gramfärbung, Wasserimmersionsmikroskopie, 1000fache Vergrößerung
Streptokokken liegen in mittelgroßen Agglomeraten vor.

Abb. 12 a-d: Beim Vergleich der Proben, die mit humanen Immunglobulinen (12 a und 12 c) versetzt wurden, mit Proben, die mit Maus-Antikörpern (12 b und 12 d) versetzt wurden, lassen sich keine Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes der Agglutination erkennen.

3.4 Bewertung der REM-Aufnahmen

Die für das Rasterelektronenmikroskop bestimmten Proben der ersten Versuchsreihe waren weder qualitativ noch quantitativ auswertbar, da es vermehrt zu Artefakten kam. Diese Artefakte sind darauf zurückzuführen, dass es im Rahmen der Trocknung in Teilen der verwendeten Nährlösungen zu Ausfällungen und Kristallbildungen kam. Deswegen musste bei den folgenden Versuchsreihen auf diese Untersuchungsmethode verzichtet werden.

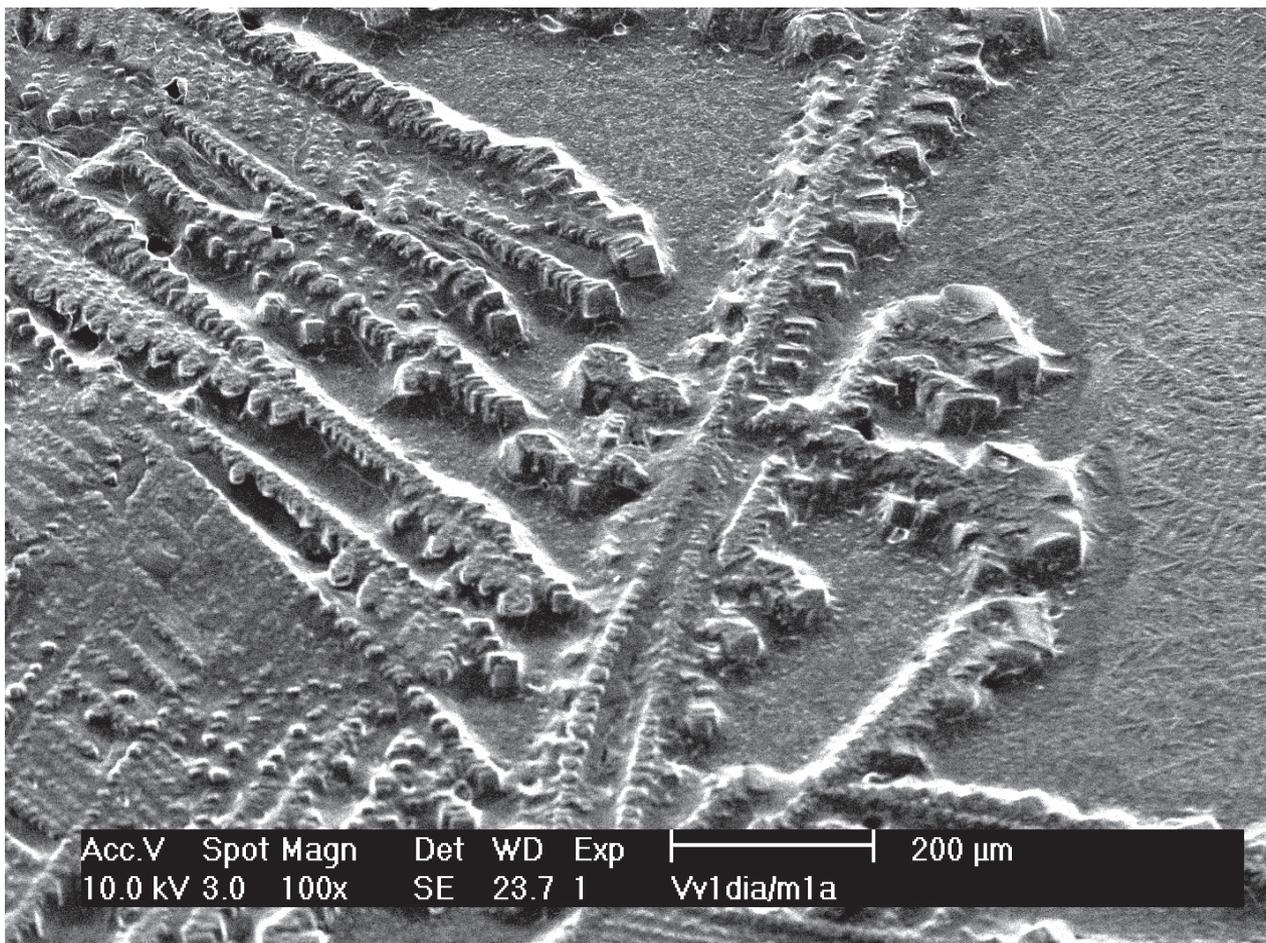


Abb. 13: Streptokokken-Suspension versetzt mit der Dialyse des Maus-Antikörpers (dia / m 1) betrachtet bei 100facher Vergrößerung unter dem REM. Aufgrund auftretender Trocknungsartefakte ist eine Auswertung der Agglutination nicht möglich.

