

In vitro Modelle oraler Biofilme

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock



von

Kerstin Standar

geb. am 27.02.1981 in Wurzen

Rostock, den 27.09.2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Andreas Podbielski
Universitätsklinikum Rostock (AÖR)
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

2. Gutachter: Prof. Dr. Hubert Bahl
Universität Rostock – Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Biowissenschaften/Mikrobiologie (IfBi)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. Dezember 2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Biofilme	1
1.1.1 Definition, Vorkommen und Zusammensetzung mikrobieller Biofilme	1
1.1.2 Phasen der mikrobiellen Biofilmbildung	3
1.1.3 Mikrobielle Kommunikation in Biofilmen	4
1.1.4 Vorkommen mikrobieller Biofilme	5
1.2 Biofilme in der Mundhöhle	6
1.3 Karies, Gingivitis und Parodontitis	8
1.3.1 Karies	8
1.3.2 Gingivitis	9
1.3.3 Parodontitis – Parodontitis marginalis	10
1.4 Ziele der Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Bakterienstämme	15
2.2 Kultivierungsbedingungen	16
2.3 Stammhaltung	17
2.4 Nährmedien und Zusätze zur Untersuchung der Biofilmbildung	18
2.5 Farbstoffe für die Fluoreszenzmikroskopie	19
2.6 Puffer und Lösungen	20
2.7 Chemikalien und Enzyme	20
2.8 Laborgeräte und Software	21
2.9 Protokoll zur Biofilmbildung	22
2.10 Optimierung der Kulturmedien für die Biofilmbildung	23
2.11 Bestimmung der Biofilm-Masse und Biofilm-Lebendkeimzahlen	23
2.12 Dokumentation von Biofilmstrukturen	23
2.12.1 Fluoreszenzmikroskopie	23
2.12.2 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	24
2.13 Nachweis von Bakterien durch Antikörpermarkierung	25
2.13.1 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)	26
2.13.2 Konfokale Laser Raster Mikroskopie	26
2.13.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	26

2.14	Untersuchungen zur Biofilmentwicklung.....	27
2.15	Transwell Biofilm Experimente	27
2.16	Sukzessive Animpfstrategie	28
2.17	Biotensid-Analyse (in Anlehnung an van Hoogmoed <i>et al.</i> , 2000)	29
2.18	Bakteriozin-Test	29
2.19	Untersuchungen der Biofilmmatrix (nach Inoue <i>et al.</i> , 2003).....	30
2.19.1	Analyse der Wirkung von Pronase, DNase und Natriummetaperiodat.....	30
2.19.2	Bestimmung von Glykoproteinen	30
2.20	Adhärenz und Internalisierung der Bakterien an bzw. in eukaryote Zellen (nach Molinari <i>et al.</i> , 1997).....	31
2.20.1	Quantifizierung mittels Lebendkeimzählung.....	31
2.20.2	Visualisierung mittels mikroskopischer Techniken	32
2.21	Molekulargenetische Arbeiten.....	32
2.21.1	PCR (Polymerasekettenreaktion)	32
2.21.2	DNA-Sequenzierung.....	33
2.21.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.21.4	DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung.....	35
2.21.5	RNA-Präparation.....	35
2.22	Transkriptomanalysen	35
2.22.1	cDNA-Synthese und cy3-Markierung.....	35
2.22.2	Chip-Hybridisierung	36
2.22.3	Einlesen und Auswertung der Microarrays.....	36
2.23	Proteinbiochemische Methoden	37
2.23.1	Nicht-denaturierende Proteinpräparation aus Bakterienüberständen.....	37
2.23.2	Konzentrierung und Reinigung von Proteinen durch Ultrafiltration	38
2.23.3	Präparation membranassoziierter Proteine (nach Standar <i>et al.</i> , 2008)	38
2.23.4	Quantifizierung proetolytischer Aktivität	39
2.23.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	40
2.23.6	Färbung von Proteingelen	40
2.23.7	MALDI-TOF Massenspektrometrie (<i>Matrix-associated Laser-Desorptions-Ionisations – Time Of Flight mass spectrometry</i>)	41
2.24	Reproduzierbarkeit und Statistiken	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Etablierung von <i>in vitro</i> Modellen oraler Biofilme.....	42
3.1.1	Auswahl eines geeigneten Mediums für die Biofilmbildung.....	42
3.1.2	Einfluss von Fibronektin auf die Adhärenz und Biofilmbildung.....	48
3.2	Studien zur Biofilm-Entwicklung.....	50

3.3 Untersuchungen von Zwei-Spezies Kombinationen – Ko-Kultivierung der fakultativ aeroben Bakterien in CDM/Saccharose.....	54
3.3.1 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus mitis</i> ATCC 15914 mit <i>Streptococcus mutans</i> DSM 20523 bzw. UA159.....	54
3.3.2 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus mitis</i> mit <i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20567 bzw. SK36	56
3.3.3 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus mitis</i> mit <i>Streptococcus intermedius</i>	57
3.3.4 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus mitis</i> mit <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> DSMZ 11123 bzw. HK1651.....	59
3.3.5 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus salivarius</i> mit <i>Streptococcus mutans</i> DSM 20523 bzw. UA159.....	60
3.3.6 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus salivarius</i> mit <i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20567 bzw. SK36	62
3.3.7 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus salivarius</i> mit <i>Streptococcus intermedius</i>	63
3.3.8 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus salivarius</i> mit <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> DSMZ 11123 bzw. HK1651	65
3.4 Untersuchungen von Zwei-Spezies Kombinationen - Ko-Kultivierung der obligat anaeroben Bakterien mit <i>S. mitis</i> oder <i>S. salivarius</i> in künstlichem Speichel/Galaktose	67
3.4.1 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus mitis</i> mit <i>Porphyromonas gingivalis</i> W83 bzw. W50	68
3.4.2 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus mitis</i> mit <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	69
3.4.3 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus mitis</i> mit <i>Parvimonas micra</i>	71
3.4.4 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus salivarius</i> mit <i>Porphyromonas gingivalis</i> W83 bzw. W50	72
3.4.5 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus salivarius</i> mit <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	74
3.4.6 Ko-Kultivierung von <i>Streptococcus salivarius</i> mit <i>Parvimonas micra</i>	75
3.5 Funktionelle Charakterisierung von Zwei-Spezies Kombinationen.....	76
3.5.1 Untersuchungen zur Bakteriozin-Produktion.....	77
3.5.2 Einfluss verschiedener Animpfstrategien auf die Di-Spezies Biofilmbildung	77
3.5.3 Bestimmung bakterieller Effekte im indirekten Zellkontakt	91
3.5.4 Untersuchungen zur Biofilm-Komposition.....	99
3.6 Weiterreichende Analysen zu ausgewählten Bakterien und Zwei-Spezies-Kombinationen..	104
3.6.1 Effekte von Pronase auf <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 und ATCC 23726 sowie auf ausgewählte Zwei-Spezies Kombinationen	104
3.6.2 Analysen zur Interaktion von <i>S. salivarius</i> mit <i>Porphyromonas gingivalis</i>	114
3.6.3 Untersuchungen zur Interaktion von <i>S. sanguinis</i> mit <i>S. mitis</i>	119

3.6.4	Erste Analysen zur Interaktion ausgewählter Bakterienspezies mit HEp2-Zellen	126
4	Diskussion.....	130
4.1	Etablierung einer Versuchsabfolge zur Untersuchung der Biofilmbildung oraler Mikroorganismen.....	130
4.2	Untersuchung der Biofilmbildung oraler Mono-Spezies Kulturen	131
4.3	Analysen von Di-Spezies Kulturen identifizieren potentielle Biofilminhibitoren, aber auch Biofilmsymbionten	134
4.4	Reihenfolge und Zeit beeinflussen die erfolgreiche Kolonisierung einer Oberfläche	137
4.5	Transwell-Untersuchungen grenzen die Ursachen antagonistischer Effekte auf die Biofilmbildung ein.....	138
4.6	Weiterreichende funktionale Analysen ausgewählter Di-Spezies Kombinationen.....	139
4.6.1	Arginin spielt eine Rolle für die Interaktion von <i>Streptococcus mitis</i> mit <i>Streptococcus sanguinis</i>	139
4.6.2	Probiotikum versus Pathogen – Interaktionen von <i>Streptococcus salivarius</i> mit <i>Porphyromonas gingivalis</i>	141
4.6.3	Das Brückenbakterium <i>F. nucleatum</i> – Stammspezifische Biofilmbildung und Adhärenz an HEp2-Zellen	143
5	Zusammenfassung und Ausblick	146
6	Literaturverzeichnis	149
7	Anhang.....	166
7.1	Zusammensetzung des chemisch definierten Mediums (CDM)	166
7.2	Abbildungen	169
7.3	Tabellen	176
7.4	Danksagung	196
7.5	Publikationsliste	198
7.5.1	Veröffentlichungen in Fachzeitschriften.....	198
7.5.2	Tagungsbeiträge (Vorträge/Poster).....	198
7.6	Selbstständigkeitserklärung.....	200

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AC	Aachen
AHLs	N-Acyl-Homoserinlacton
AI-2	Autoinducer 2
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CDM	chemisch definiertes Medium
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
COGs	<i>Clusters of Orthologous Groups of proteins</i>
CS	CDM/Saccharose
CS-A	CDM/Saccharose ohne Arginin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase (DN)	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMZ	Elektronenmikroskopiezentrum
EPS	extrazelluläre polymere Schicht
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat., und andere)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
Fn	Fibronektin
FN	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
g	Erdbeschleunigung

G	Guanin
Glu	Glukose
h	Stunde
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
i. d. F.	in dem Fall
i. d. R.	in der Regel
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kDa	Kilo-Dalton
k. E.	kein Effekt
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMP	Natriummetaperiodat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	<i>potentia hydrogenium</i> (lat.)
PMNs	<i>polymorphonuclear neutrophiles</i>
PN	<i>Porphyromonas gingivali</i>
Pro	Pronase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QS	Quorum Sensing
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sacch	Saccharose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	künstlicher Speichel, mit Galaktose
SG-	künstlicher Speichel ohne Mucin, mit Galaktose
SG-/Pro	künstlicher Speichel ohne Mucin, mit Galaktose, mit Pronase
SG/Pro	künstlicher Speichel, mit Galaktose, mit Pronase
spp.	<i>species pluralis</i>
SSA	<i>Streptococcus sanguinis</i>

T	Thymin
T1, T2, T3	Tag 1, Tag 2, Tag 3
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	Technische Universität
U/ml	Units pro Mililiter
UV/Vis	ultraviolettes/sichtbares Licht
VBNC	<i>viable but non-culturable</i>
vs.	versus
w/v	Masse pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

Ein- und Drei-Buchstabencode der Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalain	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Iso	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

Die Entwicklung der Menschen in den vergangenen 140 Jahren zeigt eine um 50 % gestiegene durchschnittliche Lebenserwartung von ca. 40 Jahren (1871) auf rund 80 Jahre (2004) (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2006). Dies ist unter anderem den Fortschritten in der Medizin, und vor allem den hierfür notwendigen Entdeckungen in der Biologie, speziell der Mikrobiologie, zu verdanken. Wichtige Voraussetzungen dafür waren beispielsweise die Entwicklung des Mikroskops und die damit gemachten Beobachtungen und Dokumentationen von Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723, Entdeckung der „Animacules“) und Robert Hooke (Buch „Micrographia“, 1665). Erst deren und nachfolgender Forscher Beobachtungen und unermüdlicher Wissensdrang enthüllten viele Geheimnisse der Welt der „Kleinstlebewesen“.

Der entscheidende Aufschwung in der medizinisch orientierten Bakteriologie war dann vor allem durch Robert Koch (1843-1910) zu verzeichnen. Ihm gelang es als Erstem, den Erreger des Milzbrandes (*Bacillus anthracis*) zu vermehren und dessen Rolle bei der Entstehung der Krankheit nachzuweisen. Davon angestoßen erfolgten viele Untersuchungen von Krankheiten und der Beteiligung von Mikroorganismen, die wiederum systematisch in Gruppen eingeteilt und in ihren physiologischen Eigenschaften studiert wurden. Auf Basis dieser Grundlagenforschungen wurde es damit zunehmend möglich, Ursachen von (bakteriellen) Krankheiten zu verstehen, Behandlungsstrategien zu entwickeln und Erkrankungen erfolgreich zu therapieren.

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Bakterien in Formen von Schwärmen frei („planktonisch“) leben. Die Forschung der letzten 40 Jahre hat jedoch gezeigt, dass das planktonische Vorkommen von Bakterien eher eine Ausnahme ist. Vielmehr haben sie das starke Bestreben, sich in Gemeinschaften anzusiedeln, gegen äußere negative Einflüsse zu schützen und sich hierin weiter zu entwickeln.

Bereits Antoni van Leeuwenhoek hatte in den heute als Plaque bekannten Belägen von Zähnen Gemeinschaften von „Animacules“ (kleinen Tierchen) entdeckt. Es dauerte allerdings noch bis in die 70-er Jahre des 20. Jahrhunderts, bis die Wissenschaftler erkannten, dass diese mikrobiellen Gemeinschaften die Hauptkomponente der bakteriellen Biomasse auf der Erde darstellen.

1.1 Biofilme

1.1.1 Definition, Vorkommen und Zusammensetzung mikrobieller Biofilme

Der kanadische Mikrobiologe J. William Costerton war der Wegbereiter der Lehre von Gemeinschaften als dominante Lebensform der Bakterien. Er demonstrierte als Erster ihre Rolle in der Resistenz gegenüber antibakteriellen Agenzien und der Persistenz von pathogenen Bakterien bei einigen chronischen Infektionen. Er war es auch, der den Begriff „Biofilm“ im Jahr 1978 prägte (Costerton *et al.*, 1978). Der Begriff Biofilm bezeichnet eine strukturierte Gemeinschaft von

Mikroorganismen, eingeschlossen in eine selbst produzierte polymere Matrix und angeheftet an eine inerte oder lebende Oberfläche (Costerton *et al.*, 1999).

Heute weiß man, dass Biofilme ubiquitär vorkommen und dass nicht nur Bakterien, sondern auch Pilze (Chandra *et al.*, 2001) und Algen (Roeselers *et al.*, 2008) Mechanismen besitzen, mit denen sie eine Oberfläche besiedeln und Biofilmstrukturen bilden können.

Zudem gibt es Biofilme schon seit Milliarden von Jahren. Beispielsweise finden sich in Westaustralien Versteinerungen organischen Lebens, sogenannte Stromatolithen. Es handelt sich dabei um geschichtete Mikroorganismenteppiche, die typischerweise aus Lagen von filamentösen und anderen Mikroorganismen aufgebaut sind. Der älteste bekannte Stromatolith wurde in einem Felsen mit einem Alter von 3,5 Milliarden Jahren gefunden (Madigan *et al.*, 2000).

Bakterielle Biofilme bestehen hauptsächlich aus Bakterien und einer von den Bakterien gebildeten und sie umhüllenden Schleimschicht („Matrix“) aus „extrazellulären polymeren Substanzen“ (EPS, hauptsächlich Polysaccharide, Proteine, Lipide und Nukleinsäuren) (Stoodley *et al.*, 1998; Donlan, 2002). Diese Schleimschicht ist allerdings ein dynamisches System und variiert, abhängig von den sie umgebenden Umweltbedingungen und der Nährstoffversorgung, in ihrer Zusammensetzung und damit in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften (Sutherland, 2001). Den Mikroorganismen ermöglicht sie, wie ein multizellulärerer Organismus zu interagieren. Sie kann als „Haus“ der Biofilmbewohnenden Mikroorganismen angesehen werden (Flemming und Wingender, 2001a; Flemming *et al.*, 2007).

Biofilme können durch eine oder mehrere Spezies gebildet werden. Sie variieren entsprechend in ihrer Schichtdicke, der Zusammensetzung und Dichte ihrer EPS. Die exakte Struktur eines jeden Biofilms ist wahrscheinlich eine einzigartige Eigenschaft, abhängig von der Umgebung, in der er gebildet wird (Sutherland, 2001). Wimpenny und Colasanti führten aus, dass die Biofilmstruktur vermutlich stark durch die vorhandene Substratkonzentration beeinflusst wird (Wimpenny und Colasanti, 1997). Mehr noch, dass deren Unterschiede in letztlich 3 konzeptionellen Modellen von Biofilmen resultieren: in heterogenen Mosaikstrukturen, in Strukturen die von Wasserkanälen durchzogen sind und in dicht-konfluenten Biofilmen.

Die Formierung von Wasserkanälen erlaubt einerseits das Vordringen von Nährstoffen in die tieferen Schichten des Biofilmes und andererseits das Ausschleusen von Abfallprodukten (Davey und O’Toole, 2000; Dunne, 2002). So ermöglicht die Biofilmstruktur den darin organisierten Mikroorganismen eine relativ konstante Zufuhr von Nährstoffen, verhindert aber auch das Abschwemmen extrazellulärer Enzyme. Mittlerweile weiß man auch, dass die Biofilmstruktur mechanische Stabilität sowie Schutz gegen widrige Einflüsse wie Strömungen der umgebenden Flüssigkeit, Austrocknung, UV-Licht, pH-Schwankungen, toxische Substanzen, Bakteriophagen und, nicht zuletzt, alle Abwehrmechanismen des Menschen bietet (Costerton *et al.*, 1987; Anwar *et al.*, 1990; Costerton *et al.*, 1999; Sutherland, 2001; Flemming und Wingender, 2001b; Matz *et al.*, 2004).

Aus medizinischer Sicht ist vor allem der große Schutz vor antibakteriellen Substanzen oder körpereigenen Abwehrmechanismen von Bedeutung (Brown und Gilbert, 1993; Xu *et al.*, 2000; Stewart und Costerton, 2001). Im Biofilm organisierte Bakterienspezies können, im Vergleich zu ihren planktonischen Artgenossen, eine um das 250- bis 1000-fach stärkere Resistenz gegenüber Antibiotika aufweisen (Ceri *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003).

1.1.2 Phasen der mikrobiellen Biofilmbildung

Die Biofilmbildung auf einer inerten Oberfläche ist ein komplexer Vorgang, der von mehreren Umweltfaktoren beeinflusst wird. Mittlerweile wurde die Biofilmbildung verschiedener Mikroorganismen wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* und, am intensivsten, von *Pseudomonas aeruginosa* unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen untersucht.

Obwohl Biofilme sehr heterogene Systeme darstellen und hinsichtlich ihrer Zusammensetzung eine große Variabilität aufweisen, kann für die Bildung von Biofilmstrukturen ein typisches Schema angegeben werden. Van Loosdrecht und Kollegen beschrieben die Abfolge der Biofilmbildung in vier charakteristische Etappen (van Loosdrecht *et al.*, 1990).

Im ersten Schritt wird die Zieloberfläche der Biofilmbildung zufällig durch in der umgebenden Flüssigkeit vorhandene Substanzen chemisch so konditioniert, dass sie Zielstrukturen für Bindungsmechanismen der planktonischen Mikroflora aufweist. In einem zweiten Schritt werden die Organismen durch Brownsche Molekularbewegung, infolge von Strömungen und Sedimentation, oder durch aktive Bewegungen zu dieser Oberfläche transportiert. Anschließend erfolgt die initiale Adhäsion, die zunächst reversibel verläuft und hauptsächlich einen physiko-chemischen Prozess darstellt. An die initiale Adhäsion schließt sich nach dem Modell von van Loosdrecht und Mitarbeitern eine feste, irreversible Anheftung der Zellen an die Trägeroberfläche an, die häufig durch Strukturen der Zelloberfläche, wie Fimbrien, Pili, Flagellen und andere Zelloberflächenproteine vermittelt wird. Der dritte Schritt umfasst das Wachstum und die Ausbildung von Mikrokolonien und der vierte Schritt schließlich die Differenzierung zum „reifen“ Biofilm (van Loosdrecht *et al.*, 1990).

Flemming und Wingender formulieren dies so: Auf die feste Verankerung der Zellen erfolgt zunächst die Phase der mikrobiellen Akkumulation, die vor allem durch Vermehrung der Bakterien, aber auch durch das Hinzutreten neuer Spezies bestimmt wird (Flemming und Wingender, 2001a). Dadurch kommt es zur Bildung von Mikrokolonien und der Förderung oder Auslösung der EPS-Produktion (Wachstumsphase). Merkmale des reifen Biofilms sind schließlich das Vorhandensein von EPS und eine dreidimensionale Struktur (Costerton, 1995). Flemming und Wingender bemerkten zudem, dass der Biofilm keine unbegrenzte Dicke erreicht, sondern dass sich ein Gleichgewicht zwischen Ablösen (*Detachment*) und Neubildung einstellt (Flemming und Wingender, 2001). Damit ist es möglich, dass sich Bakterien aus dem Biofilm auch auf andere, umliegende Bereiche ausbreiten können und an der neu erreichten Stelle den Zyklus der Biofilmbildung von vorn beginnen (O'Toole *et al.*, 2000).

Auch für *P. aeruginosa* wurde solch eine charakteristische Abfolge der Biofilmentwicklung von Sauer und Kollegen beschrieben (Sauer *et al.*, 2002). Einen schematischen Ablauf zeigt die Abbildung 1.

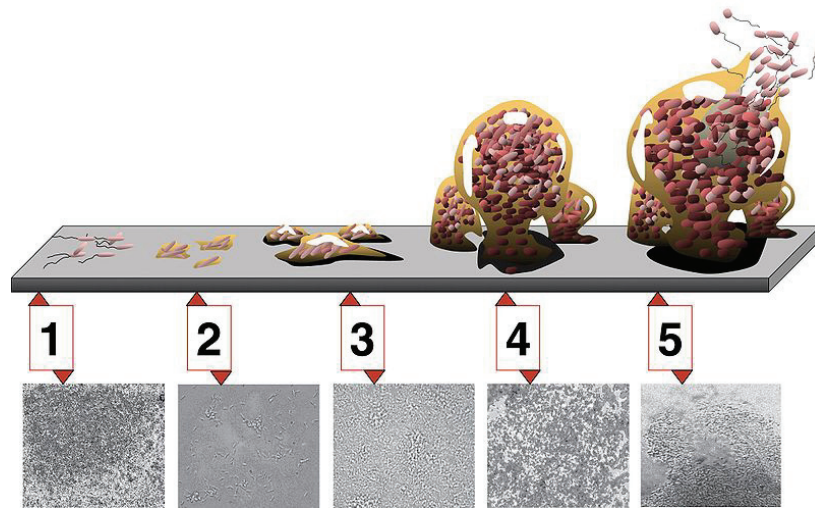


Abbildung 1: 5 Etappen der Biofilmbildung. 1. Initiale Adhäsion, 2. Irreversible Adhäsion, 3. Erste Reifung, 4. Zweite Reifung, 5. Ausbreitung/Verteilung. Jede Etappe der Biofilmbildung ist mit einem Photo eines sich entwickelnden Biofilms von *P. aeruginosa* verknüpft. Zur Verfügung gestellt von: D. Davis (Monroe, 2007).

Diese Unterteilung gilt allerdings nur für Biofilme unter relativ konstanten Umweltbedingungen. Für Wasseraufbereitungs- und Brauchwassersysteme oder Kühlkreisläufe ist beispielsweise anzunehmen, dass es aufgrund von alternierenden Scherkräften zu zeitweise starken Veränderungen der Biofilmstruktur mit einer unregelmäßigen Folge von Wachstums- und Plateauphasen kommt.