4. Diskussion

Streptococcus mutans hat bei der Etablierung von oralen Biofilmen eine herausragende Bedeutung. Obwohl *S.m.* zu den späteren Kolonisatoren zählt (Petersen et al., 2002), hat er eine Schlüsselrolle. Diese Schlüsselrolle beruht hauptsächlich auf seiner Fähigkeit, eine extrazelluläre Matrix zu produzieren. Ohne das „Strukturelement“ *S.m.* ist dieser Biofilm nicht in der Lage, genügend Säuren für eine Demineralisation des Zahnschmelzes zu produzieren (Kleinberg 2002).

Vorangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass monoklonale Antikörper in der Lage sind, *S.m.* zu agglutinieren und so einer Kolonisation der Zahnoberfläche im Sinne einer Kariesprävention entgegen zu wirken (Ma et al. 1990).

Die vorliegende *in vitro* Studie bestätigt, dass die Zugabe von SA I/II-Antikörpern zu einer Bakteriensuspension von *Streptococcus mutans* zur Agglutination der Bakterienzellen führt. Die verwendeten Antikörper sind dabei zum einen humanen Ursprungs, zum anderen handelt es sich um Maus-Antikörper. Es lassen sich jedoch hinsichtlich der Herkunft keinerlei Unterschiede bezüglich des Agglutinationsverhaltens feststellen.

Unterschiede zeigen sich bei dem Vergleich der Größenordnung der Agglomeration hinsichtlich der Verwendung des Präzipitats des Immunglobulins, bzw. der Verwendung der jeweiligen Dialyse. Dabei ist zu erkennen, dass die Proben, bei denen das Präzipitat zur Bakteriensuspension hinzugefügt wurde, eine stärkere Agglutination der Bakterienzellen zeigen, als dies bei den Proben, die mit der Dialyse versetzt wurden, der Fall ist. Der Grad der Verdünnung des Immunglobulins scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Agglutination von *Streptococcus mutans* zu besitzen. Gleichzeitig spielt die Anzahl der auf der Reaktionsoberfläche vorhandenen Bakterienzellen eine wichtige Rolle. Niedrige Antikörper-Verdünnungen führen generell zu mehr bakterieller Aggregation als hohe Antikörper-Verdünnungen und je höher die Anzahl der Bakterien, die sich auf der Oberfläche befinden, ist, desto mehr Aggregation ist zu erkennen (Fachon-Kalweit et al., 1985). Es gibt in der Literatur jedoch keine spezielle Mengenangabe bezüglich des verwendeten Antikörpers, die erforderlich ist, um eine bakterielle Aggregation hervorzurufen. Entsprechende Versuchsreihen sollten daher optimale Versuchsbedingungen für weiterführende Studien zu diesem Thema festlegen. Dabei fand man heraus, dass sich die Agglutination von *Streptococcus mutans* am besten beurteilen lässt, wenn die Bakteriensuspension

ein Verhältnis von 1:4 aufweist, das heißt, das Verhältnis von *Streptococcus mutans* zu AB-Medium 1:4 beträgt (Aberty, 2005). Dort liegen die Bakterienzellen einzeln und verteilt vor, im weiteren Versuchsverlauf lässt sich eine Agglutination besser beurteilen. Versuche hinsichtlich der Verdünnung der Antikörper zeigen, dass sich eine Verdünnung des Immunglobulins von 1:10 als vorteilhaft erweist, da dort das Vorhandensein der Agglomerate am besten zu erkennen ist (Penn, 2005).

In der vorliegenden Studie wurden Bakterien verwendet, die in einer Verdünnung von 1:50 vorlagen. Des Weiteren lassen sich Faktoren festlegen, die einen optimalen Ablauf der Versuche gewährleisten. So ist festzustellen, dass S.m.- Bakterienzellen besser an Plastikoberflächen anhaften als auf Glasoberflächen. Auch der pH-Wert der Umgebung, in diesem Fall des Speichels, hat Einfluss auf die Aggregation. Je niedriger der pH-Wert ist, desto weniger Bakterien-Aggregation lässt sich nachweisen. Ein neutraler Wert von pH 7 ist hinsichtlich der Aggregation optimal. Bei einem pH-Wert von 4 befindet sich das Immunglobulin in einem instabilen Zustand und verliert dadurch seine Fähigkeit zur Bindung. Generell spielt die Anwesenheit von Speichel, was gleichbedeutend mit der Anwesenheit eines Pellicels ist, eine entscheidende Rolle. Versuche, die unter Anwesenheit eines Pellicels durchgeführt werden, zeigen weniger Bakterienzellen als Versuche, die ohne ein Pellicel durchgeführt werden. Erklären lässt sich dies durch die Tatsache, dass Speichelproteine zur Aggregation und Tötung von Bakterienzellen in der Lage sind (Rudney, 2000). Verantwortlich dafür ist hauptsächlich das Speichelprotein Muzin. Die bereits aggregierten Bakterien werden bei der Durchführung einer Gram-Färbung leichter gewaschen und sind folglich nicht mehr nachzuweisen. Die Anwesenheit eines Pellicels bewirkt somit bei *Streptococcus mutans* eine geringere Tendenz, die Zahnoberfläche zu besiedeln. Die Möglichkeit des Muzins, Bakterien aus der Mundhöhle zu entfernen, ist also ein entscheidender Faktor dafür, ob die jeweilige Person anfällig für eine Karieserkrankung ist, oder ob sie sich als Kariesresistent erweist (Slomainy et al., 1996).

Versuche mit verschiedenen Bakterien-Spezies belegen, dass für die Agglutination der Bakterienzellen das Vorhandensein des SA I/II auf der Bakterienoberfläche notwendig ist. Die Bildung von Agglomeraten findet nur bei Bakterien statt, die dieses Oberflächenantigen besitzen. Dazu gehören S.mutans und S.sobrinus. S.oralis und S.salivarius zeigen dagegen keine Agglutination, wenn sie mit Immunglobulinen in Kontakt gebracht werden. Oberflächenantigene der Familie SA I/II bewirken, wie bereits erwähnt, die

Anlagerung von *S. mutans* an das Pellikel. Die genauen Mechanismen, die die Agglutination von *S. mutans* bewirken, sind bis jetzt nicht eindeutig erforscht. Man geht jedoch davon aus, dass Immunglobuline sich mit dem SA I/II verbinden und so zu einer Agglutination der Bakterienzellen führen. Diese Agglutination ist das Ergebnis einer vorangegangenen Ausbildung langer Ketten auf Seiten von *S. mutans*. Ebenfalls ungeklärt ist, warum aggregierte Bakterienzellen nicht in der Lage sind, an der Zahnoberfläche zu adhären. Möglich ist die Überlegung, dass sich Aggregation negativ auf das Wachstum der Bakterien auswirkt und die aggregierten Zellen durch Selbstreinigungsmechanismen oder durch Phagozytose leichter aus dem System entfernt werden können (Ma et al., 1990). Auch sind durch die Immunglobuline Bindungsliganden abgesättigt.

Die Auswertung der vier Versuchsreihen wird dadurch erschwert, dass diese jeweils bei unterschiedlichen Extinktionswerten, das heißt bei unterschiedlicher Zelldichte der Bakterien stattgefunden haben. Allerdings bietet dies gleichzeitig die Möglichkeit, beim Vergleich der Versuchsreihen untereinander festzustellen, dass sich eine Extinktion, die im Bereich von 0,6 liegt, als vorteilhaft für eine Auswertung darstellt, da bei geringeren Extinktionswerten zu wenige Bakterien vorhanden sind, um überhaupt Rückschlüsse bezüglich einer möglichen Agglutination ziehen zu können.

Auch die Tatsache, dass die Adhäsion von *Streptococcus mutans* auf Plastikoberflächen besser ist als auf Glasoberflächen, wie sie in dieser Versuchsreihe benutzt wurden, lässt schlussfolgern, dass vorliegende Versuchsbedingungen im Nachhinein betrachtet nicht optimal waren. Hinsichtlich der Auswertung der Proben zeigt sich eine Färbung der Bakterien mit Grams-Lösung und die anschließende Betrachtung unter einem Lichtmikroskop als Mittel der Wahl, da sich mit Hilfe dieses Verfahrens Agglomerate gut darstellen lassen. Die Gram-Färbung ist in ihrer Durchführung jedoch relativ empfindlich, so dass verschiedene Intensitäten bei den einzelnen Färbungsschritten und dem sich daran anschließenden Differenzieren zum einen eine unterschiedlich intensive Färbung bewirken und zum anderen Bakterienzellen auch leicht abgespült werden können.

Im Gegensatz dazu eignet sich die Betrachtung der Proben ohne aufwendige Präparation mit einem Rasterelektronenmikroskop nachweislich nicht, da das Vorkommen von zahlreichen Trocknungsartefakten sowohl eine qualitative als auch quantitative Auswertung unmöglich macht.

Die Aufgabe zukünftiger Studien besteht darin, genaueres über die Mechanismen, die zur Agglutination von *S. mutans* führen, herauszufinden. Die Kariesprävention mit Hilfe von Immunglobulinen könnte vor allem für Patienten, die ein besonders hohes Risiko für eine Karieserkrankung besitzen, in der Zukunft eine wichtige Rolle spielen. Doch zuvor müssen noch eine Reihe von Parametern geklärt werden. So ist zu klären, ob sich die bisherigen Ergebnisse auf Versuche mit Schmelzproben übertragen lassen, das heißt, ob sich auch dort eine Agglutination von Bakterienzellen nachweisen lässt. Von entscheidender Bedeutung ist es, herauszufinden, ob Antikörper überhaupt in der Lage sind, den Biofilm zu durchdringen. Dies könnte nämlich schon einen limitierenden Faktor hinsichtlich der Übertragbarkeit *in vivo* darstellen.