Der Zeitraum und die Geschwindigkeit der Biofilmbildung sowie deren Aufbau und Struktur werden von einer Reihe verschiedener Faktoren bestimmt. Zum einen sind es die Eigenschaften der zu besiedelnden Oberfläche (Hydrophobizität, chemische Zusammensetzung, Oberflächenladung und Oberflächenstruktur), welche die Biofilmbildung beeinflussen. Zum anderen wird die Biofilmbildung durch die besiedelnden Organismen bestimmt (Bakterienspezies, Zellzahl, Ernährungszustand, Wachstumsphase, Adhärenzfaktoren auf der Bakterienoberfläche). Zusätzlich spielt das umgebende Milieu mit dem Vorhandensein von organischen und anorganischen Substanzen, seinem pH-Wert, seiner Oberflächenspannung und Viskosität aber auch die Temperatur und die atmosphärischen Bedingungen eine Rolle für die Biofilmbildung (Flemming und Wingender, 2001a)

1.1.3 Mikrobielle Kommunikation in Biofilmen

Zwischen den Mikroorganismen eines Biofilms findet eine intensive Kommunikation mittels sezernierter Signalmoleküle statt, die als „Quorum Sensing“ (QS) bezeichnet wird. Als Folge davon kommt es zu definierten Regulationsaktivitäten. Der Begriff Quorum Sensing Regulation bezeichnet dementsprechend das Vermögen der koordinierten Genexpression in Abhängigkeit von der Zelldichte

und dem damit verbundenen synchronen Agieren in einer Gruppe (Fuqua *et al.*, 1994; Withers *et al.*, 2001; Podbielski und Kreikemeyer, 2004). Dadurch werden unter anderem das Wachstumsverhalten und die Virulenz der Mikroorganismen zu einem bestimmten Zeitpunkt determiniert.

Die von den Bakterien produzierten chemischen Signale (Autoinduktoren) können mit spezifischen Rezeptoren der bakterieneigenen und der benachbarten Bakterienzellen interagieren. Bei vielen Gram-negativen Bakterien erfolgt die Kommunikation über chemisch verschiedene N-Acyl-Homoserinlactone (AHLs) (Steindler und Venturi, 2007; Williams *et al.*, 2007). Gram-positive Bakterien verwenden dagegen Peptid-Signalmoleküle (Williams *et al.*, 2007). Diese spezifischen Signalmoleküle (AHLs und Peptide) ermöglichen die bakterielle Zell-Zell Kommunikation innerhalb einer Art (Flemming und Wingender, 2001b). Darüber hinaus gibt es Signalmoleküle (Moleküle der LuxS Familie von Autoinduktoren), genannt *Autoinducer 2* (AI-2), die scheinbar universell bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienarten vorkommen und die Kommunikation verschiedener Spezies untereinander ermöglichen (Xavier und Bassler, 2003; Federle, 2009). Zudem kontrolliert AI-2 verschiedene Prozesse wie die Produktion von Virulenzfaktoren, die Biofilmbildung und die Beweglichkeit der Bakterien (Federle und Bassler, 2003; Williams *et al.*, 2007).

Die Produktion solcher Autoinduktoren führt ab einer bestimmten Intensität zur Expression spezifischer Zielgene, wodurch die Bakterien auf verschiedenste Umwelt-Stimuli reagieren und in einer für sie zumeist feindlichen Umwelt überleben können (Givsko *et al.*, 2008).

1.1.4 Vorkommen mikrobieller Biofilme

Obwohl Biofilme in der Natur allgegenwärtig sind, wurde ihre klinische Bedeutung in der Human- und Tiermedizin häufig stark unterschätzt. Biofilme finden sich im lebenden Organismus z. B. auf der Haut, im Mund und auf den Schleimhäuten des Darmes (Haut-, Mund- und Darmflora). Die Komposition der residenten Mikroflora ist dabei für die verschiedenen Habitate charakteristisch (Tannock, 1995). Welche mikrobiellen Gemeinschaften wiederum bestimmte Habitate kolonisieren, hängt von verschiedenen Faktoren, wie Rezeptoren für die Adhäsion, notwendige Nährstoffe und Ko-Faktoren für das Wachstum, wie auch einem entsprechenden pH-Wert, dem Redoxpotential und den atmosphärischen Bedingungen ab (Marsh, 2003). Einmal etabliert bleibt diese Mikroflora über die Zeit relativ konstant, was durch zahlreiche Interaktionen sowohl zwischen den Mikroorganismen als auch dem Wirt und den Mikroorganismen begründet ist (Marsh, 1989).

Zudem sind auf einer menschlichen oder tierischen Oberfläche bzw. in einem Gewebe gebildete Biofilme zumeist weder durch die Wirtsabwehr noch durch äußerliche (z.B. ärztliche) Maßnahmen zu beseitigen. Es wird angenommen, dass bakterielle Biofilme in mehr als 60 % aller mikrobiellen Infektionen involviert sind (Wolcott, 2008). Zudem gilt die ausgeprägte Antibiotikaresistenz der Bakterien in Biofilmen inzwischen als Hauptursache für eine Reihe von nur sehr unzureichend zu behandelnden chronischen Infektionen. Dazu zählt beispielsweise die Endokarditis lenta (subkutan verlaufende bakterielle Endokarditis), die chronisch bakterielle Prostatitis oder die mit der zystischen

Fibrose (Mukoviszidose) assoziierte bakterielle Infektion der tiefen Atemwege (Costerton *et al.*, 1999; Davey und O'Toole, 2000). In der nachfolgenden Tabelle sind einige Biofilm-assoziierte Erkrankungen aufgeführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Beispiele einiger Biofilm-assoziiierter Erkrankungen.

oral	an anderen Körperstellen
Karies	Otitis media
Parodontitis marginalis	Bakterielle Prostatitis
Parodontitis apicalis	Gallenwegsinfektionen
	Bakterielle Endokarditis
	Osteomyelitis

Zudem spielen Biofilme eine besondere Rolle bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Gerade die Verwendung von Implantaten, künstlichen Herzklappen und Kathetern birgt ein besonders hohes Risiko für die Kontamination und Besiedlung durch pathogene Biofilme mit Bakterienarten wie *S. aureus* und *S. epidermidis* (Owens und Stoessel, 2008).

1.2 Biofilme in der Mundhöhle

Biofilmbildende Bakterien besiedeln verschiedene Stellen in der Mundhöhle und im Rachen des Menschen. Dies betrifft z. B. Epithelien mit langsamer Zellteilungsrate und ohne unspezifische Abwehrmechanismen wie Schleimproduktion oder Zilienschlag (Ausführungsgänge der Speicheldrüsen, hinteres Drittel der Zungenoberseite, Krypten der Tonsillen). Neben diesen Zielstrukturen ist die Besiedlung von Zahnoberflächen durch biofilmbildende Bakterien von großer Bedeutung. Bereits Antoni van Leeuwenhoek hatte in den Untersuchungen seines Zahnbelages „Animacules“ (kleine Lebewesen) entdeckt. Diese Gemeinschaften von Kleinstlebewesen werden in der Zahnmedizin als Plaque bezeichnet. Inzwischen konnte belegt werden, dass die Plaque ein makroskopisch sichtbares Korrelat eines bakteriellen Biofilms darstellt, der auf der anorganischen Zahnoberfläche anhaftet (Lamont und Jenkinson, 1998).

Zur Plaquebildung kommt es erstmalig mit Beginn der Dentition (dem Zahnen) und danach regelmäßig unmittelbar nach jeder Reinigung der Zahnoberflächen. Wie auch bei Biofilmen auf unbelebten Oberflächen wird zunächst die Zahnoberfläche mit einer Pellikelschicht konditioniert. Konkret binden im Speichel gelöste unterschiedliche Glykoproteine, Mucine und Enzyme sowie einige von Bakterien ausgeschiedene Substanzen an das Hydroxiapatit (Kalzium-Phosphat) des Zahnschmelz (Gibbons *et al.*, 1988; Gibbons *et al.*, 1991; Busscher *et al.*, 2000). Die im Pellikel enthaltenen Proteine weisen Prolin-reiche Domänen auf, die durch ein C-terminales Prolin-Glutamin-Dipeptid eine Rezeptorstruktur für orale Bakterienarten bilden (Gibbons *et al.*, 1991; Lendenmann *et al.*, 2000). Die Erkennung dieser Rezeptoren ist wie für Biofilme im Allgemeinen der erste Schritt in

der Entstehung der bakteriellen Plaque (Ruhl *et al.*, 2004). Vor allem orale Streptokokkenspezies tragen Adhäsine, die mit verschiedenen Arten von Speichel-Rezeptorstrukturen in Wechselwirkung treten können (Ruhl *et al.*, 2004). Daher werden diese Bakterien als Primärkolonisierer bezeichnet. Nach der initialen Besiedlung der freien Oberfläche findet in Anpassung an die spezifischen Umgebungsbedingungen eine Reifung der Strukturen des oralen Biofilms statt. Dies umfasst zum einen das Wachstum und die Vermehrung der Primärkolonisierer und zum anderen das Hinzutreten neuer Spezies, größtenteils Gram-negativer Stäbchen (Rosan und Lamont, 2000). Für die Anlagerung weiterer mit den Primärkolonisierern eng verwandter Bakterien ist die Synthese und Ablagerung von z. B. Polysacchariden durch *S. mutans* wichtig (Vickerman *et al.*, 1991; Vickerman und Jones, 1995). Dafür metabolisiert diese Spezies Saccharose und synthetisiert dabei α -(1,6)-wasserlösliche und α -(1,3)-wasserunlösliche Glukane (Paes Leme *et al.*, 2006; Islam, 2007). Mit den Primärkolonisierern wenig verwandte, neu hinzutretende Spezies binden an den reifenden Biofilm auf den Wegen der Ko-Adhäsion und der Ko-Aggregation.

Der Begriff Ko-Adhäsion beschreibt die Bindung neu hinzukommender Bakterien, der Sekundärkolonisierer, an bereits im Biofilm residente Bakterien, während mit Ko-Aggregation die Bindung von Bakterien aus der planktonischen Phase aneinander mit nachfolgender Adhärenz der Aggregate an Biofilmstrukturen bezeichnet wird (Kolenbrander, 1989; Kolenbrander *et al.*, 1993; Kolenbrander und London, 1993; Kolenbrander, 2000; Busscher und van der Mei, 1997). Auf beiden Wegen entstehen innerhalb des Biofilms regelrechte Brücken (*bridging*) aus Bakterien einer oder mehrerer Spezies (Kolenbrander, 1989; Jenkinson und Lamont, 1997; Kolenbrander, 2000). Weitere Brücken bilden sich durch Anheftung von Sekundärkolonisierern an die extrazellulären Polysaccharide (Rosan und Lamont, 2000), wodurch komplex strukturierte Multi-Spezies Biofilme entstehen.

Zur Ausbreitung des Lebensraumes lösen sich von reifen Biofilmen kontinuierlich Bakterien aus den oberen Schichten ab. Dies erfolgt durch aktive Bewegung nach Wiederanschalten der Flagellenexpression oder passiv durch Fortschwimmen in der umgebenden Flüssigkeit nach Verlust der Bindung an den Biofilm durch Anschalten des Apoptoseprogramms in Brücken-bildenden Bakterien (Costerton *et al.*, 1999; Stoodley, 2001). Sofern dieser Vorgang humanpathogene Bakterien involviert und von einem primären Infektionsherd ausgeht, wird dies als Metastasierung bezeichnet.

Inzwischen wurden mehr als 700 Bakterienarten in der Mundhöhle gesunder Menschen nachgewiesen, wobei die Zusammensetzung bezüglich beteiligter Arten und Zellzahlen innerhalb einer Art individuell verschieden ist (Kulik *et al.*, 2001; Aas *et al.*, 2005). Zudem unterscheiden sich diese Parameter auch in der Mundhöhle eines Menschen je nach genauer Lokalisation.

Zu den frühen Kolonisierern der Zahnoberflächen gehören hauptsächlich Mitglieder der Gattung *Streptococcus* (Rosan und Lamont, 2000). Die oralen Streptokokken werden in 6 verschiedene Gruppen unterteilt: 1. *Anginosus*-Gruppe (*S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*), 2. *Mitis*-Gruppe (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*), 3. *Mutans*-Gruppe (*S. mutans*, *S. sobrinus*), 4. *Salivarius*-

Gruppe (*S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. thermophilus*), 5. *Sanguinis*-Gruppe (*S. gordonii*, *S. parasanguinis*, *S. sanguinis*) und 6. *Bovis*-Gruppe (*S. equinus*, *S. gallolyticus*, *S. infantarius*) (Facklam, 2002; Doern und Burnham, 2010). Drei Spezies sind bei besonders vielen Menschen und jeweils in besonders hoher Zahl nachweisbar: *S. mitis*, *S. sanguinis* und *S. oralis* (Nyvad und Kilian, 1987; Nyvad und Kilian, 1990; Macpherson *et al.*, 1991). *S. salivarius* macht dagegen nur einen geringen Teil der Plaque-Flora aus (Scheie, 1994).

Des Weiteren wurden Mitglieder der Gattungen *Actinomyces*, *Haemophilus*, *Neisseria*, und *Veillonella* auf gesunden Zähnen identifiziert (Liljemark *et al.*, 1986; Nyvad und Kilian, 1987). Einmal etabliert bleibt diese Mikroflora relativ stabil, was als mikrobielle Homöostase bezeichnet wird (Marsh, 1989). Eine substantielle Veränderung im Habitat kann jedoch zu einer Störung dieser Homöostase führen. Beispielsweise kann die Änderung der Ernährung, Zahnung, oder Reduktion im Speichelfluss zu einem Ungleichgewicht der oralen Mikroflora führen (Marsh, 2000). Zusätzlich haben auch die orale Hygiene und das Vorhandensein bestimmter Risikofaktoren (genetische Prädispositionen, Rauchen, Diabetis mellitus) einen Einfluss auf diese Balance (Loe, 1993; Darveau *et al.*, 1997; Tomar und Asma, 2000; Michalowicz *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 2007).

1.3 Karies, Gingivitis und Parodontitis

1.3.1 Karies

Karies ist eine fast allen Menschen bekannte Erkrankung der Zahnhartgewebe Zahnschmelz und Dentin. Aus dem Lateinischen übersetzt bedeutet „caries“ Morschheit und Fäulnis. Die Stadien der Karies reichen von der Initialkaries über die Dentinkaries, die Tiefenkaries (*caries profunda*) bis hin zur Zahnfäule (*caries penetrans*). In Deutschland ist nur ca. 1 Prozent der Erwachsenen zeitlebens kariesfrei. Über die Entstehung von Karies gibt es mehrere Theorien. Heute ist die chemoparasitäre Theorie nach Willoughby D. Miller von 1890 allgemein anerkannt (Miller, 1973). Demnach kommt es aufgrund verschiedener Faktoren zur Zerstörung der Zahnhartgewebe in mehreren Stufen. Unter anderem spielt die Zahnbeschaffenheit, der Speichelfluss und dessen Zusammensetzung, die Zusammensetzung der Nahrung, die Bildung von Plaque, die orale Mundhygiene, genetische Prädisposition und die Zeit eine entscheidende Rolle. Später konnten Orland und Kollegen sowie Fitzgerald und Mitarbeiter an Ratten zudem zeigen, dass die Bildung von Karies nur in Anwesenheit von Mikroorganismen abläuft (Orland *et al.*, 1954; Orland *et al.*, 1955; Fitzgerald *et al.*, 1960). Diese Mikroorganismen bilden aus Nahrungszuckern über den Weg der Fermentierung organische Säuren, was zu einer Senkung des pH-Werts in der Plaque führt. Eine längere Exposition der Plaque gegen niedrige pH-Werte geht mit einer Inhibition von säuresensitiven Mikroorganismen (z. B. *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii*) und einer Mengenzunahme von säurebildenden und säuretoleranten Bakterien, speziell den *Mutans*-Streptokokken (*S. mutans*, *S. sobrinus*) sowie Laktobazillen (*Lactobacillus casei*) und *Veillonella dispar* einher. Diese Verschiebung in der Menge und der physiologischen Leistung der

lokalen Mikroflora stabilisiert sich auf neuem, für den Wirt ungünstigem Niveau (Bradshaw *et al.*, 1989; Marsh, 1994; Bradshaw und Marsh, 1998; Islam *et al.*, 2007). In der Folge kommt es zu einer Karies-typischen Demineralisierung des Zahnschmelzes (Loesche, 1986; Bowden, 1990; Marsh, 1994; Marsh, 1999a).

Sofern der schützende Schmelz punktuell komplett aufgelöst wird, kommt es unter Verschiebung der beteiligten Spezies hin zu proteolytisch aktiven Aktinomyzeten zur Dentinkaries, die den gesamten Zahn zersetzen kann. Komplikationen des Prozesses sind Entzündungen der Pulpa, die apikale Parodontitis (Entzündungen des Zahnhalteapparates an der Wurzelspitze), Abszesse und Osteomyelitis.

Um der Karies entgegenzuwirken, sind verschiedene Vorbeugungsmaßnahmen bekannt. Dazu gehören unter anderem eine ausreichende orale Hygiene, eine Beschränkung der Zuckeraufnahme und die Prophylaxe mit Fluorid (Islam *et al.*, 2007).

1.3.2 Gingivitis

Sowohl die Gingivitis (Zahnfleischentzündung) als auch die im Nachfolgenden beschriebene Parodontitis zählen zu den parodontalen Erkrankungen. Sie wurden aufgrund unterschiedlicher Parameter der Krankheitsentstehung und deren Verlauf 1999 durch Gary C. Armitage neu klassifiziert (Armitage, 1999).

Gingivitis ist eine akute oder chronische Entzündung des Zahnfleisches (Gingiva) und ist mit der Akkumulation von Plaque am Zahnfleischrand, konkret am Übergang des sichtbaren Bereichs des Zahns hin zum subgingivalen Sulcus, assoziiert. Diese Plaqueakkumulation kann zu einer lokalen Entzündungsreaktion und einem gesteigerten Fluss der gingivalen Sulkusflüssigkeit führen. Charakteristisch für die Gingivitis ist das gerötete und geschwollene Zahnfleisch, welches bei Berührung leicht blutet (Kinane, 2001). Die Erkrankung verursacht jedoch zumeist keine Schmerzen. Als Erreger kommen prinzipiell alle in der Mundflora vorkommenden Bakterien in Betracht. Tatsächlich findet aber in den meisten untersuchten Gingivitis-Fällen eine Verschiebung der subgingivalen Mikroflora von Gram-positiven Kokken (Slots, 1977) zu Gram-positiven (*Actinomyces naeslundii*) und Gram-negativen Stäbchen (*Campylobacter gracilis* und *Tannerella forsythia*) (Tanner *et al.*, 1998) und weiter zu obligat anaeroben, asaccharolytischen Gram-negativen Stäbchen wie *Capnocytophaga* spp., *Fusobacterium* spp. und *Prevotella* spp. statt (Savitt und Socransky, 1984; Moore *et al.*, 1987; Marsh, 1994).

Eine chronifizierte Gingivitis kann zu dem Krankheitsbild Parodontitis führen und damit auf den Zement, das zahnaufhängende Ligament, den Kieferknochen und die Wurzelhaut übergreifen. Der Übergang geschieht jedoch nicht zwangsläufig und die genauen Mechanismen für den Übergang sind nicht vollständig geklärt. Es wird aber angenommen, dass das Zahnfleischbluten und der erhöhte Fluss der gingivalen Sulkusflüssigkeit das Wachstum von Spezies, die in die Parodontitis involviert sind, verbessern (Marsh, 1994).

1.3.3 Parodontitis – Parodontitis marginalis

Im Jahr 1921 hatte Oskar Weski zunächst den Begriff „Parodontose“ als Sammelbegriff für alle entzündlichen und nicht-entzündlichen Erkrankungen des Zahnbettes eingeführt. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts wird jedoch zwischen Parodontitis und Parodontose unterschieden. Dies entspricht der allgemein in der Medizin gebräuchlichen Definition, in der die Endung ‚-itis‘ für entzündliche und die Endung ‚-ose‘ für atrophische (Gewebschwund-) Prozesse steht.

Die Parodontitis (griech. „para“- neben, „dont“- zahn) wird zusätzlich noch in Parodontitis marginalis und Parodontitis apikalis unterteilt. Beides sind bakteriell bedingte Entzündungen. Die Parodontitis apikalis ist eine Entzündung an der Wurzelspitze eines Zahnes, typischerweise als Komplikation einer Karies. Auf diese Erkrankung wird im Weiteren nicht mehr eingegangen.

Die Parodontitis marginalis ist dagegen eine Entzündung des Zahnhalteapparates, wobei das den Zahn umgebende Gewebe betroffen ist. Sie ist durch Zahnfleischschwund und Rückgang des Kieferknochens gekennzeichnet, was sich letztlich in einer weitgehend irreversiblen Zerstörung des Zahnhalteapparates (Parodontium) zeigt. Ein Hauptunterscheidungsmerkmal der Parodontitis marginalis von der Gingivitis ist der vorhandene, röntgenologisch nachweisbare Abbau des Zahnhalteapparates. Zudem gilt die Anwesenheit von Zahnfleischtaschen mit einer Sondierungstiefe von ≥ 5 mm an den betroffenen Zähnen als diagnostisch hinreichender Beleg für das Bestehen einer Parodontitis (Timmerman und van der Weijden, 2006). Mit zunehmender Sondierungstiefe geht auch ein „*attachment*“ Verlust des betroffenen Zahns einher, der sich im weit fortgeschrittenen Fall durch eine abnorme Mobilität des Zahns äußert (Tanner *et al.*, 2005).

Parodontale Erkrankungen werden weltweit diagnostiziert. Sie sind ein bei praktisch allen Menschen im Verlauf ihres Lebens zumindest zeitweilig nachzuweisendes Beispiel für eine Biofilminfektion, die den Halt der Zähne bedroht und zu lokalen wie auch systemischen Komplikationen führen kann (Alblander und Rams, 2002; Seymour *et al.*, 2007).

Mehr als 82 % der Erwachsenen in den USA haben eine offenkundige Zahnfleiscentzündung (Alblander und Rams, 2002). In Westeuropa haben 36 % der 35-44-jährigen eine moderate Parodontitis und ungefähr 10 % leiden unter einer schweren Parodontitis (Sheiham und Netuveli, 2002)

Trotz des extrem häufigen Auftretens der Parodontitis zeigt die Erkrankung nur bei einem kleinen Anteil der Betroffenen einen ernsten Verlauf, z. B. im Sinne eines Zahnverlustes (Timmerman und van der Weijden, 2006). Davon ausgehend ist anzunehmen, dass es verschiedene Risikofaktoren für die Verlaufsform einer aggressiven Parodontitis gibt. Auf der Basis epidemiologischer Studien wurden als Risikofaktoren identifiziert: Diabetes mellitus und andere genetisch determinierte Erkrankungen, Stress, höheres Alter, ungenügende Mundhygiene mit den Kennzeichen Plaque und Zahnstein, sowie Auftreten bestimmter Mikroorganismen (Grossi *et al.*, 1995; Genco, 1996; Page und Beck, 1997; Timmerman und van der Weijden, 2006).

Die Ätiologie der Erkrankung ist multifaktoriell. Als primäre Ursache der Parodontitis wird die Anwesenheit von spezifischen Bakterienarten im subgingivalen Plaque-Biofilm angesehen (Tanner *et*

al., 2006). Warum diese Bakterien in der subgingivalen Plaque auftauchen und dort die vorhandene Mikroflora des gesunden Parodonts schrittweise verdrängen, sowie welche Schritte auf Mikroorganismenebene sukzessiv erfolgen müssen, ist weiterhin unklar (Dahlen *et al.*, 1992; Grossi *et al.*, 1994; Tanner *et al.*, 1998). So geht eine Hypothese zur Initiation der Parodontitis von einer allgemeinen Plaqueakkumulation mit einer ansteigenden Anzahl von Spezies der *Actinomyces*- und *Fusobacteria*-Gruppe und begleitender Gingivitis aus. Diese resultiert dann in einer Gewebsirritation deren Bedingungen die Ansiedlung von parodontalen Pathogenen begünstigen (Syed und Loesche, 1978; Moore und Moore, 1994). Eine andere Hypothese geht dagegen von einer direkten Ansiedlung oder Vermehrung von parodontalen Pathogenen in der Abwesenheit einer gingivalen Entzündung aus (Alaluusua *et al.*, 1991; van Steenberghe *et al.*, 1993; Saarela *et al.*, 1993; Kononen *et al.*, 1994a; Riviere *et al.*, 1996). Möglicherweise sind, neben verschiedenen Abfolgen der mikrobiellen Kolonisation, auch beide Mechanismen an der Entstehung parodontaler Erkrankungen beteiligt (Syed und Loesche, 1978; Moore *et al.*, 1982; Socransky *et al.*, 1988; Tanner *et al.*, 1991).