Zwar konnte bereits gezeigt werden, dass die topische Applikation monoklonaler Antikörper auf die Zahnoberfläche die Rekolonisation von *S. mutans* bis zu einem Jahr unterbindet, doch die genaueren Mechanismen die dazu führen, sind nicht eindeutig geklärt (Ma et al., 1990). Der Langzeitschutz, der sich durch die Behandlung mit Immunglobulinen ergibt, lässt sich nämlich nicht nur durch die Anwesenheit von IgG auf der Zahnoberfläche erklären, da diese nur für eine Dauer von etwa drei Tagen nachweisbar ist. Vielmehr kommt es zu einer veränderten Zusammensetzung innerhalb des Biofilms, da die Nische, die sonst von *S. mutans* einnimmt, durch weniger pathogene Keime besetzt werden. Es kommt also zu einer Verschiebung des Gleichgewichts. Auf diesem Mechanismus basiert im Grunde auch die Replacement-Therapie (Hillman et al., 2000), die als Prophylaxemaßnahme an Bedeutung gewinnt.

Ein Problem, das bei der Behandlung mit Immunglobulinen auftritt, ist die Tatsache, dass Maus-Antikörper nicht lange im menschlichen Immunsystem verweilen, da sie eine HAMA-Reaktion hervorrufen. Sie können also nicht den gewünschten Effekt hervorrufen, da die Entwicklung von Karies ein länger andauernder Prozess ist. Folglich kommen zur Verwendung nur menschliche Diabodies in Frage, welche aufgrund ihrer geringen Größe jedoch leicht aus dem System entfernt werden (Hooliger et al., 1993). In Bezug auf die Studien von Ma (1990), bei denen die Möglichkeiten von Immunglobulinen auf bereits mit CHX gereinigten Zahnoberflächen bewertet wurden, lässt sich folgern, dass die mechanische Entfernung von Plaque von essentieller Wichtigkeit ist. Durch Zähneputzen wird die Dicke der Plaque reduziert und beeinträchtigt so ihre Formation. Dies verhindert die

Anlagerung von Bakterien auf der Zahnoberfläche (Busscher et al., 2002). Die Reduktion oraler Mikroorganismen ist ohne mechanische Maßnahmen nicht möglich (Eick, 2002). Ein möglichst großer Schutz vor Karies ist also nur dann gegeben, wenn einzelne Prophylaxemaßnahmen kombiniert werden. Bei Patienten, die ein besonders großes Kariesrisiko besitzen, könnte eine adjuvante Therapie mit Immunglobulinen in der Zukunft von entscheidender Bedeutung sein.

5. Zusammenfassung

Die Karies ist heute noch immer die häufigste Erkrankung der Mundhöhle. Deswegen nimmt die Entwicklung neuer Prophylaxemaßnahmen einen wichtigen Stellenwert in der Zahnheilkunde ein. Studien befassen sich mit der Möglichkeit, durch eine Vakzinierung mit Hilfe monoklonaler Antikörper die Kolonisation der Zahnoberfläche mit *Streptococcus mutans* zu verhindern. S.m. spielt bei der Entstehung von Karies eine herausragende Rolle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Immunglobuline in der Lage sind, ein Oberflächenantigen (SAI/II) von S.m. zu binden und so eine Agglutination hervorzurufen. Dies sollte in der vorliegenden in vitro-Studie an Hand von humanisierten Diabodies nachgewiesen werden.

Zu diesem Zweck wurden zu 20 µl einer S.mutans-Suspension, deren Extinktion zuvor bestimmt worden war, jeweils 5 µl einer Immunglobulinlösung gefügt. Es gab zwei Expressionen der Immunglobuline. Es handelte sich zum einen um den Maus-monoklonalen Antikörper Guy's 13 und zum anderen um den entsprechenden humanen Diabody. Sowohl der humane Antikörper als auch der Maus-Antikörper lagen als Präzipitat und als dessen Dialyse vor. Die auf Objektgläser pipettierten und anschließend getrockneten Proben wurden mit Gram-Lösung gefärbt und unter einem Lichtmikroskop betrachtet. Auf eine Auswertung mit Hilfe des REM wurde nach einer der vier Versuchsreihen verzichtet, da dort zu viele Trocknungsartefakte keine aussagekräftigen Ergebnisse erlaubten.

Die Auswertung der Untersuchung mit Hilfe des Lichtmikroskops zeigt, dass Diabodies eine Agglutination von S.mutans bewirken. Dabei gibt es keinen Unterschied, ob der Antikörper humanen Ursprungs ist, oder von einer Maus stammt. Alleine die Tatsache, ob es sich um die Dialyse oder das Präzipitat des Immunglobulins handelt, scheint sich unterschiedlich auf das Agglutinationsverhalten auszuwirken. So kann man feststellen, dass eine größere Verdünnung des Immunglobulins eine geringere Agglutination von S.mutans bewirkt.