Die Komposition der subgingivalen Mikroflora von chronischen Parodontitis-Patienten wurde unter anderem durch Kulturtechniken (Moore und Moore, 1994; Tanner *et al.*, 1998; van Winkelhoff *et al.*, 2002), immunologische Techniken (Riviere *et al.*, 1996; Clerehugh *et al.*, 1997; Machtei *et al.*, 1999) und molekulare Methoden untersucht (Socransky *et al.*, 1998; Paster *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2003; de Lillo *et al.*, 2004).

Diese Studien zeigten, dass unter anderem die Gram-negativen Bakterien *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, und *Prevotella nigrescens* in die Pathogenese der Parodontitis involviert sind (Noiri und Ebisu, 2000). Van Winkelhoff und Kollegen untersuchten 116 verschiedene Patienten mit einer moderaten bis schweren Parodontitis und verglichen deren subgingivale Flora mit Proben von 94 gesunden Probanden aus den mesialen und distalen Bereichen der ersten Molaren (Van Winkelhoff *et al.*, 2002). Dabei konnten sie *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* (ehem. *Bacteroides forsythus*), *F. nucleatum* und *Parvimonas micra* (ehemals *Peptostreptococcus micros* bzw. *Micromonas micros*) als signifikante Marker einer destruktiven Parodontalerkrankung bei Erwachsenen identifizieren. *P. gingivalis* und *T. forsythia* waren dabei die am stärksten mit der Erkrankung assoziierten bakteriellen Marker. Sie kommen eher selten bei Personen ohne parodontalen Knochenabbau vor (Slots und Ting, 1999; van Winkelhoff *et al.*, 2002). Bereits 1998 wurden *T. forsythia*, *P. gingivalis* und *T. denticola* von Socransky und Kollegen in einem Komplex 1, dem so genannten roten Komplex, zusammengefasst, da diese Bakterien stark mit dem klinischen Erscheinungsbild einer parodontalen Erkrankung (Zahnfleischtaschentiefe, Sondierungsblutung) interferieren (Socransky *et al.*, 1998). Die Spezies *P. micra*, *F. nucleatum*, *P. nigrescens*, *P. intermedia* sowie *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae* und *Streptococcus constellatus* wurden von Socransky und Kollegen in einem zweiten, dem orangenen Komplex, zusammengefasst (Socransky *et al.*, 1998). Ali und

Kollegen fanden heraus, dass in subgingivalen Plaqueproben tiefer Zahnfleischtaschen einer Gruppe alter Parodontitis-Patienten die Spezies *P. intermedia* immer in der Anwesenheit von *F. nucleatum* vorkam (Ali *et al.*, 1994). Letztlich zeigen diese Studien, dass alle Bakterien des orangen und roten Komplexes eine mehr oder weniger wichtige Rolle in der Pathogenese der Parodontitis spielen.

Wenngleich man mittlerweile weiß, dass die in die Parodontitis involvierten Bakterien in der subgingivalen Plaque akkumulieren, so ist noch nicht genau bekannt, wo die Bakterien innerhalb der parodontalen Tasche vorliegen (van Winkelhoff *et al.*, 2002). Unterschiede in Sauerstoffgehalt, Nahrungszufluss, pH-Wert und metabolischen Produkten innerhalb der parodontalen Tasche verursachen eine Heterogenität der lokalen Umgebung. Damit hat jede Mikronische das Potential, die Kolonisation von unterschiedlichen Bakterienspezies zu erlauben.

Es ist anzunehmen, dass die Lokalisation und Verteilung der Bakterien im Zusammenhang mit der pathologischen parodontalen Destruktion stehen (Noiri *et al.*, 2001). In verschiedenen Studien wurden die Verteilung der Bakterien im subgingivalen Bereich und zusätzlich ihr Vorkommen am „Boden“ der parodontalen Taschen, der so genannten Plaque-freien Zone bestimmt, ohne dass sich daraus bisher pathogenetische Erkenntnisse ableiten ließen (Noiri *et al.*, 1997; Noiri und Ebisu, 2000; Noiri *et al.*, 2001).

Die bei der Parodontitis auftretende Gewebeerstörung kann sowohl direkt von der toxischen und enzymatischen Aktivität der subgingivalen Mikroflora als auch indirekt von der durch die Bakterien aktivierten Freisetzung lysosomaler Enzyme während der Phagozytose und/oder der Produktion von Zytokinen durch den Wirt herrühren (Page, 1991; Reynolds *et al.*, 1994). Gram-negative Stäbe und bewegliche Bakterien sind am stärksten mit der Gewebedestruktion assoziiert. Hierzu zählen insbesondere *A. actinomycetemomitans*, *Bacteroides* spp. und *Porphyromonas* spp., *Wolinella recta* und *F. nucleatum*. Ein diesen Bakterienarten gemeinsames Merkmal ist die Anwesenheit von Lipopolysaccharid in ihren Zellmembranen (Page, 1991). In Anwesenheit von Lipopolysaccharid und anderen durch die Bakterien freigesetzten/gebildeten Substanzen werden Wirts-Makrophagen, -Lymphozyten und -PMNs stimuliert, die wiederum verschiedene Zytokine und andere Mediatoren freisetzen (Page, 1991). Die resultierende Entzündungsreaktion ist offenbar maßgeblich für die Destruktion der parodontalen Gewebe verantwortlich (Davies, 2007).

Trotz der zahlreichen Untersuchungen zur Parodontitis wird diese Erkrankung längst nicht in all ihren Einzelheiten verstanden. Dabei wäre es, nicht nur wegen der beeinträchtigten Ästhetik bei einem Zahnverlust, sondern auch wegen der enormen Kosten der Behandlung solcher Erkrankungen und ihrer Komplikationen, von großem Interesse die Initiation und Progression zu verstehen. Damit würde gegebenenfalls die Entwicklung weit effizienterer Vorbeugungsmaßnahmen und Behandlungsstrategien ermöglicht.

1.4 Ziele der Arbeit

Aufgrund der weiterhin unklaren Details der Assoziation von oralen Bakterien bzw. Biofilmen und parodontalen Erkrankungen ist es wichtig zu wissen, welche Mikroorganismen in der Mundhöhle vorkommen, welche Mechanismen der Bakterien-Wirt Beziehung zugrunde liegen, und wie die Bakterien miteinander interagieren, um daraus Optimierungsstrategien der Therapie abzuleiten.

Gegenwärtig wird die Parodontitis durch mechanische Behandlung therapiert. Der Biofilm wird mit Metallinstrumenten abgeschabt, die Zahnoberfläche durch Polieren geglättet. Diese rein symptomatische Vorgehensweise ändert nichts an den offenkundig gestörten ökologischen Bedingungen im betroffenen Sulkus und muss, sofern nichts an den sonstigen Voraussetzungen der Erkrankung (Rauchen, Ernährung, Mundhygiene) geändert wird, regelmäßig wiederholt werden. Die Gabe von Antibiotika beschränkt sich auf den Aspekt der adjuvanten Therapie. Alleine gegeben führen sie wegen unzureichender Konzentration in den Zahntaschen und der besonderen Resistenz von Biofilmbakterien nicht zur Heilung.

Alternativ könnte die Parodontitistherapie subgingivale Biofilmstrukturen durch Hemmung bakterieller Interaktionen auflösen bzw. deren Ausbreitung verhindern. Um dies vorzubereiten, sind Untersuchungen an *in vitro* Modellen notwendig (Bradshaw *et al.*, 1996; Dibdin und Wimpenny, 1999; Wood *et al.*, 2000; Guggenheim *et al.*, 2001a; Guggenheim *et al.*, 2001b; Ausschill *et al.*, 2001; Zaura-Arite *et al.*, 2001; Guggenheim *et al.*, 2004; Hope und Wilson, 2006). So konnten bereits wichtige physiologische Eigenschaften und interbakterielle Aktionen Parodontitis-assoziiierter Bakterien aufgedeckt werden. Der Nachteil dieser Untersuchungen ist jedoch ihre geringe Vergleichbarkeit untereinander. Zudem sind einige Analysen wegen der Beschreibung der Techniken oder nur den Untersuchern zugänglichen Geräten schwer nachzuvollziehen, nicht reproduzierbar, sehr zeitaufwendig und/oder zu kostenintensiv.

In dieser Arbeit sollte ein Protokoll zur *in vitro* Biofilmbildung parodontaler Mikroorganismen etabliert werden, das neben der Repräsentativität und Flexibilität bezüglich des Einsatzes verschiedener Mikroorganismenarten eine gute Reproduzierbarkeit und eine einfache Handhabung bei gleichzeitig geringem finanziellem Aufwand aufweist. Damit wäre die Grundlage für eine Vergleichbarkeit mit zukünftigen Studien gegeben.

1. Für die Versuche wurden verschiedene Spezies der physiologischen Mikroflora (*S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*), der Karies (*S. mutans*) und der Parodontitis (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. gingivalis*, *S. intermedius*) verwendet.

Für die Etablierung von *in vitro* Biofilm Modellen sollten die oben genannten Spezies in verschiedenen Medien inkubiert und ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung analysiert werden. Dabei wurde sowohl die Biofilm-Masse quantifiziert, als auch die Biofilm-Struktur mittels verschiedener

mikroskopischer Techniken untersucht. Zudem sollte die Bestimmung der Vitalität und Lebensfähigkeit/Kultivierbarkeit der Spezies in bzw. aus dem Biofilm erfolgen.

2. Die für Mono-Spezies Biofilme etablierten Modelle sollten dann auf verschiedene Zwei-Spezies Kombinationen zur Untersuchung von Di-Spezies Biofilmen der oben genannten Bakterien übertragen werden. Um das Aufeinandertreffen physiologischer mit pathologischer Mikroflora zu simulieren, sollten *S. mitis* oder *S. salivarius* stets einen Kombinationspartner darstellen. Mit diesen Versuchen sollten wechselseitige Einflüsse auf Wachstum, Adhärenz, und/oder Biofilmbildung aufgedeckt werden. Dafür wurden wiederum die Biofilm-Masse, Biofilm-Struktur sowie die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen untersucht.

Auf Basis des optimierten Setups zur Untersuchung der *in vitro* Biofilmbildung und der ersten Analysen der Zwei-Spezies Kombinationen sollten dann alle nachfolgenden Studien aufbauen.

3. Diese umfassten Analysen mit zeitlicher bzw. räumlicher Trennung der Bakterien, da die Bakterien zum einen wahrscheinlich nicht zur gleichen Zeit an einer bestimmten Stelle in der Mundhöhle aufeinander treffen und zum anderen gegebenenfalls nicht im direkten Kontakt zueinander stehen.

3a. Für die Untersuchung des zeitlichen Aspekts wurden die Bakterien in einem Abstand von 24 Stunden zusammengebracht, wobei beide zu kombinierende Partner sowohl als Erst- als auch Zweit-Kolonisierer eingesetzt wurden. Mit dieser Untersuchung wurde überprüft, ob die Erst- bzw. Zweitkolonisation einer Spezies einen Einfluss auf die Adhärenz bzw. Biofilmbildung einer anderen Spezies hat.

3b. Die Studien zur räumlichen Trennung der Bakterien erfolgten mittels Transwell-System. Hierbei sind die Bakterien durch eine bakteriedichte, aber moleküldurchlässige Membran voneinander getrennt. Damit sollte untersucht werden, inwiefern ein Bakterium über eine räumliche Distanz die Adhärenz bzw. Biofilmbildung eines anderen Bakteriums beeinflussen kann.

4. Ferner sollte die extrazelluläre Matrix der *in vitro* Biofilme untersucht werden. Damit wurde analysiert, inwiefern Komponenten der EPS (DNA, Proteine, Kohlenhydrate) für die Di-Spezies Biofilmbildung eine Rolle spielen.

5. Schließlich sollten anhand der Ergebnisse von Punkt 1 bis 4 ausgewählte Zwei-Spezies Kombinationen bezüglich funktionaler Details wie z.B. des in Gegenwart des Biofilmpartners exprimierten Transkriptoms analysiert werden, um die auf physiologischer Ebene gewonnen Erkenntnisse auch auf molekularer Ebene zu verstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

In Tabelle 2 sind alle verwendeten Bakterienstämme, deren Charakteristika, Vorkommen und Herkunft/Referenz aufgeführt.

Tabelle 2: Bakterienstämme

Stamm	Kurzcharakteristik/Vorkommen	Herkunft/Referenz
<i>Streptococcus mitis</i>	fakultativ aerob, Gram-positiv, kokkenförmig, Wildtypstamm, Teil der physiologischen Mundflora	ATCC 11843
<i>Streptococcus mutans</i>	fakultativ aerob, Gram-positiv, kokkenförmig, Wildtypstamm, Karieserreger	DSM 20523
<i>S. mutans</i> UA159	fakultativ aerob, Gram-positiv, kokkenförmig, Genomsequenz bekannt, Wildtypstamm, Karieserreger	ATCC 700610
<i>S. mutans</i> UA159 $\Delta luxS$	fakultativ aerob, Gram-positiv, kokkenförmig, <i>luxS::ery</i> , Laborstamm	Prof. Wagner-Döbler, Braunschweig
<i>Streptococcus salivarius</i> K12	fakultativ aerob, Gram-positiv, kokkenförmig, probiotischer Wildtypstamm, Teil der physiologischen Mundflora	Dr. J. Tagg, Neuseeland
<i>Streptococcus sanguinis</i>	fakultativ aerob, Gram-positiv, kokkenförmig, Wildtypstamm, Teil der physiologischen Mundflora	DSM 20567
<i>S. sanguinis</i> SK36	fakultativ aerob, Gram-positiv, kokkenförmig, Genomsequenz bekannt, Wildtypstamm, Teil der physiologischen Mundflora	ATCC BAA-1455
<i>S. intermedius</i>	fakultativ aerob, Gram-positiv, kokkenförmig, Wildtypstamm, Parodontitis-assoziiertes Bakterium	AC 3105, Stammsammlung TU Aachen
<i>Aggregatibacter actinomycetem-comitans</i>	fakultativ aerob, Gram-negativ, kurze Stäbchen, Wildtypstamm, Parodontitis-assoziiertes Bakterium	DSMZ 11123
<i>A. actinomycetem-comitans</i> HK1651	fakultativ aerob, Gram-negativ, kurze Stäbchen, Genomsequenz bekannt, Wildtypstamm, Parodontitis-assoziiertes Bakterium	ATCC 700685D

Stamm	Kurzcharakteristik/Vorkommen	Herkunft/Referenz
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	obligat anaerob, Gram-negativ, kurze Stäbchen, Wildtypstamm, Parodontitiserreger	ATCC 33277
<i>P. gingivalis</i> W83	obligat anaerob, Gram-negativ, kurze Stäbchen, Genomsequenz bekannt, Wildtypstamm, Parodontitiserreger	ATCC BAA-308
<i>P. gingivalis</i> W50	obligat anaerob, Gram-negativ, kurze Stäbchen, Wildtypstamm, Parodontitiserreger	Prof. Curtis, London
<i>P. gingivalis</i> W50 $\Delta luxS$	obligat anaerob, Gram-negativ, kurze Stäbchen, Parodontitiserreger	Prof. Curtis, London
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	obligat anaerob, Gram-negativ, lange Stäbchen, Genomsequenz bekannt, Wildtypstamm, Parodontitis-assoziiertes Bakterium	ATCC 25586
<i>F. nucleatum</i>	obligat anaerob, gram negativ, lange Stäbchen, Wildtypstamm, Parodontitis-assoziiertes Bakterium	ATCC 23726
<i>Parvimonas micra</i>	obligat anaerob, Gram-positiv, kokkenförmig, Wildtypstamm, Parodontitis-assoziiertes Bakterium	ATCC 33270

2.2 Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht der fakultativ aeroben Bakterien (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans*) erfolgte in Brain-Heart-Infusion Medium (BHI, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Als Festmedien dienten sowohl BHI-Agar-Platten, für deren Herstellung dem Medium 1,5 % [w/v] Agar zugesetzt wurden, als auch Columbia-Blut-Agar-Platten (Columbia Agar mit 5 % Schafsblut, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England).

Brain Heart Infusion Medium (BHI)

BHI 37 g
H₂O_{reinst} ad 1 l

Zur Anzucht der obligat anaeroben Bakterien (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. micra*) in Flüssigkulturen wurde BHI-Medium mit verschiedenen Zusätzen verwendet. Zur Kultivierung von *P. gingivalis* wurde dem Medium 0,005 mg/ml Hemin und 0,05 M Galaktose zugesetzt, während das Medium von *F. nucleatum* und *P. micra* 0,25 % Glutamat enthielt. Als Festmedium diente für diese Bakterien Columbia-Blut-Agar.

Hemin-Stamm-Lösung (10 mg/ml [w/v], 10 ml)

Hemin	100 mg
1 N NaOH	1 ml
H ₂ O _{reinst}	ad 10 ml

→ Lösen des Hemin in 1 N NaOH und anschließende Zugabe von Wasser. Lagerung der Lösung nach dem Sterilfiltrieren bei 4 °C.

Galaktose-Stamm-Lösung (1 M, 250 ml)

Galaktose	45,04 g
H ₂ O _{reinst}	ad 250 ml

Glutamat-Stamm-Lösung (5 % [w/v], 250 ml)

Glutamat	12,5 g
H ₂ O _{reinst}	ad 250 ml

Das BHI-Medium wurde zur Sterilisation bei 121 °C autoklaviert.

Die hitzelablen Lösungen Hemin, Galaktose und Glutamat wurden mittels Sterilfilter (PVDF-Membranfilter, Porengröße 0,2 µm, Braun, Melsungen, D) nach dem Abkühlen des autoklavierten Mediums auf < 50 °C zugesetzt.

Die Anzucht der fakultativ aeroben Bakterien erfolgte aerob bei 37 °C und 5 % CO₂, während die obligat anaeroben Bakterien bei 37 °C strikt anaerob (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) kultiviert wurden. Als Kulturgefäße dienten 50 ml-Falkonröhrchen. Nach 12 bzw. 18 Stunden Inkubation der fakultativ aeroben und ca. 60 Stunden Inkubation der obligat anaeroben Bakterien wurden die Zellen geerntet.

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation der Kulturgefäße (Heraeus Variofuge 3.0, 4500 x g, 10 min, 4 °C).

Kulturen auf BHI- oder Columbia-Blut-Agar-Platten wurden aerob bei 5 % CO₂ bzw. anaerob (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) bei 37 °C über 48 h bzw. 72 – 96 h bebrütet.

2.3 Stammhaltung

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien wurde das *Microbank™ System* (Pro-Lab Diagnostics, Neston, England) nach Vorgaben des Herstellers genutzt. Die Lagerung dieser Stämme erfolgte bei –80 °C.

Die Reaktivierung erfolgte auf Columbia-Blut-Agar-Platten. Die beimpften Platten der fakultativ aeroben Bakterien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂, die der obligat anaeroben Bakterien bei 37 °C und 80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂ bebrütet. Die Aufbewahrung der Platten mit den fakultativ aeroben Bakterien erfolgte bei 4 °C. Nach jeweils 14-21 Tagen wurden die Kulturen auf frische Columbia-Blut-Agar-Platten überführt. Die Lagerplatten der obligat anaeroben Bakterien wurden dagegen

anaerob bei 37 °C aufbewahrt. Hier wurden die Kulturen wöchentlich auf frische Agarplatten ausgestrichen. Nach spätestens zwei Monaten (4 bzw. 8 Passagen) wurden sämtliche Bakterienkulturen durch neue Ansätze aus den -80 °C Lagerbeständen ersetzt.

2.4 Nährmedien und Zusätze zur Untersuchung der Biofilmbildung

Brain Heart Infusion Medium (BHI) (siehe 0)

Künstlicher Speichel (*artificial saliva*, Pratten *et al.*, 1998)

Lab Lemco Powder	0,1 % [w/v]
Proteose Pepton Nr. 3	0,5 % [w/v]
Hefeextrakt	0,2 % [w/v]
Mucin	0,25 % [w/v]
NaCl	6 mM
KCl	2,7 mM
K ₂ HPO ₄	1,5 mM
KH ₂ PO ₄	3,5 mM
H ₂ O _{reinst}	ad 1000 ml
pH 6,7	

Das Medium wurde zur Sterilisation bei 121 °C autoklaviert. Je nach Versuchsaufbau wurde das Medium mit oder ohne Mucin angesetzt. Vor dem Gebrauch des Mediums wurde sterilfiltrierte Harnsäure (Endkonzentration 0,5 %) sowie BHI-Medium in einem Verhältnis 1:3 zugesetzt.

Chemisch definiertes Medium (CDM)

Das Medium wurde entsprechend der Angaben von van de Rijn und Kessler (1980) aus Einzelkomponenten (Aminosäuren, Vitamine, Nukleotide, etc., siehe 7.1) zusammengestellt (van de Rijn und Kessler, 1980). Diese Einzelkomponenten wurden entweder aus bereits zusammengestellten, sterilfiltrierten Stammlösungen entnommen oder direkt als Feststoff zugegeben. Je nach Versuchsaufbau wurden dabei einzelne Komponenten weggelassen. Das fertige CDM wurde dann sterilfiltriert und bei 4 °C für maximal 2 Wochen gelagert. Vor Gebrauch des Medium wurde jeweils frisches NaHCO₃ (Endkonzentration 2,5 g/l) und L-Cystein (Endkonzentration 0,5 g/l) zugesetzt.

Humanserum

Das in den Versuchen verwendete Humanserum wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen. Es wurde vom Hersteller aus dem Vollblut eines männlichen Spenders mit der Blutgruppe AB isoliert, sterilfiltriert und immunologisch getestet.

Glukose-Stamm-Lösung (1 M, 250 ml)

Glukose	45,04 g
H ₂ O _{reinst}	ad 250 ml

Saccharose-Stamm-Lösung (1 M, 250 ml)

Saccharose	85,58 g
H ₂ O _{reinst}	ad 250 ml

Galaktose-Stammlösung (siehe 0)

Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.5 Farbstoffe für die Fluoreszenzmikroskopie

1. Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Darmstadt, D)

Das Kit umfasst zwei Farbkomponenten, Syto9 (Färbung lebender Bakterien, grün fluoreszierend) und Propidiumiodid (Färbung toter Bakterien, rot fluoreszierend). Beide Komponenten wurden 1:1 gemischt und diese Färbelösung, wie auch die Einzelkomponenten, bei -20 °C aufbewahrt. Für die Lebend/Tot-Färbung von Bakterien in Biofilmen wurde 1 µl der Farblösung pro 1000 µl PBS gemischt und dann zum Biofilm gegeben.

2. Live BacLight™ Bacterial Gram Stain Kit (Invitrogen, Darmstadt, D)

Das Kit umfasst zwei Farbkomponenten, Hexidiumiodid (Anfärbung von Gram-positiven Bakterien, rot fluoreszierend) und Syto9 (Färbung lebender Bakterien, grün fluoreszierend). Beide Komponenten wurden in einem Verhältnis 1:1 auf ein Volumen von 50 µl gemischt und das Gemisch, wie die Einzelkomponenten, bei -20 °C aufbewahrt. Für die Färbung von Biofilmen wurde 1 µl in 1000 µl PBS gelöst und auf die Biofilme gegeben. In Gram-positiven Bakterien verdrängt Hexidiumiodid Syto9, so dass nur Gram-negative Bakterien grün leuchten.

3. ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain and Viability Kit (Invitrogen, Darmstadt, D)

Das Kit umfasst drei Farbkomponenten, DAPI-Lösung (Komponente A, Färbung lebender Bakterien, blau fluoreszierend), SYTOX Green in DMSO (Komponente B, Färbung toter Zellen, grün fluoreszierend) und Texas Red-X *conjugate wheat germ agglutinin* (Komponente C, Färbung Gram-positiver Bakterien, rot fluoreszierend). Zur Vorbereitung der Versuche wurde 1 Vol. Komponente A und 1 Vol. Komponente B gemischt und anschließend 1:10 mit Wasser (H₂O_{reinst}) verdünnt. Von Komponente C wurde zunächst eine Stammlösung von 2 mg/ml hergestellt. Die Einzelkomponenten, die aliquotierten Lösungen der Komponente C, sowie eine fertige Mischung von Komponente A und B wurden bei -20 °C aufbewahrt. Für die Lebend/Tot plus Gram-Färbung wurden dann 5 µl von Gemisch A/B und 2,5 µl Komponente C pro 100 µl physiologischer Kochsalzlösung als Färbelösung direkt den Bakterien zugesetzt.

2.6 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden hauptsächlich von MERCK (Darmstadt, D), SIGMA (Taufkirchen, D), J.T.BAKER (Philippsburg, USA) und ROTH GmbH (Karlsruhe, D) bezogen. Methodenspezifische Puffer, Lösungen und Enzyme werden in den entsprechenden Protokollen aufgeführt. Die folgenden, allgemeinen Puffer und Lösungen wurden bei mehreren Methoden verwendet.

10x PBS (*phosphate buffered saline, 1 l*)

NaCl	1,37 M
KCl	0,027 M
KH ₂ PO ₄	0,015 M
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,079 M
H ₂ O _{reinst}	ad 1000 ml
pH 7,4	

Der Puffer wurde bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung einer 1x PBS-Lösung wurde 10x PBS 1:10 in Wasser (H₂O_{reinst}) verdünnt, der pH überprüft (pH 7,4) und der Puffer ebenfalls autoklaviert.

50x TAE-Puffer

Tris	2 M
100 % Essigsäure	0,1 M
EDTA pH 8,0	0,5 M

EDTA

EDTA, pH 8.0	0,5 M
--------------	-------

10x TE-Puffer

Tris-HCl pH 7,4	0,1 M
EDTA	0,01 M

5x MOPS-Puffer

MOPS	0,1 M
Na-Acetat	0,04 M
EDTA	0,005 M
pH 7.0	

2.7 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden alle Chemikalien von folgenden Firmen bezogen:

Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
AppliChem (Darmstadt, D)
Serva (Heidelberg, D)
Merck KG (Darmstadt, D)
Fluka Chemie GmbH (Deisenhofen, D)
Oxoid (Wesel, D)
Difco (Detroit, USA)
Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)

2.8 Laborgeräte und Software

Agarose-Gelelektrophoreseapparatur	Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA
Analysenwaage Typ BP 4100S	Sartorius, Göttingen, D
Biofuge pico	Heraeus, Hamburg, D
Biofuge fresco	Heraeus, Hamburg, D
Brutschrank Typ B6060	Heraeus, Hamburg, D
Brutschrank, HeraCell	Heraeus, Hamburg, D
CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder, Tuttlingen, D
Elektronenmikroskop DSM 960A	Carl Zeiss, Jena, D
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Hamburg, D
Geldokumentation	Intas Science Imaging, Göttingen, D
GenArray Scanner	Agilent Technologies Inc., S. Clara, USA
Heizblock Typ Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, D
Hybridisierungstation (HybeStation)	NimbleGen Systems GmbH, Waldkraiburg, D
Konfokales Laser Raster Mikroskop -	
Leica TCS SP2 AOBS	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Kühlzentrifuge Typ 5417R	Eppendorf, Hamburg, D
Kritisch Punkt Trockner	Emitech, Ashford, UK
Lyophilisator Alpha 1-4	Christ Laborgeräte, Osterode, D
miniMACS anaerobic workstation	DWS Meintrupp, Lähden-Holte, D
pH-Meter MP220	Denver Instrument GmbH, Göttingen, D
pH-Meter inoLab® pH720	WTW GmbH, Weilheim, D
Picodrop Microlitre Spectrophotometer	Biozyme, Oldendorf, D
Ribolyser	Hybaid, Teddington, UK
REAXtop Reagenzglasschüttler	HeidolphInstruments GmbH, Schwabach, D
Schlauchpumpe ECOLINE VC-360	ISMA TEC, Wertheim-Mondfeld, D

Sorvall®-Zentrifuge RC5C	Sorvall Dtl. GmbH, Bad Homburg, D
Sorvall® SS34 Rotor	Sorvall Dtl. GmbH, Bad Homburg, D
Sorvall® GS-3 Rotor	Sorvall Dtl. GmbH, Bad Homburg, D
Sorvall-Ultrazentrifuge Ultra Pro80	Sorvall Dtl. GmbH, Bad Homburg, D
Spektrophotometer SmartSpec TM 3000	Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA
SpeedVac Concentrator, DNA 120-230	ThermoElectronCorporation,Milford, USA
Swinging Bucket Ultracentrifuge Rotor AH-629	Sorvall Dtl. GmbH, Bad Homburg, D
Tecan Microplate Reader infinite® 200	Tecan Trading GmbH, Männedorf, CH
Tecan Spectra Reader Classic	Tecan Trading GmbH, Männedorf, CH
Tpersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen, D
Transmissionselektronenmikroskop Libra 120	Carl Zeiss, Jena, D
Thermoblock PCR T3	Biometra, Göttingen, D
Ultraschall-Gerät UP200S	Hielscher Ultrasonic GmbH, Teltow
Ultraschall-Sonotrode S3	Hielscher Ultrasonic GmbH, Teltow
Vortex-Genie Touch Mixer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Withley MG500 anaerobic workstation	DWS Meintrupp, Lähden-Holte, D
Zentrifuge Varifuge 3.OR	Heraeus, Hamburg, D

Folgende Software wurde in dieser Arbeit verwendet:

- Microsoft Office Programme (Word, Exel, PowerPoint) (Microsoft, Redmond, USA)
- Leica TCS SP2 AOBS Konfokale Laser Raster Software (Leica Microsystems, Wetzlar, D)
- easyWin screening Software (Tecan Trading GmbH, Männedorf, CH)
- NimbleScan Software (NimbleGen, Madison, USA)
- GeneSpring GX (Version 10.0, Agilent Technologies, Waldbronn, D)
- Imaris x64 Software (Bitplane, Zürich, CH)
- Metavue (Molecular Devices, Downingtown, USA)
- Geldokumentation Intas GDS application software (Intas Science Imaging, Göttingen, D)

2.9 Protokoll zur Biofilmbildung

Die Bakterien wurden in BHI bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase angezogen, zentrifugiert (Heraeus Variofuge 3.0, 10 min, 4000 rpm, 4 °C) und die Bakteriensedimente mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde für jede Spezies eine Suspension mit einer optischen Dichte bei 600 nm (OD600) eingestellt, die etwa 1×10^8 Zellen/ml entsprach. Jede Bakteriensuspension wurde 1:10 mit dem passenden Kulturmedium verdünnt und dann in unbeschichtete 24-Well Zellkultur-Platten oder 96-Well Mikrotiter-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Alternativ wurden Fibronectin-beschichtete 24-Well Zellkultur- bzw. 96-Well Mikrotiter-Platten verwendet, um den Einfluss einer „abiotischen“ versus „biotischen“ Oberfläche zu überprüfen. Die

Beschichtung mit 100 µl Fibronectin (Roche, Mannheim, D) pro Well (Konzentration 50 µg/ml) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Vor der Inokulation der Bakterien wurde das ungebundene Fibronectin durch Spülvorgänge entfernt.

Zur Bildung von Mono-Spezies Biofilmen wurden die Bakterien einzeln oder zur Bildung von Di-Spezies Biofilmen in Kombination mit *S. mitis* oder *S. salivarius* inkubiert. Die Biofilmkulturen wurden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) 1 bis 5 Tage unter statischen Kulturbedingungen bebrütet. Die Atmosphäre des anaeroben Inkubators war mit Wasserdampf gesättigt, um ein Austrocknen der Kulturen zu vermeiden.

2.10 Optimierung der Kulturmedien für die Biofilmbildung

Für die Optimierung der Biofilmbildung wurde BHI mit Humanserum (4:1) oder künstlichem Speichel (1:3) mit und ohne Zugabe von 50 mM Galaktose getestet. Zusätzlich wurde die Eignung von BHI mit mucinfreiem künstlichem Speichel (1:3) und 50 mM Galaktose erprobt. Alternativ wurde ein chemisch definiertes Medium (CDM, modifiziert nach van de Rijn und Kessler, 1980) mit verschiedenen Zusätzen, wie Humanserum (4:1), 50 mM Glukose oder 50 mM Saccharose getestet.

2.11 Bestimmung der Biofilm-Masse und Biofilm-Lebendkeimzahlen

Für die Bestimmung der Biofilm-Masse sowie der Biofilm-Lebendkeimzahlen wurden unbeschichtete oder Fibronectin-beschichtete 24-Well Zellkultur-Platten oder 96-Well Mikrotiter-Platten verwendet. Nach der Inkubation der Biofilmkulturen wurde das Flüssigmedium entfernt und die Vertiefungen der Platten mit 1x PBS (pH 7,4) vorsichtig gewaschen.

Zur Bestimmung der Biofilmmasse mittels Safranin-Färbung wurden 96-Well Mikrotiter-Platten verwendet. Die Vertiefungen wurden nach dem Waschen mit 0,1 % Safranin O [w/v], für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt, anschließend mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und schließlich luftgetrocknet. Die Biofilm-Masse wurde durch Messung der Absorption bei 492 nm mit dem *Tecan Spectra Reader Classic* quantifiziert.

Zur Ermittlung der Lebendkeimzahlen im Biofilm wurde der Biofilm von den besiedelten Oberflächen abgekratzt und in PBS aufgenommen. Anschließend wurden Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension erstellt. Nach 48 bzw. 72-96 h wurden die Kolonie-bildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) bestimmt.

2.12 Dokumentation von Biofilmstrukturen

2.12.1 Fluoreszenzmikroskopie

Mono- oder Di-Spezies Biofilme wurden in unbeschichteten 24-Well Zellkultur-Platten anaerob angezogen. In jeder Vertiefung befand sich ein rundes, steriles, unbeschichtetes Plastik-Deckgläschen (Durchmesser 13 mm, Nunc, Wiesbaden, D). Nach 1, 2, 3 und 5-tägiger Inkubation wurde das

Flüssigmedium entfernt und die Biofilme vorsichtig mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Zur Visualisierung der Biofilme wurden diese mit einem Lebend/Tot-Farbstoff (*BacLight Live/Dead*), einem Gram-Farbstoff oder einer Kombination zur Lebend/Tot- und Gram-Färbung (*ViaGramTM Red+ stain*) angefärbt (siehe 2.5).

Für die Lebend/Tot-Färbung wurde die Farblösung (Syto9/Propidiumiodid 1:1) 1:1000 in PBS verdünnt und auf die Biofilme gegeben. Nach einer 10-15-minütigen Inkubation im Dunkeln konnte die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation erfolgen. Die Färbung mit dem *ViaGramTM Red+ stain* erfolgte in abgewandelter Form zu den Herstellerangaben. Die Biofilme wurden mit 0,9 % NaCl gewaschen und anschließend in 100 µl 0,9 % NaCl mit 5 µl Lösung C für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen der Farblösung durch vorsichtiges Spülen mit 0,9 % NaCl wurden die Biofilme mit einer Lösung aus 100 µl 0,9 % NaCl und 5 µl Lösung A/B (1:1 Gemisch aus DAPI und TEXAS Green, 1:10 in H₂O_{reinst} verdünnt) versetzt und für weitere 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Nach Abspülen der Färbelösung mit 0,9 % NaCl wurden die Biofilme mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen erfolgten mit dem Fluoreszenzmikroskop BX60 unter Verwendung der Filter U-MWB (Ex 470-490, Em 520 nm), U-MWU (Ex 330-385 nm, Em 420 nm) und U-MWG (Ex 510-550 nm, Em 590 nm) (Olympus, Hamburg, D).

Die Bildaufnahmen erfolgte durch eine angeschlossene Digitalkamera (Leica, Solms, D).

2.12.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ermöglicht den Nachweis von verschiedenen Spezies und deren Lokalisation innerhalb einer Probe. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode zum Nachweis von *P. gingivalis* und *S. salivarius* angewandt. Wie für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Kulturen in 24-Well Zellkultur-Platten mit je einem runden, sterilen, unbeschichteten Plastik-Deckgläschen (Durchmesser 13 mm, Nunc, Wiesbaden, D) pro Vertiefung inokuliert. Nach 1 und 3 Tagen anaerober Inkubation (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) wurde das Flüssigmedium entfernt und die Biofilme vorsichtig mit 1x PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Deckgläschen für ca. 60 Minuten bei 37 °C getrocknet und anschließend für 10 Minuten in 100 % Methanol fixiert. Nach Abtrocknen des Methanols wurden die *S. salivarius* Mono- und die *S. salivarius* / *P. gingivalis* Mischbiofilme für 10 Minuten mit einer Lysozylösung (1 mg/ml Lysozym und 2 µg/ml Lysostaphin in 10 mM Tris HCl) behandelt, anschließend für 3 Minuten in 100 % Ethanol inkubiert und wiederum getrocknet. Für die *P. gingivalis* Mono-Spezies Proben war diese Behandlung nicht erforderlich.

Auf die fixierten und getrockneten Proben der Mono-Spezies Kulturen wurden dann 100 µl Hybridisierungspuffer (0,9 M NaCl, 20 mM Tris HCl pH 8, 40 % Formaldehyd, 0,01 % SDS) mit 5 µl der *P. gingivalis* (5'-GGT TTT CAC CAT CAG TCA TCT ACA-3' Alex Fluor 488; Rudney, 2001) oder *S. salivarius* (5'- ACC GAC TCG CAA CTC G- 3' Atto 590; Sven Poppert, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg – nicht veröffentlicht) Sonde gegeben. Der

Hybridisierungspuffer für den *P. gingivalis* / *S. salivarius* Mischbiofilm enthielt beide Sonden á 5 µl. Die beiden Sonden unterschieden sich in der an die Sonde gekoppelten Fluoreszenz, was eine Unterscheidung beider Spezies ermöglichte.

Die Hybridisierung der Proben erfolgte im Dunkeln für 2 Stunden bei 46 °C. Anschließend wurden die Proben mit auf 48 °C vorgewärmtem Waschpuffer (0,046 M NaCl, 20 mM Tris HCl pH 8, 0,005 M EDTA, 0,01 % SDS) zügig gewaschen und für nochmals 15 Minuten bei 48 °C in 500 µl Waschpuffer inkubiert. Der Waschpuffer wurde nachfolgend entfernt, die Proben mit 1x PBS gewaschen und direkt im Anschluss mittels Fluoreszenzmikroskopie bzw. Konfokaler Laser Raster Mikroskopie analysiert.

2.13 Nachweis von Bakterien durch Antikörpermarkierung

Alternativ zur FISH wurden Antikörper für die Identifikation und Lokalisation ausgewählter Spezies in Mono- und Mischbiofilmen verwendet.

Für die Herstellung der Antikörper wurden die Bakterien in 10 ml BHI bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase angezogen, zentrifugiert (Heraeus Variofuge 3.0, 10 min, 4000 rpm, 4 °C) und die Bakteriensedimente mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde für jede Spezies eine 5 ml Suspension mit einer optischen Dichte (OD_{600}) auf etwa 10^8 Zellen/ml eingestellt.

Die erhaltenen Zellen wurden mit 2 % Formaldehyd versetzt und für mindestens 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bis zu fünf mal mit 1x PBS gewaschen und dann in mindestens 4 ml 1x PBS aufgenommen. Diese Suspension wurde auf 5×10^7 Zellen/ml verdünnt und zwecks Generierung polyklonaler Antiseren an die Firma Eurogentec (Köln, D) versandt. Es konnten erfolgreich Antikörper nach 28-tägiger Infektion von Hasen (*rabbit*) bzw. Meerschweinchen (*guinea pig*) gewonnen werden.

Für die Antikörpermarkierung wurden die Kulturen in 24-Well Zellkultur-Platten mit je einem runden, sterilen, unbeschichteten Plastik-Deckgläschen (Durchmesser 13 mm, Nunc, Wiesbaden, D) pro Vertiefung inokuliert. Nach 1 und 3 Tagen anaerober Inkubation (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) wurden das Flüssigmedium entfernt und die Biofilme vorsichtig mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Biofilme mit 3,7 % [v/v] Paraformaldehyd für mindestens 4 Stunden bei 4 °C fixiert, das Paraformaldehyd entfernt und die Probe vorsichtig mit 1x PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine 1-stündige Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in den Proben mit 1 % fetalem Kälberserum (FKS) und nach dreimaligem Waschen eine 2-stündige Inkubation mit dem ersten spezies-spezifischen Antikörper, der jeweils 1:100, 1:200 und 1:500 verdünnt eingesetzt wurde. Anschließend wurden die Proben erneut dreimal mit 1x PBS gewaschen, ehe der zweite Antikörper (*anti-guinea pig* oder *anti-rabbit*) markiert mit AlexaFluor 488 oder 647 für eine Stunde auf die Biofilme gegeben wurde. Nach erneutem Waschen erfolgte die Analyse der Antikörper-markierten Biofilme mit dem Fluoreszenzmikroskop.

2.13.1 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Wie für die Fluoreszenzmikroskopie wurde 1 ml der Mono- oder Di-Spezies Kulturen in unbeschichtete 24-Well Zellkultur-Platten mit je einem runden, sterilen, unbeschichteten Plastik-Deckgläschen (Durchmesser 13 mm, Nunc, Wiesbaden, D) pro Vertiefung inokuliert und für 1 bis 5 Tage unter anaeroben Bedingungen (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) inkubiert. Nach Entfernung des Flüssigmediums wurden die Biofilme vorsichtig gewaschen und anschließend für mindestens 24 h bei 4 °C in 2,5 % Glutardialdehyd-Lösung (9 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer [pH 7,4], 1 ml 25 % Glutardialdehyd-Lösung [Merck, Darmstadt, D]) fixiert.

Die weitere Behandlung der Proben erfolgte im Elektronenmikroskopischen Zentrum des Universitätsklinikums (EMZ, Uniklinik Rostock). Die Deckgläschen wurden zunächst 3 x mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe getrocknet (5 min 30 %, 5 min 50 %, 10 min 70 %, 15 min 90 %, 2 x 10 min 100 %). Nachfolgend wurden die Deckgläschen einer „Kritischen-Punkt-Trocknung“ (Kritischer-Punkt-Trockner, Emitech, Ashford, UK) nach Herstellerangaben unterworfen. Die getrockneten Proben wurden mit 10 nm Gold überschichtet und mit dem Elektronenmikroskop Zeiss DSM 960A analysiert.

2.13.2 Konfokale Laser Raster Mikroskopie

Für die Untersuchungen der Biofilme mittels Konfokaler Laser Raster Mikroskopie (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) wurden die Bakterien in unbeschichteten Kammersystemen mit nicht fluoreszierendem Glasboden (*LabTec Chambers*, Nunc, Wiesbaden, D) bis zu drei Tage unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die gebildeten Biofilme vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und mit Lebend/Tot-Farbstoff (siehe 2.5) gefärbt. Für die Lebend/Tot-Färbung wurde die Farblösung (Syto9/Propidiumiodid 1:1) 1:1000 in 1x PBS verdünnt und auf die Biofilme gegeben. Nach einer 10-15-minütigen Inkubation im Dunkeln konnte die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation erfolgen. Die Präparate wurden mit einem Konfokalen Laser Raster Mikroskop (Leica Mikrosystems, Wetzlar, D), das an ein *Leica TCS SP2 AOBs laser scanning confocal imaging system* angeschlossen war, mit einem Argon-Laser bei 488-nm und einem Helium/Neon Laser bei 594-nm Anregung analysiert. 3D Bilder wurden unter Verwendung der *Imaris x64 Software* (Bitplane, Zürich, CH) erstellt.

2.13.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Beobachtung der Oberflächenstruktur ausgewählter Bakterienspezies wurde die hochauflösende Bildgebung der Transmissionselektronenmikroskopie verwendet.

Dazu wurden Bakteriensedimente von *F. nucleatum* ATCC 25586 oder ATCC 23726 nach anaerober Kultivierung in künstlichem Speichel ohne Mucin mit Galaktose (SG-) und nach Zusatz von Pronase

(SG-Pro) verwendet. Die Bakterien wurden in sterilen Zellkultur-Platten (Volumen 25 ml) anaerob kultiviert und nach 24 Stunden abgenommen (Biofilmmzellen bzw. Gesamtzellen). Die Proben wurden zunächst in der Heraeus Variofuge 3.0 sedimentiert (4000 rpm, 10 min, 4 °C), anschließend mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und schließlich in 2,5 % Glutardialdehyd-Lösung (9 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer [pH 7,4], 1 ml 25 % Glutardialdehyd-Lösung [Merck, Darmstadt, D]) für mindestens 48 h bei 4 °C fixiert. Die weitere Probenaufbereitung erfolgte im Anschluss durch die Mitarbeiterin Frau Schulz im Elektronenmikroskopischen Zentrum (EMZ, Uniklinik Rostock) wie folgt:

Die Proben wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mehrfach mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und anschließend mit 1 % gepuffertem Osmiumtetroxid (OsO₄) nachfixiert. Nach wiederholtem Waschen der Proben (5 x 1-3 min) wurden die Proben in einer aufsteigenden Acetonreihe getrocknet (2 min 30 %, 2 min 50 %, 30 min 75 %, 45 min 90 %, 2 x 30 min 90 %). Im Anschluss wurde ein Aceton/Aralditgemisch 1:1 (Aralditgemisch: 5 ml Araldit M, 5 ml Araldit Härter, 1,5 % Araldit Accelerator) zugegeben und die Probe über Nacht offen inkubiert. Als nächstes erfolgte die Zugabe von reinem Aralditgemisch für 2 Stunden ehe die Ausbettung und nachfolgende Polymerisation bei 58-60 °C über 2 Tage fortgesetzt wurde. Für die Anfertigung von Ultradünnschnitten wurde das *Leica Microtom Ultracut S* (Leica, Solms, D) verwendet. Nach Aufbringen der Bakterienschnitte auf Kupfernetzblenden und anschließender Kontrastierung mit Bleiacetat und Uranylacetat erfolgte die Dokumentation der Bakterienschnitte mit dem Transmissionselektronenmikroskop *Libra 120*.

2.14 Untersuchungen zur Biofilmentwicklung

Mono- oder Di-Spezies Biofilmkulturen wurden in 24-Well Zellkultur-Platten oder 96-Well Mikrotiter-Platten inokuliert und anschließend anaerob (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) inkubiert. Die Bestimmung der Biofilm-Masse (siehe 2.11) und des pH-Wertes erfolgte in einem Zeitrahmen von 24 Stunden zunächst stündlich, ab Stunde 13 der Inkubation dann alle 2 Stunden. Die Biofilmstruktur sowie die metabolische Aktivität der Bakterien nach Lebend/Tot-Färbung wurde nach 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden dokumentiert.

2.15 Transwell Biofilm Experimente

Für Untersuchungen mit dem Transwell-System wurden 24- oder 96- Transwell Polycarbonat Zellkultur Platten (Corning, Corning NY, USA) verwendet (siehe Abbildung 2). In die Vertiefungen der 24-Transwell Zellkultur-Platten wurden zudem je ein rundes, steriles, unbeschichtetes Deckgläschen gelegt. In das untere Kompartiment der 24- Transwell-Zellkultur-Platten wurden 600 µl (10⁷ KBE/ml) der ersten Bakterienspezies, in das obere Kompartiment 200 µl (10⁷ KBE/ml) der zweiten Bakterienspezies inokuliert. Für die 96-Transwell Polycarbonat Zellkultur-Platten wurden 200 µl (10⁷ KBE/ml) der ersten Bakterienspezies in das untere und 50 µl (10⁷ KBE/ml) der zweiten

Bakterienspezies in das obere Kompartiment inokuliert. Die Spezies wurden jeweils durch ein Transwell-Insert mit einer Membran von 0,4 µm Porengröße voneinander getrennt.

Die Kulturen wurden unter anaeroben Bedingungen und 37 °C für 1 bis 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Transwell-Inserts sowie das Flüssigmedium entfernt, die Vertiefungen des unteren Kompartiments vorsichtig mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und die Biofilme im unteren Kompartiment hinsichtlich Masse und Lebendkeimzahl (siehe 2.11) sowie Struktur und metabolischer Aktivität nach Lebend/Tot-Färbung (siehe 2.12.1) untersucht.

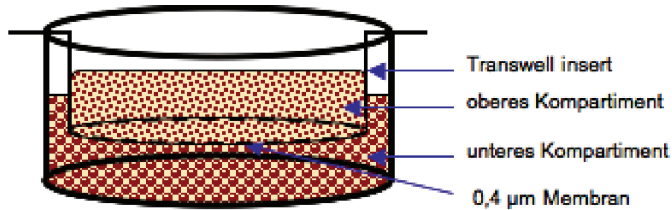


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Transwell-Systems.