Humanisierte Diabodies sind demnach in der Lage, S.mutans zu agglutinieren und können so einer Kolonisation der Zahnoberfläche mit S.mutans entgegen wirken, welche die Voraussetzung für die Entstehung von Karies ist. Insbesondere humane, biotechnologisch hergestellte Antikörper stellen daher ein vielversprechendes Mittel in der zukünftigen Kariesprävention dar.

6. Literaturverzeichnis

Abraham SN, Jonsson AB, Normark S. Fimbriae-mediated host pathogen cross-talk. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 75-81

Al-Hashimi I, Levine MJ. Characterization of in vivo saliva-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 1989; 34: 289-295

Allison DG. The biofilm matrix. *Biofouling* 2003; 19: 139-150

Babaahmady KG, Marsh PD, Challacombe SJ, Newman HN. Variations in the predominant cultivable microflora of dental plaque at defined subsites on approximal tooth surfaces in children. *Arch Oral Biol* 1997; 42: 101-111

Baldo BA, Pham NH, Zhao Z. Chemistry of drug allergenicity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 327-369

Bhatti M, MacRobert A., Menghji S, Henderson H, Wilson M. A study of the uptake of toluidine blue by porphyromonas gingivalis and the mechanism of letal photosensitization. *Photochem Photobiol* 1998; 68: 370-376

Bleiweis AS, Lee SF, Brady LJ, Progulske-Fox A, Crowley PJ. Cloning and inactivation of the gene responsible for a major surface antigen on streptococcus mutans. *Arch Oral Biol* 1990; 35: (Suppl.), 15S-23S

Bleiweis AS, Oyston PC, Brady LJ. Molecular, immunological and functional characterisation of the major surface adhesion of streptococcus mutans. *Adv Exp Med Biol* 1992; 327: 229-241

Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 54-85

Boyd A, Chakrabarty AM. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Role of the alginate exopolysaccharide. *J Ind Microbiol* 1995; 15: 162-168

Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planctonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun* 1998; 66: 4729-4732

Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) bei der parodontalen Behandlung. *Quintessenz Team J* 2007; 37:63-68

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

Busscher HJ, White DJ, van der Mei HC, Baig AA, Kozak KM. Hexametaphosphate effects on tooth surface conditioning film-chemistry- in vitro and in vivo studies. *J Clin Dent* 2002

Childers NK, Zhang SS, Michalek SM. Oral immunisation of humans with dehydrated liposomes containing streptococcus mutans glucosyltransferase induces salivary immunoglobulin A2 antibody responses. *Oral Microbial Immunol* 1994; 8: 146-153

Childers NK, Zhang SS, Harokopakis E, Harmon CC, Michalek SM. Properties of practical oral liposome-streptococcus mutans glucosyltransferase vaccines for effective induction of caries protection. *Oral Microbial Immunol* 1996; 11: 172-180

Collins GB, Shepherd RJ. Engineering plants for commercial products and applications. Conference proceedings. *Ann NY Acad Sci* 1996; 792: 1-183

Conrad U, Fiedler U. Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol Biol* 1998; 38: 101-109

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Karber DR, Lappin-Scott MH. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745

Czerkinsky C, Prince SJ, Michalek SM, Jackson S, Russell MW, Moldoveanu Z, Mc Ghee JR, Mestecky J. IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion: evidence for a common mucosal immune system in humans. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 2449-2453

Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res* 1973; 12 (Suppl): 68-75

Du LD, Kolenbrander PE. Identification of saliva-regulated genes of *Streptococcus gordonii* DL1 by differential display using random arbitrarily primed PCR. *Infect Immun* 2000; 68: 4834-4837

Eick S, Seltmann T, Pfister W. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm-an invitro study. *Dtsche Zahnärztl Z* 2002; 57: 289-294

Eley BM. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque-a review. *Br Dent J* 1999; 186: 286-296

Fachon-Kalweit B, Elder BL, Fives-Taylor P. Antibodies that bind to fimbriae block adhesion of *Streptococcus sanguis* to saliva-coated hydroxyapatite. *J Dent* 1985; 48: 617-624

Fejerskov O, Nyvad B. Is dental caries an infectious disease? Diagnostic and treatment consequences for the practitioner. *Nordic Dentistry 2003 Yearbook*; pp141-151

Frandsen EVG, Pedrazzoli V, Kilian M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 129-133

Frentzen M, Braun A, Koort H-J. Die „Laserzahnbürste“-eine Perspektive? Devitalisierung von Plaque-Mikroorganismen durch laseraktivierbare Photosensitizer. *Laser Journal* 2000; 4: 16-21

Frentzen M, Vogel S, Reinscheid DJ, Barth S. Local passive immunisation by humanized diabodies against streptococcal antigen I/II. (abstract 146). *Caries Research* 2006; 40: 354