2.16 Sukzessive Animpfstrategie

Um die Bedeutung unterschiedlicher Kolonisierungszeitpunkte auf das Wachstum bzw. das Überleben von Bakterienspezies in einer Mischkultur mit direkten Zell-Zell Interaktionen zu untersuchen, wurden ausgewählte Stämme einer sukzessiven Animpfstrategie unterzogen. Dazu wurden zunächst Bakteriensuspensionen (10^7 KBE/ml) von *S. mitis* oder *S. salivarius* in entsprechendem Medium in 24-Well Zellkultur- oder 96-Well Mikrotiter-Platten inokuliert. Die 24-Well-Zellkultur-Platten enthielten dabei je ein rundes Deckgläschen pro Vertiefung. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden unter anaeroben Bedingungen wurde das Flüssigmedium aus den Vertiefungen entfernt. Anschließend wurde eine der anderen Bakterienspezies, ausgenommen *S. mitis* und *S. salivarius* selbst, mit 10^7 KBE/ml in frischem Wachstumsmedium in die Vertiefungen gegeben. Die Platten wurden erneut unter anaeroben Bedingungen inkubiert und nach 1 bis 3 Tagen hinsichtlich Biofilm-Masse, Lebendkeimzahlen und Struktur analysiert. Der Versuch wurde auch in umgekehrter Kultivierungsreihenfolge durchgeführt. In der nachfolgenden Abbildung 3 ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

Für Untersuchungen an ausgewählten Spezies-Kombinationen erfolgte die Zugabe der zweiten Bakterienart zusätzlich bereits nach 2 und 4 Stunden, wobei unter solchen Bedingungen nur die Biofilm-Masse bestimmt wurde.

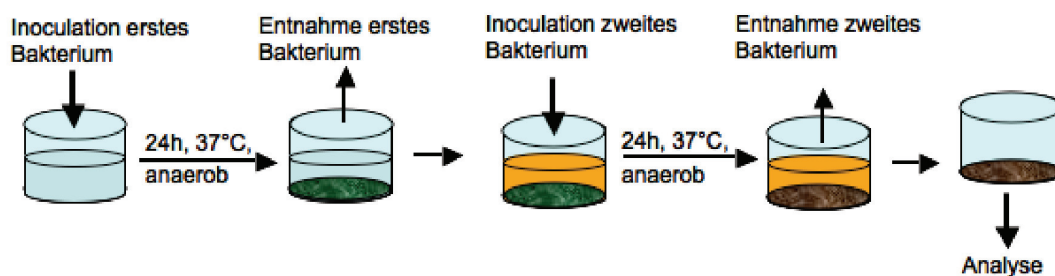


Abbildung 3: Schematische Darstellung der sukzessiven Animpfstrategie.

2.17 Biotensid-Analyse (in Anlehnung an van Hoogmoed *et al.*, 2000)

Um Einflüsse von *S. mitis*-sezernierten Faktoren auf die Oberflächen anderer Bakterienspezies zu untersuchen, wurde ein Biotensid-Assay nach van Hoogmoed und Kollegen durchgeführt (van Hoogmoed *et al.*, 2000).

Eine 10 ml Kultur von *S. mitis* in CDM/Saccharose wurde zunächst über Nacht anaerob bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde dann in 1400 ml CDM/Saccharose überführt und erneut anaerob bebrütet. Nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen sedimentiert (4000 rpm, 4 °C, 10 min, Heraeus Variofuge 3.0). Die sedimentierten Zellen wurden mit Adhäsionspuffer (2 mM Kaliumphosphat, 50 mM Kaliumchlorid, 1 mM Calciumchlorid, pH 6,8) gewaschen und in 200 ml Wasser (H₂O_{reinst}) suspendiert. Die Suspension wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt und schließlich bei 10 000 x g (Sorvall RC5C, 4 °C, 30 min) zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde erneut zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert. Das erhaltene Filtrat mit dem Biotensid wurde anschließend gefriergetrocknet.

Das entstandene Lyophilisat wurde abgewogen und mit Adhäsionspuffer auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt (= Biotensid). Zur Beschichtung von 96-Well Mikrotiter-Platten wurden 200 µl des Biotensides eingesetzt und die Platten über 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension entfernt, die Vertiefungen vorsichtig mit Adhäsionspuffer gewaschen und 200 µl einer *S. mutans* DSM20523, *S. mutans* UA159, *S. sanguinis* DSM 20567 oder *S. sanguinis* SK 36 Suspension (10⁷ KBE/ml) in die 96-Well Mikrotiter-Platten inokuliert. Die Platten wurden dann für einen und drei Tage bei 37 °C anaerob inkubiert. Der Einfluss des Biotensides auf die Biofilmbildung der Spezies wurde mittels Safranin-Färbung (siehe 2.11) bestimmt.

2.18 Bakteriozin-Test

Der Bakteriozin-Test wurde, basierend auf einer modifizierten „*different antagonism cross streak technique*“, auf Columbia-Blut-Agar-Platten durchgeführt (Abbott und Shanon, 1958). Ein Bakterium das hinsichtlich der Bakteriozin-Produktion gegenüber einem anderen Bakterium getestet wurde, wurde auf Columbia-Blut-Agar in einer dünnen Linie in der Mitte der Platte ausgestrichen und für mindestens 18 h anaerob bei 37 °C (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) inkubiert. Anschließend wurde das Bakterium durch Chloroformdämpfe in einer geschlossenen Box innerhalb von 3 Minuten abgetötet.

Die Platten wurden an die Luft gebracht, so dass sich die Chloroformdämpfe verflüchtigen. Das zweite Bakterium wurde dann in einer ebenfalls dünnen Linie in überkreuzender Richtung über die erste Linie ausgestrichen und die Platte erneut für 18 h anaerob inkubiert. Eine Hemmung des Wachstums konnte dann gegebenenfalls an der Überschneidung der bakteriellen Ausstriche beobachtet werden.

2.19 Untersuchungen der Biofilmmatrix (nach Inoue *et al.*, 2003)

2.19.1 Analyse der Wirkung von Pronase, DNase und Natriummetaperiodat

Für die Analyse der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Biofilme wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt. Zum einen wurden die Biofilme wie unter 2.9 beschrieben in passendem Medium für 1 bis 3 Tage angezogen. Das Medium enthielt hierbei jedoch zusätzlich verschiedene Konzentrationen an Pronase (5; 50; 250; 500 µg/ml), DNase (1,8; 9; 18; 36; 90; 180 Units/ml), oder Natriummetaperiodat (0,1; 1; 10 mM). Mit diesem Ansatz wurde der Einfluss der Substanzen auf die Bildung von Biofilmen untersucht.

Zum anderen wurden reife Biofilme nach einer Vorinkubation über 24, 48 oder 72 h mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit Pronase (5; 50; 250; 500 µg/ml), DNase (1,8; 9; 18; 36; 90; 180 Units/ml) oder Natriummetaperiodat (0,1; 1; 10 mM) supplementiertem PBS für weitere 2 Stunden anaerob inkubiert. Mit diesem Ansatz wurde der Einfluss der Substanzen auf etablierte Biofilme untersucht. Als Kontrolle diente in beiden Versuchserien ein Ansatz mit 1x PBS ohne Zusätze.

An den entsprechenden Versuchstagen bzw. nach der 2-stündigen anaeroben Inkubation wurde die Biofilm-Masse mittels Safranin-Färbung (siehe 2.11) bestimmt. Um die Auswirkung der direkt zum Medium zugesetzten Substanzen auf das bakterielle Wachstum zu überprüfen, wurden zudem Wachstumsuntersuchungen durch stündliche Messung der optischen Dichte in separaten Kulturen bei 600 nm durchgeführt.

2.19.2 Bestimmung von Glykoproteinen

Mono- und Di-Spezies-Kulturen von *S. salivarius* und *P. gingivalis* W50 und W83 wurden in 24-Well Zellkultur-Platten angezogen. Nach 24 Stunden anaerober Inkubation wurden adhärenente Zellen bzw. entstandene Biofilme vorsichtig von der Oberfläche abgeschabt und im Inkubationsmedium aufgenommen. Nach gründlichem Mischen der Proben auf dem Laborschüttler wurden diese zentrifugiert (Eppendorf Kühlzentrifuge Typ 5417R, 8000 rpm, 3 min, 4 °C) und der Überstand zur Messung von Glykoproteinen eingesetzt. Hierzu wurde das *Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit* (Pierce, Rockland, USA) verwendet und die Messung nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.20 Adhärenz und Internalisierung der Bakterien an bzw. in eukaryote Zellen (nach Molinari *et al.*, 1997)

Untersuchungen zur Adhärenz an und Internalisierung in eukaryotische Zellen wurden mit *S. salivarius*, *P. gingivalis* sowie einer Mischkultur von *P. gingivalis* und *S. salivarius* durchgeführt. Für diese Studie wurde die menschliche Kehlkopf-Epithel-Zelllinie HEP-2 (ATCC CCL-23) verwendet. Die eukaryoten Zellen wurden als konfluenter Zellrasen in 24-Well Zellkultur-Platten durch die technischen Assistenten des Labors zur Verfügung gestellt.

2.20.1 Quantifizierung mittels Lebendkeimzählung

Die Bakterienkulturen wurden nach Anzucht im passenden Medium zentrifugiert, mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend in frischem DMEM-Medium (Gibco-Invitrogen, Darmstadt, D) mit 10 % FKS resuspendiert. Nach Einstellung der optischen Dichte der Bakterien in DMEM/FKS auf etwa 1×10^8 KBE/ml wurde die Bakteriensuspension zu den HEP-2 Zellen gegeben, die in 24-Well Zellkultur-Platten über Nacht zu einem konfluenten Zellrasen (konfluente *monolayer*) gewachsen waren. Die Platten wurden für 2 Stunden anaerob inkubiert und die Vertiefungen nachfolgend mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden pro Vertiefung 200 µl 0,05 % Trypsin/EDTA (Gibco-Invitrogen, Darmstadt, D) zugeführt und für 10 Minuten inkubiert.

Die Flüssigkeit mit den abgelösten HEP-2 Zellen wurde mittels Pasteur-Pipette aus der Vertiefung aufgenommen, nach Überführen in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen zentrifugiert (Kühlzentrifuge Typ 5417R, 5 min, 8000 rpm, 4 °C) und das Sediment zur Zellyse in Wasser (H_2O_{reinst}) aufgenommen. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation wurde die Suspension gut gemischt und mittels Lebendkeimzahlbestimmung die Summe der an die HEP-2 Zellen adhären und in diese internalisierten Bakterien bestimmt.

Um selektiv die internalisierten Bakterien zu untersuchen, wurde nach der 2-stündigen Inkubation der Zellen mit den Bakterien das DMEM-Medium mittels Pasteur-Pipette vorsichtig abgehoben und frisches, mit 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 1 % Gentamycin versetztes DMEM-Medium zugesetzt. Die Kulturen wurden für weitere 2 Stunden anaerob inkubiert, wobei nun selektiv durch die rein extrazellulär wirkenden Antibiotika adhären Bakterien abgetötet wurden.

Die Quantifizierung internalisierter Bakterien erfolgte in der gleichen Weise wie zuvor für die der adhären plus internalisierten Bakterien.

Zusätzlich zur zweistündigen Ko-Inkubation wurde der Versuch auch mit einer Ko-Inkubation über 24 Stunden durchgeführt.

2.20.2 Visualisierung mittels mikroskopischer Techniken

Ein konfluenter HEp-2 Zellrasen in 24-Well Zellkultur-Platten wurde mit 10^7 KBE/ml von *P. gingivalis* W50 in DMEM/10 % FKS beimpft. Die Ko-Inkubation wurde 24 Stunden anaerob bei 37 °C durchgeführt. Anschließend erfolgte eine rasterelektronen- sowie fluoreszenzmikroskopische Analyse hinsichtlich der Zellstruktur und Adhärenz von *P. gingivalis* W50. Für letzteres wurden die Proben mit DAPI (Verdünnung 1: 20 000) und dem Lebend/Tot-Farbstoff (*BacLight Live/Dead*) angefärbt. Des Weiteren wurden auf diese Weise auch *F. nucleatum* ATCC 25586, *F. nucleatum* ATCC 23726, *S. salivarius* K12 sowie Kombinationen von *P. gingivalis* W50 mit *F. nucleatum* ATCC 25586, *F. nucleatum* ATCC 23726 und *S. salivarius* K12 untersucht.

2.21 Molekulargenetische Arbeiten

2.21.1 PCR (Polymerasekettenreaktion)

In dieser Arbeit wurde die PCR zur Überprüfung einer *P. gingivalis* W50 $\Delta luxS$ Mutante, sowie zum Nachweis eventueller DNA-Verunreinigungen in RNA-Präparationen und für die DNA-Sequenzierung (siehe 2.21.2) genutzt.

Für die Analyse der $\Delta luxS$ Mutante dienten folgende *luxS*-Primer:

Primer 1: 5'-CGA ACT GCA TAC GAT CGA GC- 3'

Primer 2: 5'-GTC ATT GCA GAA GAC ATG AGG- 3'

Primer 3: 5'-AAG GAC AGG ATC GTT TTC TGG- 3'

Alle drei Primer wurden gleichzeitig in den Reaktionsansatz gegeben. Mit den Primern 1 und 3 bzw. 2 und 3 sollten für den Wildtyp 414 bp bzw. 356 bp umfassende genomische Fragmente und mit den Primern 1 und 3 bei der *luxS*-Mutante ein rekombinantes Fragment mit einer ungefähren Größe von 2100 bp amplifiziert werden.

Um RNA-Proben auf DNA-Verunreinigungen zu überprüfen, wurden universelle 16S rDNA Primer (Eurogentec, Liege, B) mit folgenden Sequenzen verwendet:

16S rDNA-Primer *forward*: 5'-ACG-GGC-GGT-GTG-TGT-RC-3'

16S rDNA-Primer *reverse*: 5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3'

Der Gesamtansatz der durchgeführten PCR betrug 25 μ l und bestand aus nachfolgenden Komponenten:

10x Reaktionspuffer (Qiagen, Hilden, D)

10 - 100 ng dsDNA-template

je 10 pmol Primer F / R

10 μ M dNTPs (Roche, Mannheim, D)

1,5 U Taq-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden, D)

Die Reaktion zur Überprüfung der $\Delta luxS$ Mutante wurde in einem Trio-ThermoblockTM (Biometra GmbH, Göttingen, D) nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt 1:	5 min 95 °C		
Schritt 2:	45 s 95 °C	Denaturierung	
Schritt 3:	45 s 55 °C	Annealing	
Schritt 4:	2 min 15 s 72 °C	Extension	
Schritt 5:	5 min 72 °C		
Schritt 6:	4 °C (Pause)		

Die Reaktion zur Überprüfung auf DNA-Verunreinigung erfolgte ebenfalls in einem Trio-ThermoblockTM nach folgendem Schema:

Schritt 1:	5 min 95 °C		
Schritt 2:	30 s 95 °C	Denaturierung	
Schritt 3:	30 s 50 °C	Annealing	
Schritt 4:	1 min 30 s 72 °C	Extension	
Schritt 5:	5 min 72 °C		
Schritt 6:	4 °C (Pause)		

2.21.2 DNA-Sequenzierung

Zur Qualitätssicherung der verwendeten Stämme wurden die in den Funktionstests eingesetzten Kulturen sporadisch durch Sequenzierung der 16S rDNA auf ihre Reinheit und Identität geprüft.

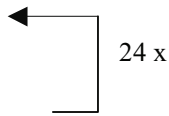
Die Sequenzierung erfolgte durch das Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) mit Hilfe eines automatisierten Laser-Fluoreszenz-Sequenzierers *ABI PrismTM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Weiterstadt, D). Als Sequenzierungs-Template diente ein nach einer 16S-PCR entstandenes PCR-Produkt aus der zu analysierenden Bakterienkultur. Das PCR-Produkt wurde mit dem PCR-Aufreinigungs-Kit (Machery und Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Für die Sequenzierungsreaktion wurde folgender Ansatz (15 µl) verwendet:

16S-PCR-Produkt (ca. 0.6 µg)	1-2 µl
16S <i>forward</i> (oder <i>reverse</i>) Primer (10 pmol)	1 µl
<i>Big Dye</i> (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)	3 µl
H ₂ O _{reinst}	9-10 µl

Die Reaktion wurde im Trio-ThermoblockTM nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt 1:	1 min 96 °C
------------	-------------

Schritt 2:	20 s	94 °C	
Schritt 3:	30 s	52 °C	
Schritt 4:	4 min	60 °C	
Schritt 5:	4 °C (Pause)		

Die DNA wurde anschließend mit dem *Dye Ex Spin Kit* (Qiagen, Hilden, D) nach Herstellerangaben aufgereinigt und das entstandene Eluat mit Hilfe des *SpeedVac Concentrator* getrocknet. Zur Denaturierung der Probe wurden 15 µl HiDi™-Formamid (*highly deionized formamide*, Applied Biosystems, Weiterstadt, D) zu dem getrockneten Sediment pipettiert, die Probe suspendiert und für 2 min bei 97 °C inkubiert. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben im Institut für Immunologie durch Kapillarelektrophorese (*ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer*, Applied Biosystems, Weiterstadt, D) sequenziert und die Sequenzen zu auswertbaren Datensätzen zusammengefasst (*ABI Prism™ 310 Collection and Sequencing analysis*, Applied Biosystems, Weiterstadt, D). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Computerprogramm *Chromas Lite* (<http://www.technelysium.com.au/>) und mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.21.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten bzw. mRNA-Spezies erfolgte in horizontalen-Flachbett-Gelelektrophorese-Apparaturen (BioRad Laboratories GmbH, München, D).

Für die Trennung der DNA-Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 1 % [w/v] in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) eingesetzt. Als Elektrophorese-Puffer diente 1x TAE-Puffer. Dafür wurde die Agarose bei 100 °C in TAE-Puffer gelöst und das Gel nach Abkühlen der Lösung auf 50-60 °C luftblasenfrei gegossen. Die DNA-Proben wurden 1:6 mit Probenauftragspuffer (0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 0,25 % [v/v] Xylen Xyanol, 30 % [v/v] Glycerin) versetzt und in die Probentasche eingebracht. Es wurden 5 µl Probe eingesetzt. Als DNA-Größenstandard wurde eine *1 kb-DNA-Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot, D) verwendet, von der 3 µl eingesetzt wurden.

Für die Trennung von mRNA-Spezies wurden denaturierende Agarosegele verwendet (1 % [w/v] Agarose, 1x MOPS-Puffer, 1,8 % [v/v] Formaldehyd). Die Proben wurden wie folgt aufbereitet: zu 5 µl RNA wurde ein Gemisch aus 7,5 µl Formamid, 2,6 µl Formaldehyd (37 %) und 3 µl 5x MOPS-Puffer gegeben und die Proben anschließend für 15 min bei 55 °C denaturiert. Nach Abkühlung der Proben wurden diese mit 2 µl 2x RNA Ladepuffer (peqlab, Erlangen, D) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Der Elektrophorese-Puffer enthielt 1x MOPS-Puffer und 1,8 % Formaldehyd in DEPC-Wasser. Als RNA-Größenstandard diente eine *high range* RNA Leiter (0.2 – 6.0 kb, peqlab, Erlangen, D).

Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 V ohne Stromstärkenlimitierung (Power Pac 3000, BioRad Laboratories GmbH, München, D) bis zum gewünschten Umfang der Auftrennung. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1,5 µg/ml, Applichem, Darmstadt, D) 10 min inkubiert. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem Intas Gel Dokumentationssystem.

2.21.4 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration erfolgte mit dem Picodrop-Gerät (Biozyme, Oldendorf, D). Die Reinheit der DNA bzw. RNA wurde anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dieses sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.21.5 RNA-Präparation

Die Präparation bakterieller RNA aus Biofilmen erfolgte unter Verwendung des *Fast RNA® Pro Blue Kit* (MP Biomedicals, Solon, Ohio). Die Biofilme wurden durch Abschaben in PBS aufgenommen, zentrifugiert (Hereaus Variofuge 3.0, 4000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Sediment gewogen. Zur Extraktion der RNA aus den Bakterienzellen entsprechend der Herstellerempfehlungen wurden 100 mg Zellmaterial verwendet.

Zur Entfernung von möglichen DNA-Kontaminationen wurde im Anschluss an die RNA-Präparation ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde die Probe mit 5 µl RNase Inhibitor (*RNase-Block*, Agilent, S. Clara, USA), 5 µl DNase (Biozym, Oldendorf, D) und 10 µl DNase Puffer (50 % [v/v] Glycerol [Merck, Darmstadt, D], 10 mM Tris-HCl [pH 7,5], 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂) versetzt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der enzymatischen Komponenten wurde die Probe für 5 Minuten auf 72 °C erhitzt.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem Picodrop-Gerät (siehe 2.21.4). Außerdem wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.21.3) und eine Kontroll-PCR (siehe 2.21.1) durchgeführt.

2.22 Transkriptomanalysen

2.22.1 cDNA-Synthese und cy3-Markierung

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem *Superscript II cDNA-Synthese-Kit* von Invitrogen entsprechend den Herstellerempfehlungen (*Superscript Double stranded cDNA synthesis Kit*, Invitrogen, Darmstadt, D). Es wurden 10 µg RNA verwendet und die erzeugte cDNA in 20 µl H₂O_{reinst} aufgenommen.

Vor dem Beginn der Cy3-Markierung der cDNA wurde deren Konzentration am Picodrop-Gerät (2.21.4) bestimmt und auf 1 µg in maximal 40 µl mit H₂O_{reinst} eingestellt. Alle nachfolgenden Arbeiten

erfolgten entsprechend den Herstellerempfehlungen (*Nimble Chip Arrays User's Guide: Gene Expression Analysis v 2.0*).

Die Konzentration der markierten cDNA wurde dann mit dem Picodrop-Gerät bestimmt und auf 3 µg in maximal 5 µl Probenvolumen eingestellt. Bei zu geringer Konzentration der Probe wurde diese im *SpeedVac Concentrator* getrocknet und dann in entsprechend geringerem Volumen resuspendiert.

2.22.2 Chip-Hybridisierung

Die verwendeten Microarrays wurden von der Firma NimbleGen auf der Basis der Sequenzen von 5 verschiedenen Genomen (*F. nucleatum* ATCC 25586, *P. gingivalis* W83, *S. sanguinis* SK36, *S. mutans* UA159, *A. actinomycetemcoitans* HK1651) entworfen und hergestellt.

Pro Gen jeder einzelnen Spezies befanden sich auf dem Microarray 12-13 60-mere Oligonukleotide, die im Sequenzvergleich einmalige Abschnitte eines jeden Gens möglichst vollständig, ggf. auch mit Sequenzüberlappungen, repräsentierten. Jedes spezifische Oligonukleotid war an jeweils drei verschiedenen, zufällig gewählten Stellen auf dem Microarray aufgetragen, um zufällige lokale Fehlfunktionen bei den Hybridisierungsreaktionen zu erkennen und ggf. kompensieren zu können. Damit konnten technische Fehler und Hybridisierungsprobleme erkannt und z. B. durch Ausklammern einzelner Hybridisierungsergebnisse umgangen werden, ohne dass die Expression des Gens vollständig aus der Betrachtung herausfallen musste.

Die Hybridisierung und das anschließende Waschen der Microarrays erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll von NimbleGen (*Nimble Chip Arrays User's Guide: Gene Expression Analysis v 2.0*). Bis zum Einscannen der Microarrays wurden diese trocken und im Dunklen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.22.3 Einlesen und Auswertung der Microarrays

Die einer vollständigen Hybridisierungsreaktion unterworfenen Microarrays wurden mit dem von NimbleGen empfohlenen Microarray Scanner von Agilent mit einer Auflösung von 5 µm eingelesen. Die erhaltenen *.tif-Dateien wurden mit dem Programm *NimbleScanTM 2.3* von NimbleGen ausgelesen.

Bevor mit der Auswertung der Microarrays begonnen werden konnte, mussten zunächst technisch falsch positive Signale entfernt werden. Dies sind Signale, die unter anderem durch Staubpartikel hervorgerufen wurden. Sie zeichneten sich dadurch aus, dass sie auf den *.tif-Bildern deutlich als Partikel zu erkennen waren und über mehrere Spots hinweg sowie in den leeren Zwischenräumen ein Signal gaben. Ein Spot, der sich an solch einer Stelle befand, lieferte eine weitaus höhere Fluoreszenzintensität als die entsprechenden Replikate an anderen Stellen des Microarrays. Mit Hilfe von *MS Windows Excel* (Microsoft, Redmond, USA) wurden diese technisch falsch positiven Signale entfernt.

Anschließend erfolgte die Auswertung mit dem Programm *GeneSpring GX* (Version 10.0, Agilent Technologies, Waldbronn, D). Zunächst mussten biologisch falsch positive Signale entfernt werden. Diese treten auf, wenn es zu Kreuzreaktionen der markierten cDNA der zu untersuchenden Spezies mit den Sonden einer anderen Spezies des Chips kommt. Ein entsprechendes Signal solcher Sonden wurde dann als falsch positiv angesehen, wenn deren Fluoreszenzintensität um das mehr als 1,41-fache ($\sqrt{2}$ -fach) erhöht vorlag verglichen mit den Negativkontrollen (*random probes*) auf dem Array.

Im Anschluss konnte die eigentliche Betrachtung zur Veränderung der Genexpression einer Spezies A in Kombination mit einer zweiten Spezies B (Di-Spezies-Kultur, jeweils mit *S. mitis* bzw. *S. salivarius*) im Vergleich zur Genexpression in einer in Monokultur gehaltenen Spezies A erfolgen. Dafür wurden zunächst alle Signale der nach der Qualitätskontrolle akzeptierten Replikat eines Oligonukleotids und anschließend die gemittelten Signale der verschiedenen Oligonukleotide zu einem Gen gemittelt. Auf diese Weise gab es für jedes Gen nur einen gemittelten Signalwert.

Beim Vergleich der beiden Arrays wurde dann über die Signale der Oligonukleotide der Spezies A in Monokultur normalisiert, so dass andere Sonden der auf dem Chip befindlichen Genome anderer Bakterien keinen Einfluss auf die Bewertung haben konnten. Für die zusammenfassende Bewertung wurden die Gene betrachtet, die in der Di-Spezies-Kultur eine mindestens 3-fache Expressionsänderung im Vergleich zur Monokultur zeigten. Nach Zuordnung der Annotationen wurden die verändert regulierten Gene mit Hilfe von den frei zugänglichen Internetseiten COGs (NCBI) und KEGG hinsichtlich ihrer Stoffwechselfunktionen eingeordnet (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, (<http://www.genome.jp/kegg/>); COGs: Clusters of Orthologous Groups of proteins, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>))

2.23 Proteinbiochemische Methoden

2.23.1 Nicht-denaturierende Proteinpräparation aus Bakterienüberständen

Zur Bestimmung proteolytischer Aktivität von *P. gingivalis* in Mono-Spezies Kulturen im Vergleich zur Kombination mit *S. salivarius* müssen Proteine im nativen Zustand isoliert werden. Um auch geringe Mengen sezernierter Proteasen erfassen zu können, wurde ein Kulturvolumen von 100 ml gewählt.

Es wurden sowohl *P. gingivalis* W50 und W83, *S. salivarius* K12 und die Di-Spezies-Kombination *S. salivarius* K12 / *P. gingivalis* W50 bzw. W83 in künstlichem Speichel mit 50 mM Galaktose anaerob angezogen. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen bei 4000 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert (Heraerus Variofuge 3.0) und der Überstand anschließend sterilfiltriert.

Dem Filtrat wurden bei 4 °C unter ständigem Rühren innerhalb einer Stunde portionsweise 500 g/l Ammoniumsulfat zugeführt. Die Zugabe einer neuen Portion erfolgte erst, wenn die vorherige Portion gelöst war. Abschließend wurde diese Suspension noch für eine Stunde bei 4 °C gerührt. Die gefällten Proteine wurden dann für 30 Minuten bei 10 000 x g und 4 °C (Sorvall-Zentrifuge RC5C)

sedimentiert. Das Sediment wurde in 20 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst und zur Entfernung von Salzen folgender Dialyse (MWCO 3500 Da, *Membran-Cel® dialysis tubing*, Serva, Heidelberg, D) unterworfen:

1-malige Dialyse gegen 4 Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$

2-malige Dialyse gegen 2 Liter 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0

Das Filtrat nahm hierbei an Volumen zu und wurde mittels Ultrafiltration (2.23.2) auf ca. 800 μl einkonzentriert. Das erhaltene Konzentrat war gebrauchsfertig.

2.23.2 Konzentrierung und Reinigung von Proteinen durch Ultrafiltration

Um Proteine von Salzen und Peptiden zu befreien und gleichzeitig die Konzentration der Proteine zu erhöhen, wurde eine Ultrafiltration durchgeführt. Dafür wurden Ultrafiltrationsmembranen mit einer Ausschlussmasse von 10 kDa verwendet (*Amicon Centricon YM-10*, Millipore, Billerica, USA). Die auf die Membranträger aufgesetzten Proben wurden bei 3000 rpm und 4 °C so lange zentrifugiert (Heraeus Variofuge 3.0) bis ein Volumen von 800 μl erreicht war.

Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung der Proben nach Bradford (Bradford, 1976). Dafür wurde der *BioRad Protein Assay* (BioRad Laboratories GmbH, München) entsprechend der Herstellerempfehlungen verwendet.

Die Proben wurden dann in 100 μl Portionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für eine anschließende SDS-Gelelektrophorese wurden 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein, 5:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt, verwendet. Des Weiteren wurde die proteolytische Aktivität dieser Proben quantifiziert (2.23.4).

2.23.3 Präparation membranassoziierter Proteine (nach Standar *et al.*, 2008)

Für die Präparation wurden Zellen von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Wachstum in 100 ml mucinfreiem künstlichem Speichel/Galaktose (SG-) ohne bzw. mit Pronase (SG-/Pro) verwendet. Nach einer Zentrifugation (10 min, 4500 rpm, 4 °C) wurde das Zellsediment in 5 ml eiskaltem Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 75 mM NaCl, 5 mM Imidazol) resuspendiert und die Zellen anschließend durch 5 x 1 min pulsierenden Ultraschall (Ultraschall-Gerät UP200S, Sonotrode SR) aufgeschlossen.

Dem folgte eine Zentrifugation bei 20 000 x g, 4 °C, 10 min (Biofuge Fresco). Das aus dieser Zentrifugation erhaltene Sediment (Zelltrümmer, Zellwand-assoziierte Proteine und zytosolische Proteine) wurde in 5 ml eiskaltem Puffer resuspendiert und auf Eis aufbewahrt. Der erhaltene Überstand wurde für 1 Stunde bei 130 000 x g, 4 °C ultrazentrifugiert (Sorvall Ultra Pro80). Im dabei entstandenen Überstand waren die löslichen Proteine zu finden, während das Sediment die Membranen und Membran-assoziierten Proteine enthielt. Diese wurden je nach Masse des Sediments in 500-1000 μl eiskaltem Puffer vorsichtig resuspendiert.

Alle so erhaltenen Fraktionen wurde einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen und mit Hilfe des Puffers (20 mM Tris-HCl pH 8, 75 mM NaCl, 5 mM Imidazol) auf eine Konzentration von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt. Die Proben wurden aliquotiert, je ein Aliquot à 50 μl entnommen und 5:1 mit

SDS-Probenpuffer für eine anschließende SDS-PAGE versetzt, während der Rest der Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde.

2.23.4 Quantifizierung proteolytischer Aktivität

Zur Quantifizierung proteolytischer Aktivität von Proteinpräparationen wurden drei verschiedene Methoden angewendet.

Erstens erfolgte die Bestimmung mit dem *QuantiCleave™ Protease Assay Kit* (Pierce, Rockford, USA) nach Herstellerangaben.

Zweitens wurde die Spaltung von Azocasein bestimmt. Dazu wurden 100 µl Aliquots mit 500 µl Azocasein (5 g/l, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und 500 µl 0,05 M Natriumphosphat-Puffer pH 8 gut durchmischt und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch proteolytische Aktivität wurde das Azocasein fortschreitend zu löslichen, infolge der Indikatorgruppe (Azogruppe) gefärbten Peptiden abgebaut. Anschließend wurde zum Ansatz 1 ml 10 % Trichloressigsäure gegeben und nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Probe 10 Minuten bei 6000 x g zentrifugiert (Kühlzentrifuge Typ 5417R). Nicht umgesetztes Azocasein wurde durch Fällern mit Trichloressigsäure und Abzentrifugieren des Niederschlages abgetrennt. Die Extinktion des Überstandes wurde bei 366 nm gegen einen Leeransatz (ohne Proteinprobe) gemessen (Spektrophotometer). Die Farbintensität des Überstandes ist der proteolytischen Aktivität direkt proportional.

Drittens wurde als Methode der Wahl das Verfahren von Twinning durchgeführt (Twinning, 1984). Als Substrat wurde dabei Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Casein (FITC-Casein, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Die Proteolyse des Substrats konnte als Fluoreszenzzunahme im Überstand gemessen werden.

Für diesen Protease-Test wurden 20 µl Probenmaterial mit 20 µl FITC-Casein und 20 µl Reaktionspuffer (10 mM CaCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 7,4) gemischt und der Ansatz bis zu 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 120 µl 5 % Trichloressigsäure (TCA) wurde die Reaktion gestoppt und die Probe anschließend für eine Stunde auf Eis gehalten. Die dabei ausgefallenen Proteine wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 9200 rpm (Kühlzentrifuge Typ 5417R) sedimentiert. Die freigesetzte Menge an FITC-Peptiden wurde aus dem Überstand fluorometrisch ermittelt. Dazu wurden 30 µl des Überstandes mit 200 µl 500 mM Tris-HCl pH 8,5 vermischt und zur Fluoreszenzbestimmung in Mikrotiter-Platten gegeben. Die Messung der Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und Emissionswellenlänge von 525 nm durchgeführt (*Microplate Reader Tecan infinite® 200*).

Als Positivkontrolle proteolytischer Aktivität diente, neben den in den Kits enthaltenen Kontrollen, eine Pronaselösung mit einer Endkonzentration von 500 µg/ml.

2.23.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen wurden lineare diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele nach Lämmli verwendet (Lämmli, 1970). Die Polyacrylamid-Elektrophorese wurde mit Hilfe eines *Mini-Protean® 3 Elektro-phoresis-Systems* (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt. Die Größe der Trenngele betrug 8,4 x 5,5 x 0,075 cm. Es kamen Trenngele mit einer Acrylamid Konzentration von 15 % zum Einsatz, die mit einem ca. 1 cm langen Sammelgel (4,5 %) zur Auftrennung und Konzentration der Proteinproben überschichtet waren (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung der Gelgemische für 1-D SDS-PAGE (für 2 Gele)

Komponenten	Trenngel (15 %)	Sammelgel (4.5 %)
30 % Acrylamid, 0,8 % Bis-Acrylamid	6 ml	0,75 ml
H ₂ O _{reinst}	3 ml	3 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,3 % SDS	3 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % SDS	-	1,25 ml
10 % [w/v] APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Das Gelgemisch des Trenngels wurde luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit H₂O_{reinst} überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das H₂O_{reinst} wieder entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegeben und ein Kamm zur Formung von Geltaschen eingesetzt.

Nach der vollständigen Polymerisation des Gels wurden die Platten in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt, der Anoden- und Kathodenraum der Kammer mit Elektrodenpuffer (25 mM Tris [pH 8,8], 0,2 M Glycin, 0,1 % [w/v] SDS) gefüllt und der Kamm aus dem Sammelgel entfernt.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 5:1 mit SDS-Probenpuffer (8 ml 0,5 M Tris/HCl [pH 8,8], 10 ml Glycerin, 1,54 mg DTT, 2 g SDS, 12 mg Bromphenolblau, ad 50 ml H₂O_{reinst}) versetzt und 5 min bei 90 °C denaturiert. Nach der Abkühlung der Proben auf Eis erfolgte die Auftragung auf das Gel mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton, Bonaduz, CH).

Als Protein-Marker wurde der *Kaleidoskop prestained standards, Broad Range* (8,6 - 207 kDa) (BioRad Laboratories GmbH, München, D) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V ohne Stromstärkenlimitierung (*PowerPac 3000*, BioRad Laboratories GmbH, München, D) durchgeführt.

2.23.6 Färbung von Proteingelen

Um die bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung (0,2 % [w/v] *Coomassie Brilliant Blue R-250* [Merck], 20 % Methanol, 10 %

Essigsäure) leicht geschwenkt (*Rocking Platform*, Biometra GmbH, Göttingen, D). Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte durch Schwenken in Entfärbelösung (20 % Methanol, 10 % Essigsäure) bis zum Punkt, an dem sich Banden gegen einen weitestgehend klaren Hintergrund abzeichneten.

2.23.7 MALDI-TOF Massenspektrometrie (*Matrix-associated Laser-Desorptions-Ionisations – Time Of Flight mass spectrometry*)

Für die Identifikation unbekannter Proteine wurde das Verfahren der MALDI-TOF Massenspektrometrie angewandt, welches von Thomas Köller im Proteomzentrum der Universität Rostock durchgeführt wurde (Tanaka *et al.*, 1988; Bantscheff und Glocker, 2001). Dazu wurden die Banden mit den Coomassie-gefärbten zu identifizierenden Proteinen aus dem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten und das Gelstück mit Waschpuffer ($\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, Ammoniumhydrogencarbonat [10 mM, pH 8,0] steigender Anteil Acetonitril [20 %, 50 %, 100 %]) gleichzeitig gewaschen und entwässert.

Um das Protein proteolytisch zu spalten, wurde das Gelstück anschließend mit dem oben genannten Puffer und der Protease Trypsin (Promega, Madison, USA) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Peptide wurden anschließend im Proteomzentrum extrahiert und massenspektrometrisch analysiert (*Reflex III*, Bruker Daltonics, Bremen, D). Die so erzeugten Peptidspektren wurden unter Verwendung der Software *Biotools* (Bruker Daltonics, Bremen, D) mit der im Internet verfügbaren „*in silico*“ Peptiddatenbank (MASCOT-Datenbank, Matrix Science, London, UK, <http://www.matrixscience.com>) abgeglichen. Den Proteinbanden konnten kongruierende „*in silico*“ Massedaten aus der Datenbank mit einem „*Score*“ von mindestens 67 zugeordnet werden (Status „Identifiziert“ ab einem „*Score*“ von 48).

2.24 Reproduzierbarkeit und Statistiken

Untersuchungen zur Biofilm-Masse wurden mindestens dreimal an verschiedenen Versuchstagen wiederholt. Insofern es nicht anders angegeben ist, wurden die Transkriptomanalysen aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten gewonnen.

Statistische Parameter (Mittelwert, Standardabweichung, p-Werte) wurden unter Verwendung von MS Excel (Microsoft, Redmond, USA) und dem Mann-Whitney U Test (<http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html>) bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung von *in vitro* Modellen oraler Biofilme

3.1.1 Auswahl eines geeigneten Mediums für die Biofilmbildung

Für die Studien an *in vitro* erzeugten Biofilmen war es vorab nötig, ein geeignetes Medium für die Biofilmbildung aller zu untersuchenden Bakterienarten zu finden. Es wurden sechs Medien (BHI/Humanserum, CDM, CDM/Humanserum, künstlicher Speichel, CDM/Glukose, CDM/Saccharose) untersucht, die mehr oder minder die natürliche Situation der Mundhöhle widerspiegeln. Zunächst wurde die Bildung von Mono-Spezies Biofilmen mit Hilfe der Safranin-Färbung sowie der Fluoreszenzmikroskopie nach Lebend/Tot-Färbung analysiert (siehe 2.11).

Die Biofilmquantifizierung erfolgte in einem Zeitrahmen von fünf Tagen unter anaeroben Bedingungen. Für die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation wurden die Proben nach 1, 2 und 3 tägiger Inkubation analysiert. Zunächst wurden die Bakterien *S. mitis* ATCC 11843 (Abb. 4A), *S. mutans* DSM 20523 (Abb. 4B), *S. sanguinis* DSM 20567 (Abb. 4C), *S. salivarius* K12 (Abb. 4D), *S. intermedius* AC 3105 (Abb. 4E), *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 11123 (Abb. F), *F. nucleatum* ATCC 25586 (Abb. 4G), *P. micra* ATCC 33270 (Abb. 4H) und *P. gingivalis* ATCC 33277 (Abb. 4I) untersucht. In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Safranin- und fluoreszenzmikroskopischen Analyse, letzteres exemplarisch für Tag 1, dargestellt.