Fritsche W. Mikrobiologie. 3. überarbeitete Auflage 2002, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin

Fukuizumi T, Inoue H, Tsujisawa T, Uchiyama C. Tonsillar application of killed streptococcus mutans induces specific antibodies in rabbit saliva and blood plasma without inducing a cross-reacting antibody to human cardiac muscle. *Infect Immun* 1997; 65: 4558-4563

Fukuizumi T, Inoue H, Tsujisawa T, Uchiyama C. Tonsillar application of formalin-killed cells of streptococcus sobrinus reduces experimental dental caries in rabbits. *Infect Immun* 1999; 67: 426-428

Fukuizumi T, Inoue H, Tsujisawa T, Uchiyama C. Streptococcus sobrinus antigens that react to salivary antibodies induced by tonsillar application of formalin-killed s.sobrinus in rabbits. *Infect Immun* 2000; 68: 725-731

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge HO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 59-66

Guggenheim B, Guggenheim M, Gmür R, Giertsen E, Thurnheer T. Application of the Zurich Biofilm Model to problems of cariology. *Caries Res* 2004; 38: 212-222

Hajishengallis G, Hollingshead SK, Koga T, Russell MW. Mucosal immunisation with a bacterial protein antigen genetically coupled to cholera toxin A2/B subunits. *J Immunol* 1995; 154: 4322-4332

Hajishengallis G, Russell MW, Michalek SM. Comparison of an adherence domain and a structural region of streptococcus mutans antigen I/II in protective immunity against dental caries in rats after intranasal immunisation. *Infect Immun* 1998; 66: 1740-1743

Hajishengallis G, Michalek SM. Current status of mucosal vaccine against dental caries. *Oral Microbial Immunol* 1999; 14: 1-20

Hannig M. Neue Aspekte in der Kariesprophylaxe. *Zahnärztlicher Gesundheitsdienst* 2003; 33: 6-7

Harokopakis E, Hajishengallis G, Michalek SM. Effectiveness of liposomes possessing surface-linked B subunit of cholera toxin as an oral adjuvant system. *Infect Immun* 1998; 66: 4299-4304

Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. München - Jena:Urban & Fischer, 2003

Hennessey TD. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontal Res* 1973; 12 (Suppl): 61-67

Hillman JD, Brooks TA, Michalek SM, Harmon CC, Snoep JL, Van der Weijden CC. Construction and characterisation of an effector strain of streptococcus mutans for replacement therapy of dental caries. *Immun* 2000; 68: 543-549

Hillman JD, Chen A, Duncan M, Lee SW. Evidence that L-(+)-lactate dehydrogenase deficiency is lethal in streptococcus mutans. *Infect Immun* 1994; 62: 60-64

Hooliger P, Prospero T, Winter. Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993

Hjeljord LG, Rølla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. J Periodontal Res 1973; 12 (Suppl): 11-16

Hugo WB, Longworth AR. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Pharmacol 1966; 18: 569-578

Jenkins GN. The physiology and biochemistry of the mouth. Blackwell Scientific Publications 1978

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

Jespersgaard C, Hajishengallis G, Huang Y, Russell MW, Smith DJ, Michalek SM. Protective immunity against streptococcus mutans infection in mice after intranasal immunisation with the glucan-binding region of s.mutans glucosyltransferase. Infect Immun 1999; 67: 6543-6549

Katz J, Harmon CC, Buckner GP, Richardson GJ, Russell MW, Michalek SM. Protective salivary immunoglobulin A responses against streptococcus mutans infection after intranasal immunisation with S.mutans antigen I/II coupled to the subunit of cholera toxin. Infect Immun 1993; 61: 1964-1971

Kleinberg I. A mixed- bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation. An alternative to Streptococcus mutans and the specific plaque hypothesis. Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13:108-125

Kolenbrander PE, Anderson RN, Moore LVH. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *selenomonas flueggei*, *selenomonas infelix*, *selenomonas noxia* and *selenomonas sputigea* with strains from genera of oral bacteria. *Infect Immun* 1989; 57: 3194-3203

Kolenbrander PE, Andersen RN, Kazmerak KM, Palmer RJ. Coaggregation and coadhesion in oral biofilms; in Allison, D.G., Gilbert, P., Lappin-Scott, H.M., Wilson, M.(eds): *Community Structure and Co-Operation in Biofilms*. Society for General Microbiology Symposium 59. Cambridge University press, 2000, 65-85

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007; 86: 694-707

Krasse B. *Die Quintessenz des Kariesrisikos*. Quintessenz, Berlin 1986

Kuepper M, Huhn M, Spiegel H, Ma JK-C, Barth S, Fischer R, Finnern R. Generation of human antibody fragments against *streptococcus mutans* using a phage display chain shuffling approach. *Doi* 2005; 10.1186/1472-6750-5-4