Abbildung 4A) *S. mitis* ATCC 11843

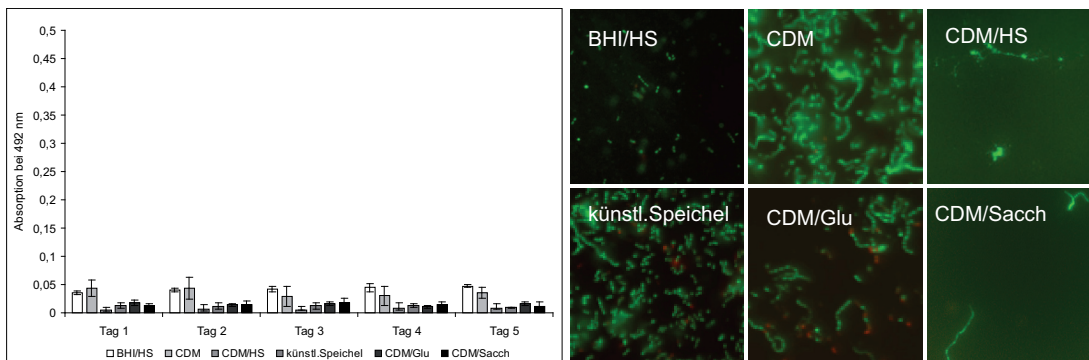


Abbildung 4B) *S. mutans* DSM 20523

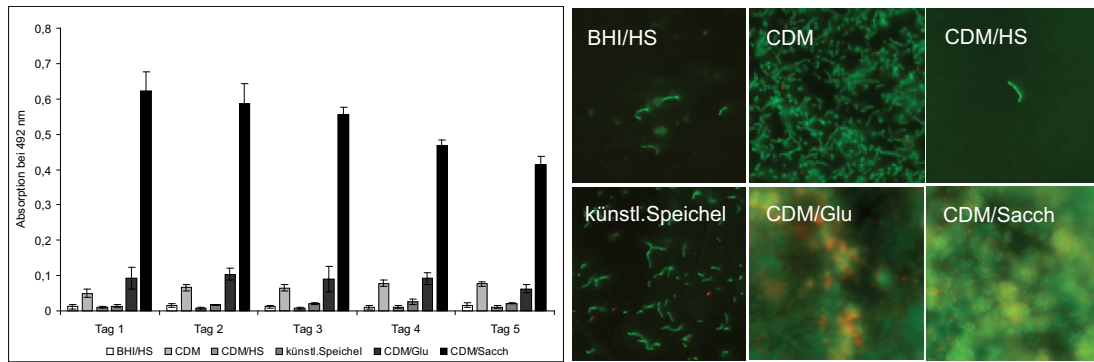


Abbildung 4C) *S. salivarius* K12

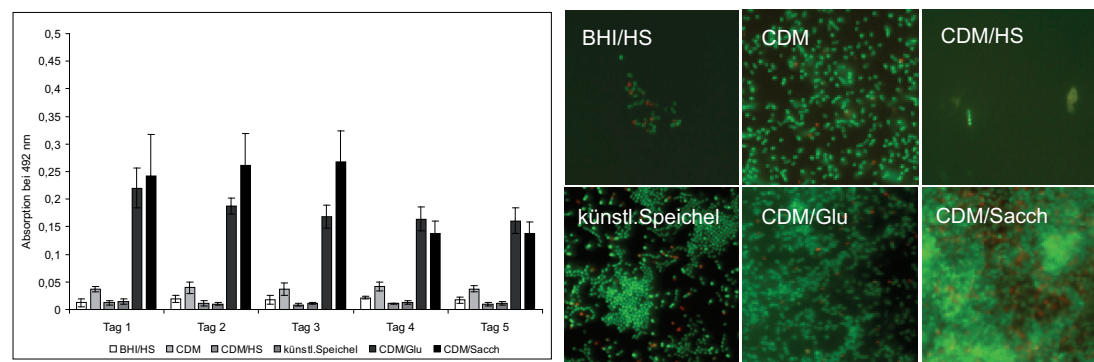


Abbildung 4D) *S. sanguinis* DSM 20567

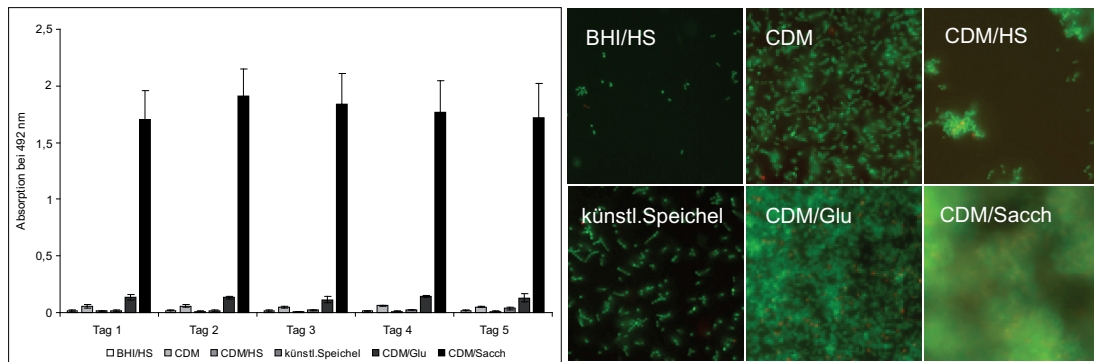


Abbildung 4E) *S. intermedius* AC 3105

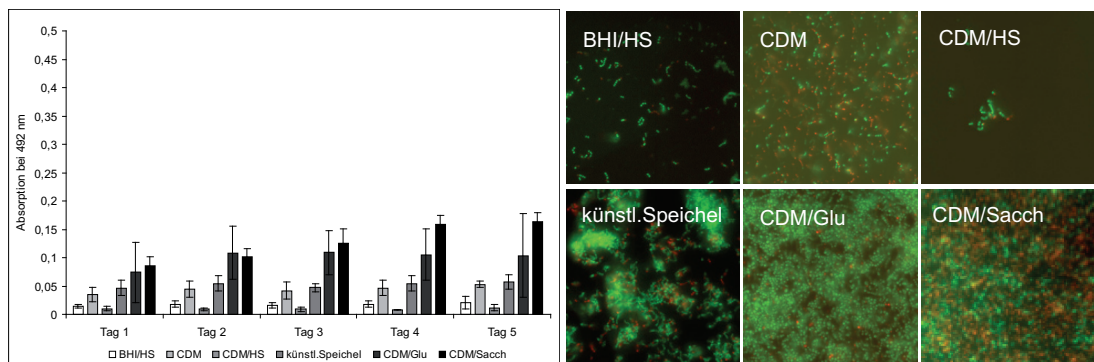


Abbildung 4F) *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 11123

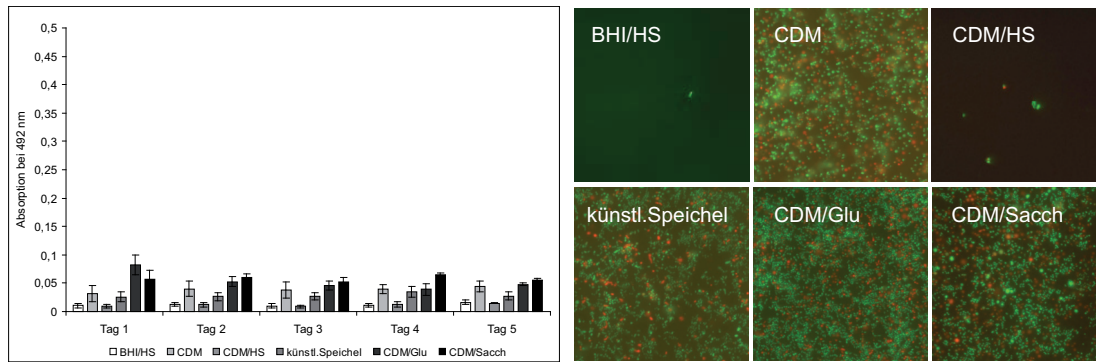


Abbildung 4G) *F. nucleatum* ATCC 25586

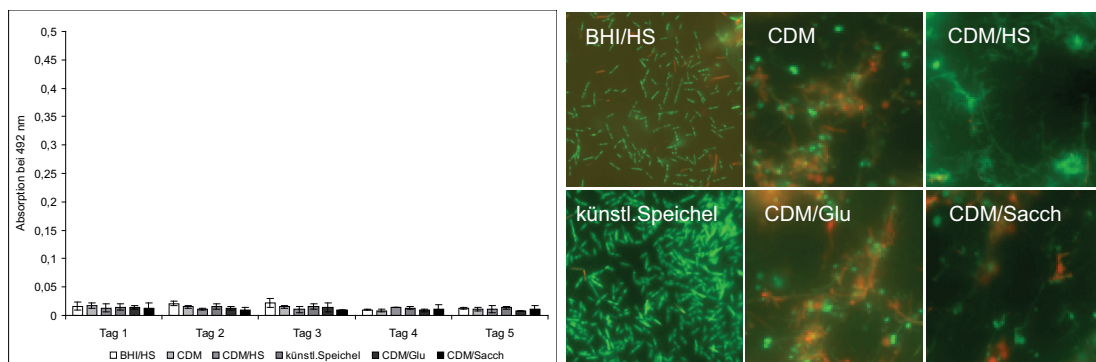


Abbildung 4H) *P. gingivalis* ATCC 33277

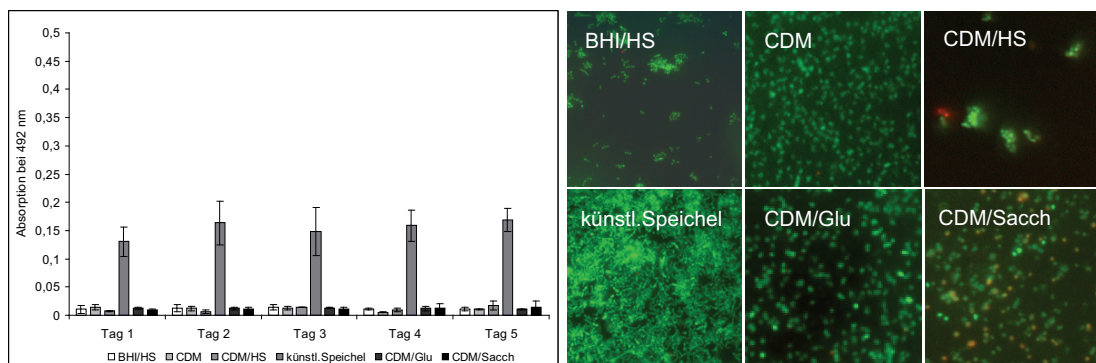


Abbildung 4I) *P. micra* ATCC 33270

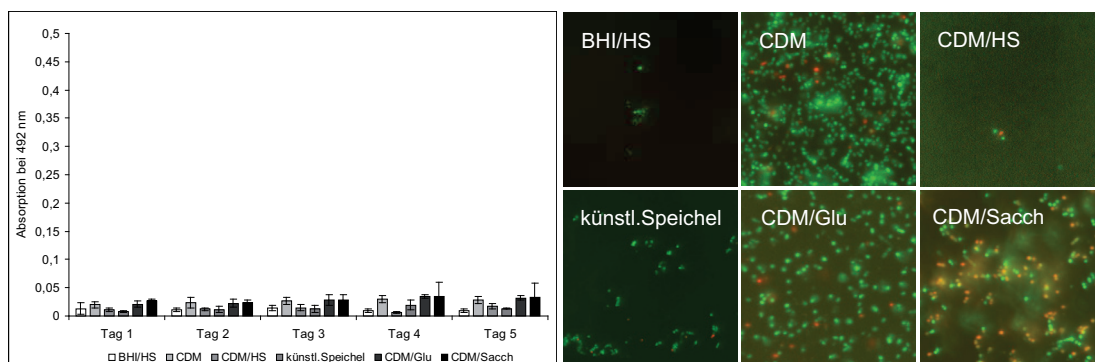


Abbildung 4 A-I: Biofilmbildung der Bakterien in verschiedenen Medien. Diagramme: Biofilm-Masse nach Safranin-Färbung. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen: nach Lebend/Tot-Färbung, exemplarisch für Tag 1, Vergrößerung 400x. BHI – Brain Heart Infusion Medium, HS - Humanserum, CDM – chemisch definiertes Medium, Glu – Glukose, Sacch – Saccharose.

Der Vergleich der mikroskopischen Bilder und der Absorption nach Safranin-Färbung ergab, dass ab einer OD_{492} von 0,05 von einer Biofilmbildung, d.h. einem mehrschichtigen Wachstum, auszugehen ist. OD_{492} -Werte von 0,01 bis zu 0,05 sprechen für die Bildung eines einschichtigen „Bakterien-Zellrasens“ (*monolayer*).

Die Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung der einzelnen Bakterien ergab, dass sowohl *S. mitis* als auch die obligat anaeroben Bakterien *F. nucleatum* und *P. micra* in keinem der getesteten Medien einen mehrschichtigen Biofilm bildeten (Abb 4A, 4G, 4I). Allerdings zeigte die mikroskopische Analyse von *F. nucleatum* in künstlichem Speichel eine starke Adhärenz in einer einschichtigen Lagerung.

Der getestete *P. gingivalis* Stamm ATCC 33277 war in der Lage, in künstlichem Speichel einen Biofilm zu bilden, was sowohl mittels Safranin-Färbung als auch Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert werden konnte (Abb. 4H). *A. actinomycetemcomitans* konnte einen schwachen Biofilm sowohl in CDM/Glukose als auch CDM/Saccharose bilden. Die mikroskopische Analyse zeigte, dass es sich hierbei um die Bildung eines einschichtigen Bakterien-Zellrasens (*monolayer*) handelte.

Hohe Biofilm-Massen der anderen untersuchten Spezies wurden vor allem in CDM/Saccharose, aber auch CDM/Glukose erreicht. Die Zugabe von Humanserum zu BHI oder CDM hatte dagegen in der Regel einen hemmenden Effekt auf die Adhärenz und Biofilmbildung der verschiedenen Spezies.

Da bis auf *P. gingivalis* für die obligat anaeroben Bakterien mit keinem der gewählten Medien eine Biofilmbildung detektiert werden konnte, wurden weitere Untersuchungen zur Medienoptimierung auf die anaerob wachsenden Spezies fokussiert. Für diese wurden die Effekte von künstlichem Speichel unter Zusatz von Glukose, Saccharose oder Galaktose (je 50 mM) auf die Adhärenz bzw. Biofilmbildung untersucht. Mikroskopische Analysen, nicht aber die Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung belegten, dass künstlicher Speichel mit 50 mM Galaktose zu einer verbesserten Adhärenz von *F. nucleatum* ATCC 25586 und *P. micra* ATCC 33270 führte. Die Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie (REM) nach Inkubation der Bakterien in künstlichem Speichel mit den verschiedenen Zuckerzusätzen.

Abbildung 5A)

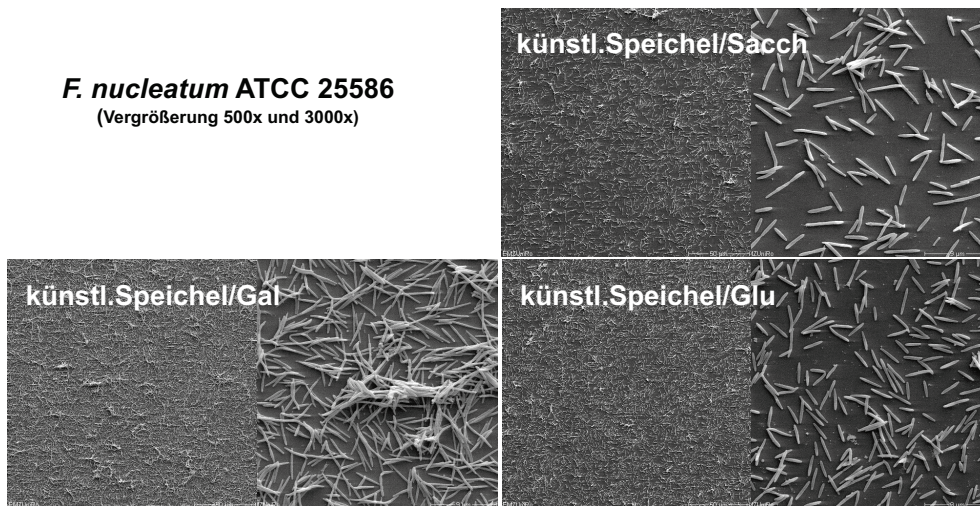


Abbildung 5B)

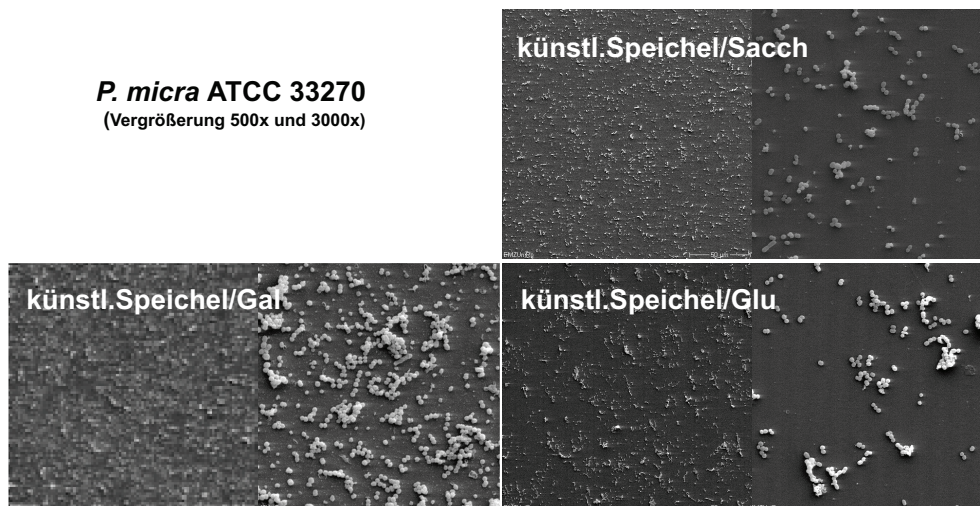


Abbildung 5C)

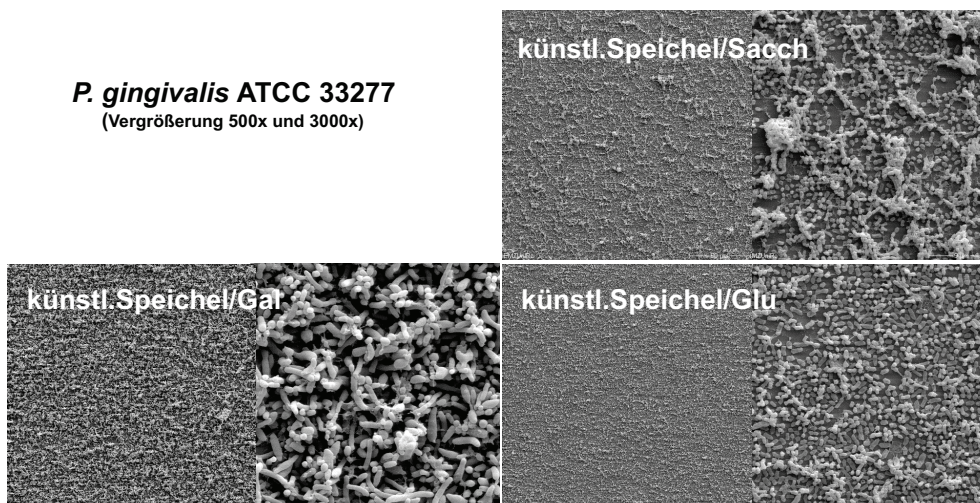


Abbildung 5: REM-Analysen der obligat anaeroben Bakterien in künstlichem Speichel mit verschiedenen Zuckerszusätzen. A) *F. nucleatum* ATCC 25586, B) *P. micra* ATCC 33270, C) *P. gingivalis* ATCC 33277. Vergrößerung 500x und 3000x. Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. Sacch – Saccharose, Gal – Galaktose, Glu – Glukose.

Da sich vor allem CDM/Saccharose (CS) bzw. künstlicher Speichel/Galaktose (SG) auf der Basis der Biofilm-Massebestimmungen und mikroskopischen Untersuchungen als geeignete Medien zur Adhärenz bzw. Biofilmbildung der verschiedenen Spezies erwiesen, wurden in diesen Medien Lebendkeimzahlbestimmungen der adhärenenten bzw. Biofilm-organisierten Bakterien durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Menge an kultivierbaren *A. actinomycetemcomitans*, *S. intermedius* und *S. mutans* über den Untersuchungszeitraum von 5 Tagen lediglich um ein bis drei Zehnerpotenzen abnahmen. Für *S. mitis*, *S. salivarius* und *S. sanguinis* konnte dagegen eine rasche Abnahme der Lebendkeimzahlen bis auf 0-Werte beobachtet werden. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Lebendkeimzählungen für die Kultivierung der fakultativ aeroben Spezies in CDM/Saccharose bzw. der obligat anaeroben Bakterien in künstlichem Speichel/Galaktose dargestellt.

Tabelle 4: Lebendkeimzahlen der adhärenenten, fakultativ aeroben Bakterien in CDM/Saccharose bzw. obligat anaeroben Bakterien in künstlichem Speichel/Galaktose. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Durch vorsichtiges Waschen am Ende der Inkubationszeit wurden die planktonischen Bakterien vor der Zählung aus dem Ansatz entfernt.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. mitis</i> ATCC 11843	1,83E+06	1,20E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. salivarius</i> K12	2,18E+07	3,01E+06	3,10E+04	9,10E+01	0,00E+00
<i>S. sanguinis</i> DSM 20567	1,44E+08	1,66E+06	6,18E+03	3,50E+01	0,00E+00
<i>S. mutans</i> DSM 20523	4,70E+07	6,82E+07	1,00E+07	5,94E+06	3,01E+06
<i>A. actinomycetemcomitans</i> DSMZ 11123	5,78E+07	7,19E+06	3,25E+05	9,75E+04	5,46E+04
<i>S. intermedius</i> AC 3105	5,88E+06	1,22E+06	4,72E+05	1,47E+05	3,51E+04
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	2,48E+07	4,63E+07	3,20E+07	3,81E+07	2,73E+07
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	7,64E+06	3,93E+06	5,61E+05	4,66E+04	1,42E+04
<i>P. micra</i> ATCC 33270	3,65E+06	4,34E+06	5,45E+06	2,68E+06	2,20E+06

Um zu prüfen, inwieweit die bisher erreichten Erkenntnisse tatsächlich für eine ganze Spezies oder nur für einzelne Stämme innerhalb der Spezies gelten, wurde zusätzlich zum *P. gingivalis* ATCC 33277 Stamm das Verhalten der *P. gingivalis* Stämme W50 und W83 in künstlichem Speichel/Galaktose analysiert. *P. gingivalis* W83 sollte für nachfolgende Transkriptomuntersuchungen genutzt werden, da nur hier das vollständige Genom zum Zeitpunkt der Studie vorlag. Von *P. gingivalis* W50 wurde eine *luxS*-Mutante von Prof. Curtis (*Blizard Institute of Cell and Molecular Science*, London) zur Verfügung gestellt, was das Studium dieses Bakteriums im Weiteren begründete. Beide Stämme wiesen nicht die Biofilmbildung des *P. gingivalis* ATCC 33277 Stamms auf (Abbildung 6).

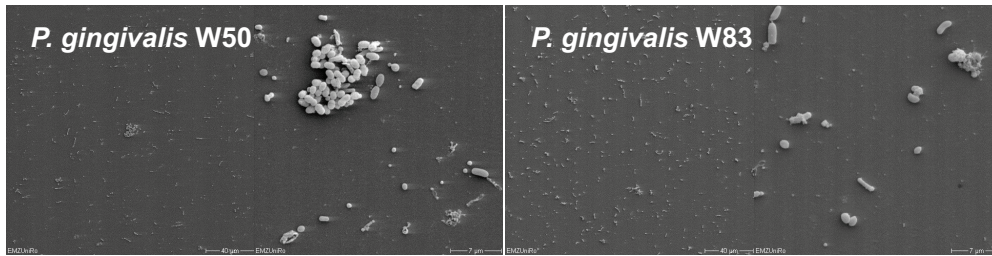


Abbildung 6: REM-Analysen von *P. gingivalis* W50 und W83. Vergrößerung 500x und 3000x. Aufnahmen exemplarisch für Tag 1 der Inkubation.

Die Bestimmung der Lebendkeimzahlen beider Spezies zeigte jedoch eine Kultivierbarkeit über den Untersuchungszeitraum von 5 Tagen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Lebendkeimzahlen von *P. gingivalis* W50 und W83 in künstlichem Speichel/Galaktose. Die Kultivierung der Keime erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Durch vorsichtiges Waschen am Ende der Inkubationszeit wurden die planktonischen Bakterien vor der Zählung aus dem Ansatz entfernt.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>P. gingivalis</i> W83	6,08E+06	9,22E+06	2,64E+07	1,21E+05	4,78E+04
<i>P. gingivalis</i> W50	1,60E+07	8,55E+06	3,27E+06	1,24E+04	5,28E+03

Um die Analysen mit denen der anderen obligat anaeroben Bakterien anzugleichen, wurden nachfolgende Studien mit diesen Bakterien ebenfalls in künstlichem Speichel/Galaktose durchgeführt. Die weitere Untersuchung von *P. gingivalis* ATCC 33277 entfiel, da für diesen weder eine *luxS*-Mutante erhalten werden konnte noch das vollständige Genom vorlag.

Wachstumskinetiken der fakultativ aeroben Spezies in CDM/Saccharose sowie der obligat anaeroben Spezies in künstlichem Speichel Galaktose zeigten, mit Ausnahme von *A. actinomycetemcomitans*, ein substantielles Wachstum aller Spezies (siehe Anhang, Abbildung 55). Für *A. actinomycetemcomitans* konnte keine Zunahme der optischen Dichte über den Untersuchungszeitraum detektiert werden. Bestimmungen der Lebendkeimzahlen ergaben jedoch konstante Anzahlen Kolonie-bildender Einheiten während der Wachstumsuntersuchungen.

3.1.2 Einfluss von Fibronektin auf die Adhärenz und Biofilmbildung

Um zu überprüfen, inwieweit die Oberflächenbeschaffenheit der verwendeten Zellkultur- bzw. Mikrotiterplatten eine Rolle für die Adhärenz bzw. Biofilmbildung der untersuchten Spezies spielt, wurden im nächsten Schritt Fibronektin-beschichtete Oberflächen verwendet.

Die Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung zeigte, dass *S. mitis* auch in diesem Medium nicht zur Biofilmbildung fähig war. Die Biofilmbildung von *S. salivarius* und *S. sanguinis*, und ab Tag 2 der Inkubation auch für *S. mutans*, fiel auf den beschichteten Oberflächen geringer aus.

A. actinomycetemcomitans und *S. intermedius* zeigten dagegen eine leicht verstärkte Biofilmbildung (Abbildung 7).

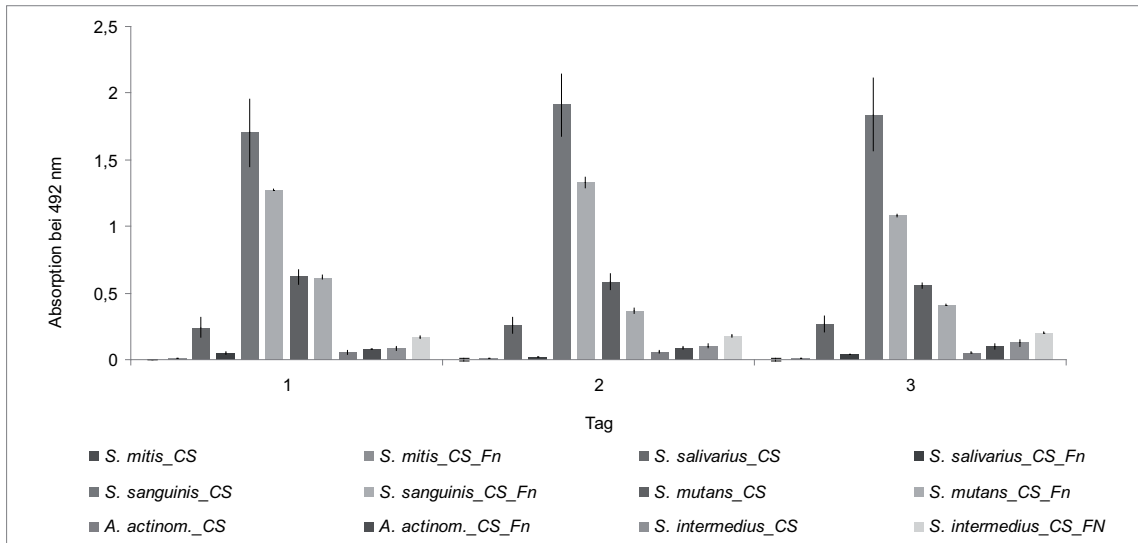


Abbildung 7: Vergleich der Adhärenz bzw. Biofilmbildung der fakultativ aeroben Spezies in CDM/Saccharose auf einer unbeschichteten und Fibronectin-beschichteten Oberfläche. Der Graph zeigt die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono-Spezies Kulturen auf unbeschichteter bzw. Fibronectin-beschichteter Oberfläche. CS – CDM/Saccharose, Fn – Fibronectin, *A. actinom.* – *A. actinomycetemcomitans*.

Für die obligat anaeroben Bakterien konnte im Zusammenhang mit der Fibronectin-Beschichtung keine Veränderung der geringen Adhärenz oder gar eine Biofilmbildung beobachtet werden. *S. mitis* und *S. salivarius* waren unter diesen Bedingungen ebenfalls nicht in der Lage, Biofilmstrukturen auszubilden. Die nachfolgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung in künstlichem Speichel/Galaktose (Abbildung 8).

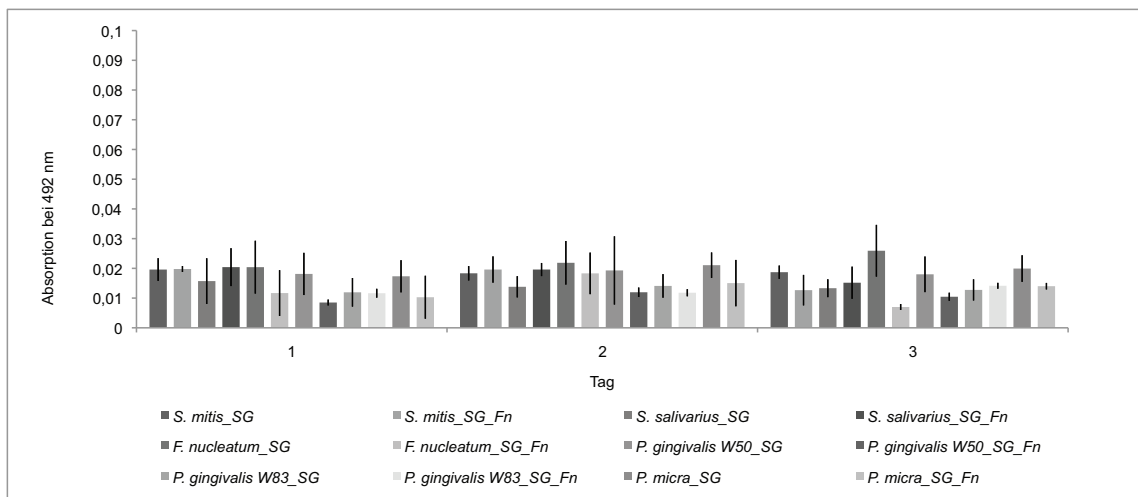


Abbildung 8: Vergleich der Adhärenz von *S. mitis*, *S. salivarius* und den obligat anaeroben Spezies in künstlichem Speichel/Galaktose auf einer unbeschichteten und Fibronectinbeschichteten Oberfläche. Der

Graph zeigt die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono-Spezies Kulturen auf unbeschichteter bzw. Fibronektinbeschichteter Oberfläche. SG – künstlicher Speichel/Galaktose, Fn – Fibronektin.