Larsen T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17: 267-271

Lehner T, Caldwell J, Smith R. Local passive immunisation by monoclonal antibodies against streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries. *Infect Immun* 1985; 50: 796-799

Lehner T, Ma JK-C, Kelly GG. A mechanism of passive immunisation with monoclonal antibodies to a 185000M streptococcal antigen. *Adv Exp Med Biol* 1992; 327: 151-163

Lehner T, Russell MW, Caldwell J. Passive immunisation with serum immunoglobulines against dental caries in rhesus monkeys. *Lancet* 1978; 693-695

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle-a review. *Adv Dent Res* 2000; 14: 22-28

Levine MJ, Tabak LA, Reddy M, Mandel ID. Nature of salivary pellicles in microbial adherence: role of salivary mucins. In: Mergenhagen SE and Rosan B, Eds. *Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion*. Washington DC: American Society for Microbiology 1985: 125-130

Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PCY, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. A quorum-sensing signalling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2002b; 184: 2699-2708

Li YH, Burne RA. Regulation of the *gtfBC* and *fff* genes of *streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Micobiology* 2001; 183: 897-908

Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. *J Periodontal* 1976; 17: 1-18

Lussi A, Hotz P. Die Approximal- und Glattflächenkaries. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1995; 105: 1439

Ma JK-C. The caries vaccine: a growing prospect. *Dent Update* 1999; 26: 374-379

Ma JK-C, Hein M. Antibody production and engineering in plants. *Ann NY Acad Sci* 1996; 792: 72-81

Ma JK-C, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, Van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 1995; 268: 716-719

Ma JK-C, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Cargelegue D, Yu L, Hein MB, Lehner T. Characterisation of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nature Medicine* 1998; 4: 601-606

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

Ma JK-C, Hunjan M, Smith R, Lehner T. Specificity of monoclonal antibodies in local passive immunisation against streptococcus mutans. *Clin Exp Immunol* 1989; 77: 331-337

Ma JK-C, Smith R, Lehner T. Use of monoclonal antibodies in local passive immunisation to prevent colonisation of human teeth by streptococcus mutans. *Infect Immun* 1987; 55: 1274-1278

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (Goebel H, Hrsg). *Brock-Mikrobiologie*, Spektrum Lehrbuch. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 2001

Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol* 1999; 70: 1443-1448

Marsh PD. Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 7-15

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994; 8: 63-71

Marsh PD, Martin M. *Oral Microbiology*, ed 3. London, Chapman & Hall, 1992

Mason HS, Arntzen CJ. Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends Biotechnol* 1995; 13: 388-392

Mc Farland LV. Normal flora: Diversity and functions. *Microb Ecol Health Dis* 2000; 12: 193-207

Mc Gee JR, Michalek SM, Navia J, Narkates AJ. Effective immunity to dental caries: studies of active and passive immunity to streptococcus mutans in malnourished rats. *J Dent Res* 1978; 55 (Spec Iss C): C206-C214

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol* 2005; 79: 159-170

Mestecky J, Mc Ghee 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* 1978; 61: 731-737

Michalek SM, Rahman AFR, Mc Ghee JR. Rat immunoglobulins in serum and secretion. Comparison of IgM, IgA and IgG in serum, colostrum, milk and saliva of protein malnourished and normal rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 145: 1114-1118

Michalek SM, Mc Ghee JR, Mestecky J, Arnold RR, Bozzo L. Ingestion of streptococcus mutans induces secretory immunoglobulin A and caries immunity. *Science* 1976; 192: 1238-1240

Miller WD. *Die Mikroorganismen der Mundhöhle*. Thieme, Leipzig 1899

Munk K. *Grundstudium Biologie-Mikrobiologie*. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin 2001

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

Nyvad B, Fejerskov O. Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 287-296

Okamoto H, Iwase T, Morioka T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. *Laser Surg Med* 1992; 12: 450-458

Petersen S, Assev S, van der Mei HC, Busscher HJ, Scheie AA. Functional Variation of the Antigen I/II Surface Protein in *Streptococcus Mutans* and *Streptococcus intermedius*. 2003; 71: 784-793

Plagmann HC. *Lehrbuch der Parodontologie*. Carl Hanser Verlag, München 1998

Pratten J, Wilson M. Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1595-1599

Reich E. Chlorhexidin in der antibakteriellen Kariesprophylaxe. Neue Erkenntnisse aus aktuellen internationalen Langzeitstudien. *ZWR* 2006; 10: 455-459

Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes and Infection* 2000; 2: 1599-1607

Rudney JD. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 343-367

Rudney JD. Saliva and dental plaque. *Adv Dent Res* 2000; 14: 29-39

Russell MW. Immunisation against dental caries. *Curr Opin Dent* 1992; 2: 72-80

Russell MW. Future strategies to control oral infections. In: Guggenheim, B., Shapiro, S. (eds): *Oral Biology at the turn of the century*. Basel: Karger, 1998: 239-246

Russell MW, Hajishengallis G, Childers NK, Michalek SM. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. *Caries Res* 1999; 33: 4-15

Russell MW, Moldoveanu Z, White PL, Sibert GJ, Mestecky J, Michalek SM. Salivary, nasal, genital and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* 1996; 64: 1272-1283

Russell MW, Wu H. *Streptococcus mutans* and the problem of heart cross-reactivity. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990; 1: 191-205

Russell MW, Wu H. Distribution, persistence and recall of serum and salivary antibody responses to peroral immunisation with protein antigen I/II of *Streptococcus mutans* coupled to the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* 1991; 59: 4061-4070

Saleh MN, LoBuglio AF, Wheeler RH, Rogers KJ, Haynes A, Lee JY, Khazaeli MB. A phase II trial of murine monoclonal antibody 17-1A and interferon-gamma: clinical and immunological data. *Cancer Immunol Immunother* 1990; 32: 185-190

Slomiany BL, Murty VLN, Piotrowski J, Slomiany A. Salivary mucins in oral mucosal defense. *Gen. Pharmacol* 1996; 27: 761-771

Smith DJ, Lehner T. Characterisation of monoclonal antibodies to common protein epitopes on the cell surface of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4: 153-158

Smith DJ, Shoushtari B, Heschel RL, King WF, Taubman MA. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with a catalytic subdomain of *mutans* group streptococcal glucosyltransferase. *Infect Immun* 1997; 65: 4424-4430

Smith DJ, Taubman MA. Oral immunisation of humans with *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase. *Infect Immun* 1987; 55: 2562-2569

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

Smith DJ, Taubman MA. Potential for glucosyltransferase based synthetic peptides in adental caries vaccine Adv Exp Med Biol 1995; 371B: 1157-1159

Socransky SS, Hafajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontology 2000; 28: 12-55

Socransky SS, Hafajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998; 25: 134-144

Takahashi IN, Okahashi N, Kanamoto T, Asakawa H, Koga T. Intranasal immunisation of mice with recombinant protein antigen of serotype C streptococcus mutans and cholera toxin B subunit. Arch Oral Biol 1990; 35: 475-477

Todryk SM, Kelly CG, Munro GH, Lehner T. Induction of immune responses to functional determinants of a cell surface streptococcal antigen. Immunology 1996; 87: 55-63

Van de Rijn J, Bleiweis AS, Zabriskie JB. Antigens in streptococcus mutans cross reactive with human heart muscle. J Dent Res 1976; 55 (Spec Iss C): C59-C64

Wizeman TM, Adamon JE, Langermann S. Adhesins as targets for vaccine development. Emerg Infect Dis 1999; 5: 395-403

Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. J Dent Res 2000; 79: 21-27

Wu H, Russell MW. Immunological cross-reactivity between streptococcus mutans and human heart tissue examined by cross-immunisation experiments. Infect Immun 1990; 58: 3545-3552

Wu H, Russell MW. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* 1993; 61: 314-322

Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG. Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, statherin and histatins and their crosslinking reaction by transglutaminase. *J Dent Res* 1999; 78: 1696-1703

Young A, Rykke M, Rolla G. Quantitative and qualitative analyses of human salivary micelle like globules. *Acta Odont Scand* 1999; 57: 105-110

Zalewska A, Zwierz K, Zolkowski K, Gindzienski A. Structure and biosynthesis of human salivary mucins. *Acta Biochimica Polonica* 2000; 47: 1067-1079

Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. The killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Brit J Dermatol* 2001; 144: 274-278

Internetliteratur:

I: Kordes, Andrea

Morphologische Studien der Primärkolonisation von pellicelbeschichteten Schmelzoberflächen am Beispiel von *Streptococcus mutans*

Bonn, Univ., Diss., 2007

URN: urn:nbn:de:hbz:SM-09407

URL: http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/med_fak/2007/kordes_andrea

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Frentzen danke ich zum einen für die Überlassung des interessanten Themas, zum anderen für die fachliche Beratung und Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Frau M. Lange möchte ich mich für ihre immer freundliche Unterstützung im Labor bedanken. Sie war mir bei der Durchführung der Versuchsreihen eine große Hilfe.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Barth vom Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie in Aachen danke ich für die Bereitstellung der von ihr generierten Antikörperfragmente.

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse war mir Dr. Thomas Schlösser eine große Hilfe, vielen Dank dafür.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich für ihr Verständnis und ihren seelischen Beistand bedanken. Besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern, die mich in der Vergangenheit in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und bei meinen Entscheidungen immer hinter mir standen.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund Dominique Steiner ein großes Dankeschön aussprechen. Nicht nur bei der Erstellung der Dissertation war er mir eine große Hilfe, vielmehr steht er mir schon seit Beginn des Studiums zur Seite und hat mich schließlich im letzten Jahr auch bei meinem Schritt in die berufliche Selbständigkeit entscheidend unterstützt. Für all das möchte ich mich bei ihm auf diesem Weg bedanken, ich bin sehr glücklich darüber, ihn an meiner Seite zu haben.