Wenngleich die Fibronektinbeschichtung für einige Spezies einen Einfluss auf die Biofilmbildung hatte, wurden wegen der überwiegend geringen Effekte die nachfolgenden Untersuchungen auf unbeschichteten Oberflächen fortgeführt.

3.2 Studien zur Biofilm-Entwicklung

Diese Analyse sollte Dauer und Phasen der Biofilmentwicklung sowie einen möglichen Zusammenhang zwischen Biofilmbildung und Umgebungs-pH-Wert prüfen. Für die Untersuchungen wurden ausschließlich die Biofilm-bildenden Bakterien *S. mutans* DSM 20523, *S. sanguinis* DSM 20567, *S. salivarius* K12 und *S. intermedius* AC 3105, sowie der zur Bildung von einschichtigen Zellrasen (*monolayer*) fähige *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 11123 verwendet.

Für die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Biofilmbildung wurde in einem Zeitraum von insgesamt 24 Stunden unmittelbar nach der Inokulation eine stündliche, nach 13 Stunden eine 2-stündige simultane Bestimmung der Biofilm-Masse und des pH-Wertes durchgeführt. Zusätzlich wurde nach 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden die Biofilmstruktur mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Lebend/Tot-Färbung dokumentiert (2.12.1). Die Abbildung 9 zeigt die Daten und mikroskopischen Bilder für die verschiedenen Bakterien.

Abbildung 9A) Biofilmentwicklung *S. mutans* DSM 20523

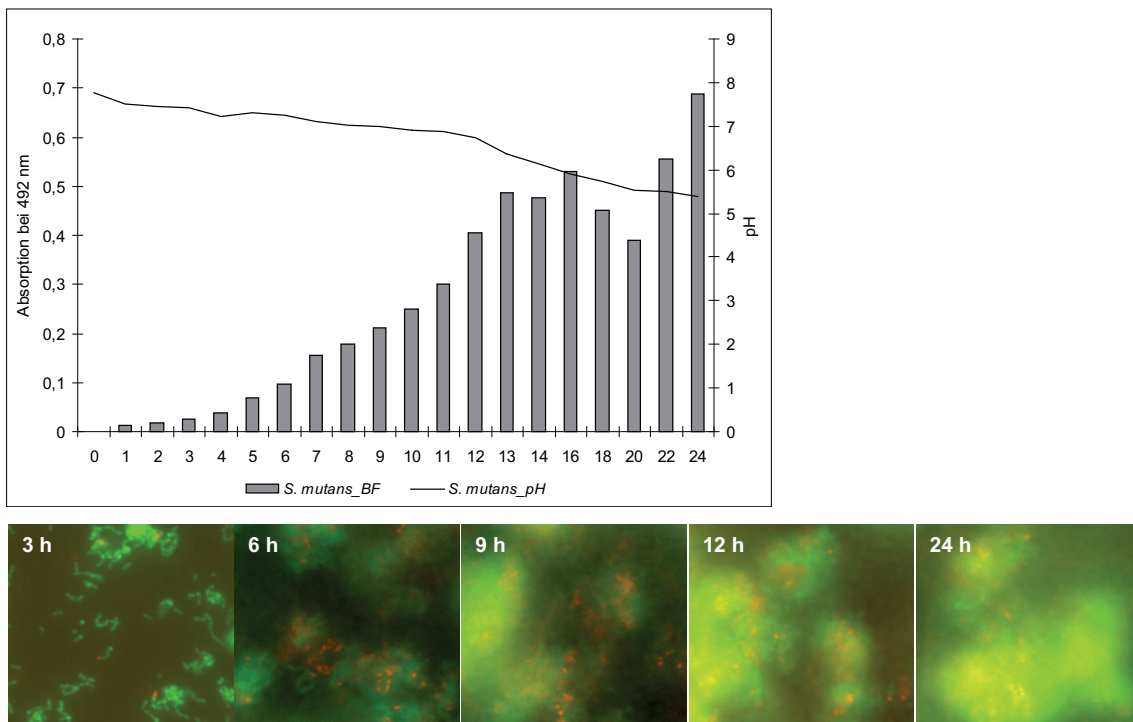


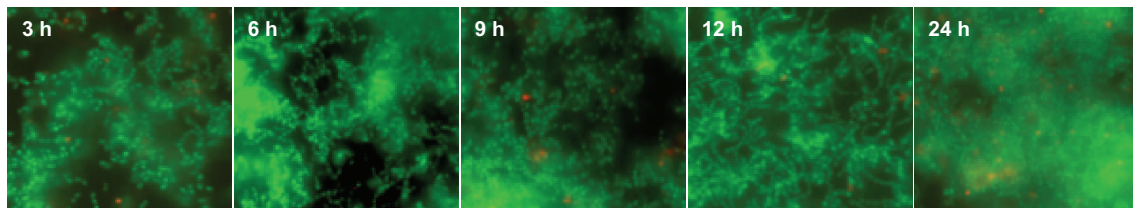
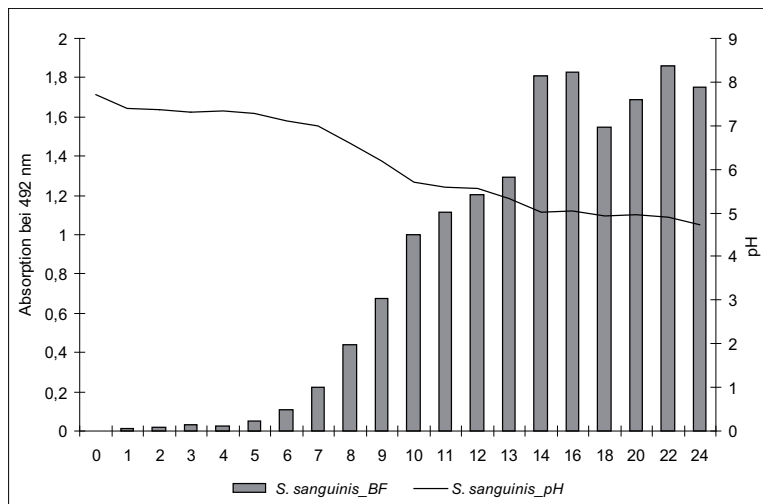
Abbildung 9B) Biofilmentwicklung *S. sanguinis* DSM 20567

Abbildung 9C) Biofilmentwicklung *S. salivarius* K12

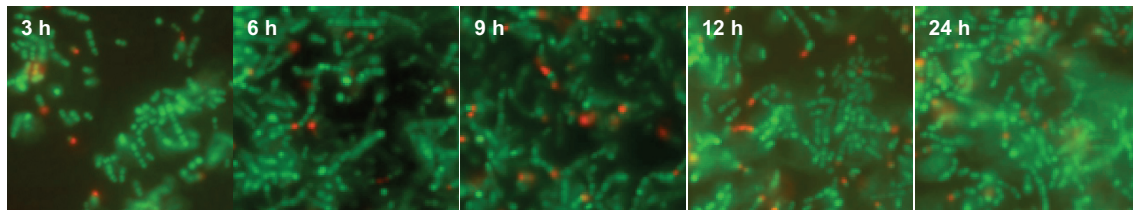
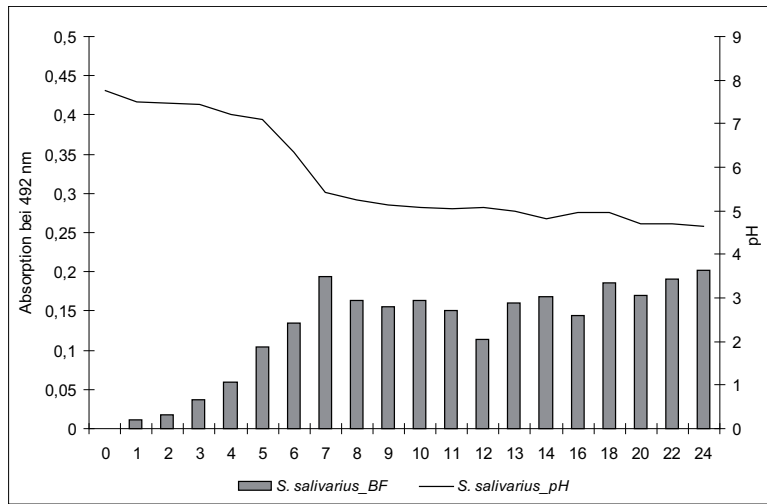


Abbildung 9D) Biofilmentwicklung *S. intermedius* AC 3105

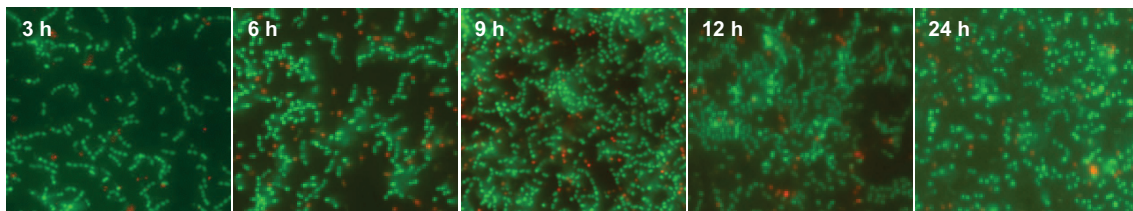
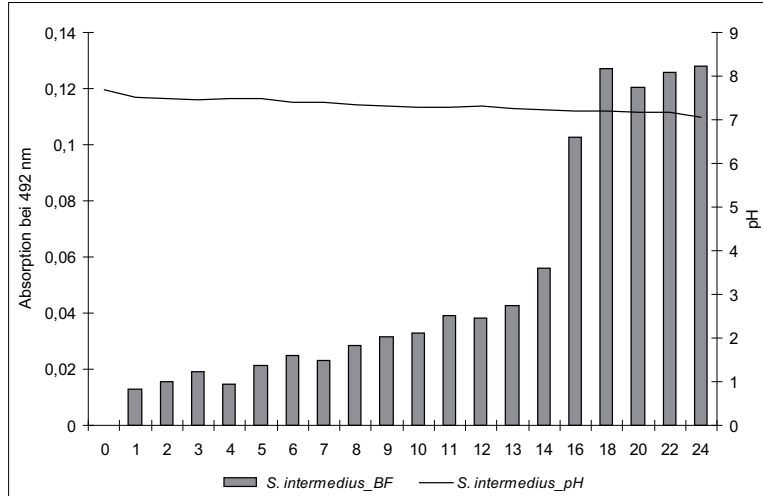


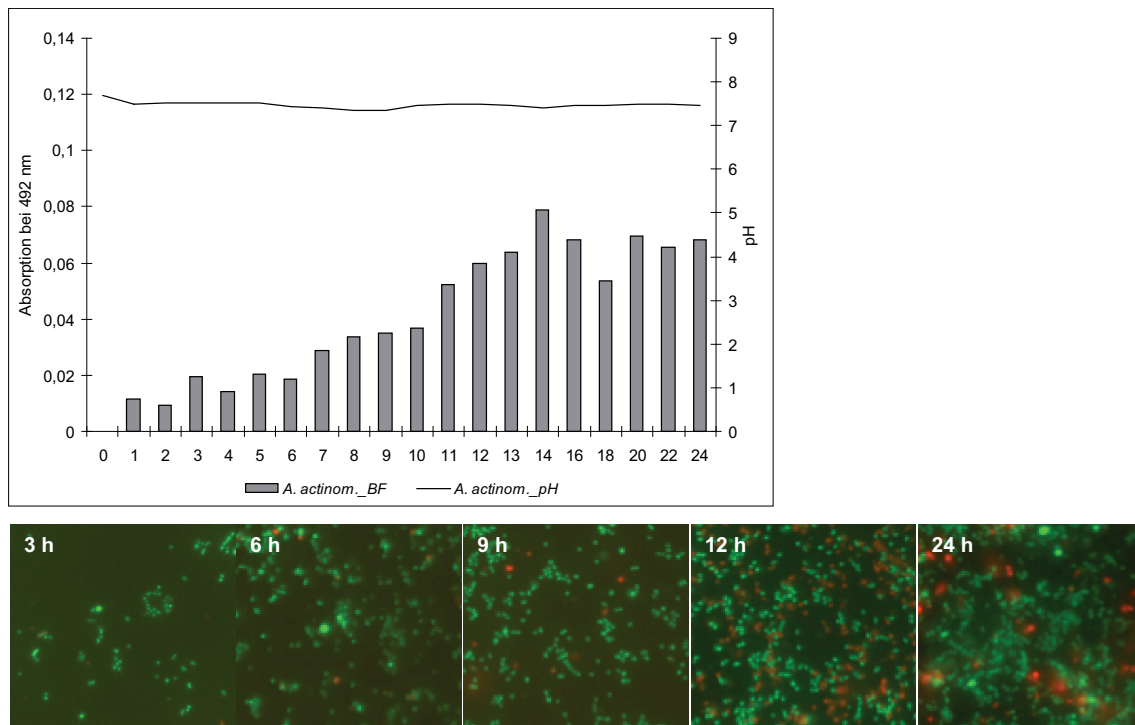
Abbildung 9E) Biofilmentwicklung *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 11123

Abbildung 9: Resultate der Biofilmentwicklung für A) *S. mutans*, B) *S. sanguinis*, C) *S. salivarius*, D) *S. intermedius*, und E) *A. actinomycetemcomitans*. Die Graphen zeigen die Biofilm-Masse und den pH-Verlauf der einzelnen Spezies über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Bilder zeigen die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analysen nach Lebend/Tot-Färbung der 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden alten Biofilmkulturen. Vergrößerung 400x.

In der mikroskopischen Inspektion lagen alle getesteten Bakterien nach drei Stunden anaerober Inkubation auf der Oberfläche der verwendeten Deckgläschen adhärent vor.

Vier Stunden nach Inokulation konnte für *S. salivarius* und nach 5 Stunden auch für *S. mutans* und *S. sanguinis* die beginnende Biofilmbildung mittels Safranin-Färbung nachgewiesen werden. Die Biofilm-Masse dieser 3 Bakterien nahm über den Versuchszeitraum rasch zu, wobei für *S. mutans* zwischen den mikroskopischen Aufnahmen von Stunde 12 und Stunde 24 der Inkubation kaum noch Veränderungen zu erkennen waren, während die Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung noch einen weiteren Anstieg zeigte.

Für *S. salivarius* und *S. sanguinis* konnte dagegen auch mikroskopisch noch eine Zunahme der Biofilm-Masse in dem Zeitraum Stunde 12 bis 24 beobachtet werden. Die mittels Safranin-Färbung ermittelte Biofilm-Masse von *S. sanguinis* nahm in dieser Zeit auch tatsächlich noch zu, wogegen für *S. salivarius* kaum noch eine Änderung der Biofilm-Masse detektiert werden konnte.

Die Messung des pH-Wertes zeigte für die *S. mutans* Monokultur ein langsames Absinken in den sauren Bereich (pH 5,5 nach 20 Stunden). Bei *S. sanguinis* erreichte der pH-Wert bereits nach 10 Stunden einen Wert von 5,7. Bei *S. salivarius* konnte ein sehr schnelles Ansäuern des Mediums

(Stunde 5 mit pH 7,1 und Stunde 7 mit pH 5,4) bei gleichzeitig beginnender Biofilmbildung nachgewiesen werden.

Für *S. intermedius* konnte eine beginnende Biofilmbildung erst nach 14 Stunden detektiert werden, wobei der pH-Wert nur sehr langsam auf pH 7,07 nach 24 Stunden sank und damit im neutralen Bereich blieb. Auch für *A. actinomycetemcomitans* blieb der pH-Wert in diesem Bereich und war nur unwesentlich niedriger als bei Inokulation des Bakteriums. Die beginnende Bildung eines einschichtigen Zellrasens konnte für diese Spezies nach ca. 11 Stunden beobachtet werden, wobei die fluoreszenzmikroskopischen Analysen erst nach 24 Stunden eine durchgängige Oberflächenbedeckung durch *A. actinomycetemcomitans* ergaben.

3.3 Untersuchungen von Zwei-Spezies Kombinationen – Ko-Kultivierung der fakultativ aeroben Bakterien in CDM/Saccharose

Um der natürlichen Situation in der Mundhöhle näher zu kommen, wurden als nächstes Di-Spezies Biofilme etabliert und analysiert. Dazu wurden die verwendeten Bakterienstämme entweder mit dem zur physiologischen Mundflora gehörenden Bakterium *S. mitis* oder dem physiologischen/probiotischen Bakterium *S. salivarius* K12 kombiniert.

Im Nachfolgenden sind die Ergebnisse der Safranin-Färbung, Lebendkeimzahlbestimmung sowie mikroskopischen Analyse (exemplarisch für Tag 1 der Untersuchung) für die einzelnen Kombinationen dargestellt.

3.3.1 Ko-Kultivierung von *Streptococcus mitis* ATCC 15914 mit *Streptococcus mutans* DSM 20523 bzw. UA159

Die Kombination von *S. mitis* mit *S. mutans* DSM 20523 resultierte in einer erhöhten Biofilm-Masse im Vergleich zur Biofilm-Masse der *S. mutans* Monokultur (Abbildung 10A). Mikroskopische Analysen zeigten, dass *S. mitis* in der Lage war in die Biofilmstrukturen von *S. mutans* zu integrieren. Die Analyse des Biofilms nach Lebend/Tot-Färbung der Bakterien ergab, dass *S. mitis* bereits an Tag 1 hauptsächlich rot gefärbt und damit tot vorlag, während Einzelzellen von *S. mutans* aufgrund der starken Dextranbildung nicht sicher detektiert werden konnten. Dadurch konnte keine Aussage über den Vitalitätszustand von *S. mutans* getroffen werden.

In Abbildung 10B sind die Ergebnisse der konfokalen Laser Raster Mikroskopie dargestellt. Bei der Bestimmung der Lebendkeimzahl konnten in dieser Kombination keine Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) von *S. mitis* ermittelt werden. *S. mutans* dagegen war in der Anzahl der KBE durch die Anwesenheit von *S. mitis* nicht beeinflusst (Abbildung 10C). Die Messung des pH-Wertes der Kombination zeigte einen schnelleren Abfall in den sauren Bereich verglichen mit der *S. mutans* Monokultur. Zudem erreichte der pH-Wert der Kombination einen tieferen Wert als für die beiden Monokulturen von *S. mitis* und *S. mutans* (Abbildung 10C).

Abbildung 10A)

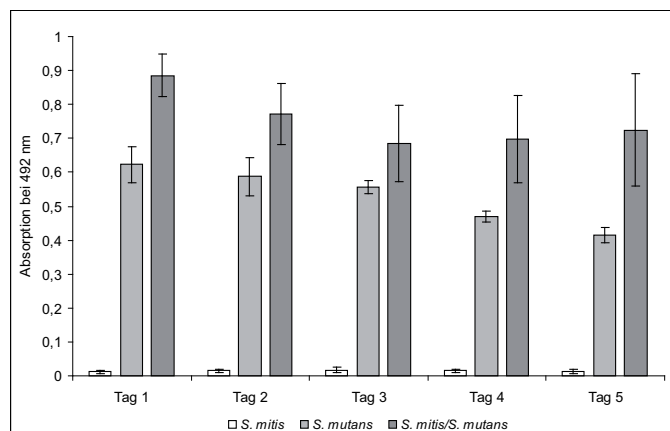


Abbildung 10B)

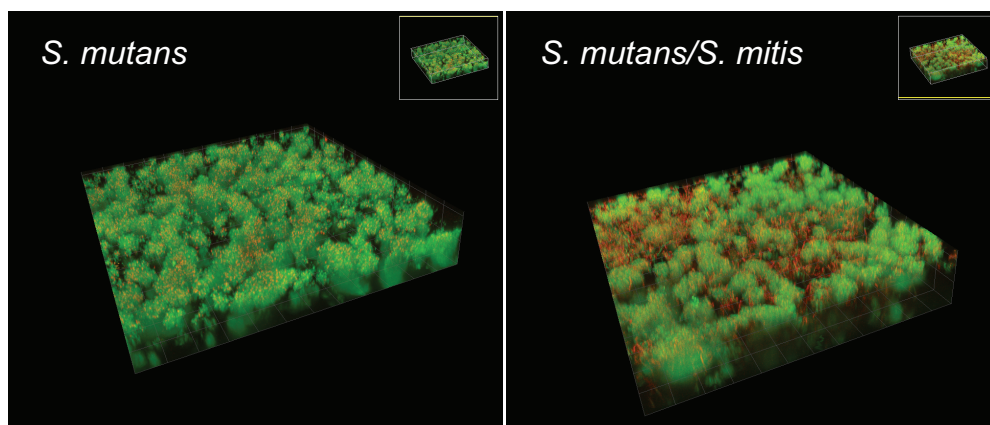


Abbildung 10C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. mitis</i>	1,83E+06	1,20E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mitis (S. mutans)</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mutans</i>	4,70E+07	6,82E+07	1,00E+07	5,94E+06	3,01E+06
<i>S. mutans (S. mitis)</i>	4,43E+07	6,39E+07	1,25E+07	3,13E+06	1,70E+04
pH					
<i>S. mitis</i>	4,77	4,72	4,72	4,8	4,76
<i>S. mutans</i>	5,39	5,23	5,23	5,1	5,13
<i>S. mitis/S. mutans</i>	5,01	4,7	4,57	4,52	4,51

Abbildung 10: Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit *S. mutans*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kulturen. B) Konfokale Laser Raster Mikroskopie und 3-dimensionale Darstellung der Biofilmstruktur des *S. mutans* Mono- und des *S. mutans* / *S. mitis* Mischbiofilms nach Lebend/Tot-Färbung. Vergrößerung 630x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

Die Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit dem Stamm *S. mutans* UA159 führte zu ähnlichen Ergebnissen wie mit *S. mutans* DSM 20523. Aus diesem Grund werden die Daten an dieser Stelle nicht gezeigt.

3.3.2 Ko-Kultivierung von *Streptococcus mitis* mit *Streptococcus sanguinis* DSM 20567 bzw. SK36

Die Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit den für die menschliche Mundhöhle physiologischen Bakterienstämmen *S. sanguinis* DSM 20567 bzw. *S. sanguinis* SK36 führte zu ähnlichen Resultaten. Einzige erreichten Werte der Biofilm-Masse sowohl für die *S. sanguinis* Mono- als auch Di-Spezies Kulturen mit *S. mitis* unterschieden sich geringfügig. Daher wird exemplarisch nur auf die Resultate der Kombination von *S. mitis* mit *S. sanguinis* DSM 20567 eingegangen.

Die Di-Spezies Kombination von *S. sanguinis* mit *S. mitis* resultierte in einer drastisch verminderten Biofilm-Masse im Vergleich zur Biofilm-Masse der *S. sanguinis* Monokultur (Abbildung 11A). Mikroskopische Analysen zeigten vereinzelte Zellhaufen von *S. sanguinis* auf der Deckglasoberfläche. Nur wenige Zellen von *S. mitis* konnten detektiert werden. Die REM-Aufnahmen in Abbildung 11B zeigen sowohl die Bilder der Monokulturen als auch der Kombination. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nach Lebend/Tot-Färbung konnte die starke Reduktion der Biofilm-Bildung bestätigt werden. Ein Vergleich der Mono- und Di-Spezies Kultur hinsichtlich der Anzahl toter bzw. lebender Zellen war jedoch nicht möglich. Aufgrund der starken Biofilm-Bildung der Monokultur und der damit einhergehenden starken Fluoreszenz der extrazellulären Matrix konnten keine Einzelzellen detektiert werden. Die Bestimmung der Lebendkeimzahl zeigte jedoch, dass in beiden Ansätzen die Anzahl Kolonie-bildender Einheiten für *S. sanguinis* gleich blieb. Für *S. mitis* konnten in der Kombination keine Keimzahlen bestimmt werden (Abbildung 11C).

Die Messung des pH-Wertes der Kombination zeigte eine geringfügig stärkere Ansäuerung im Vergleich mit den Monokulturen (Abbildung 11C).

Abbildung 11A)

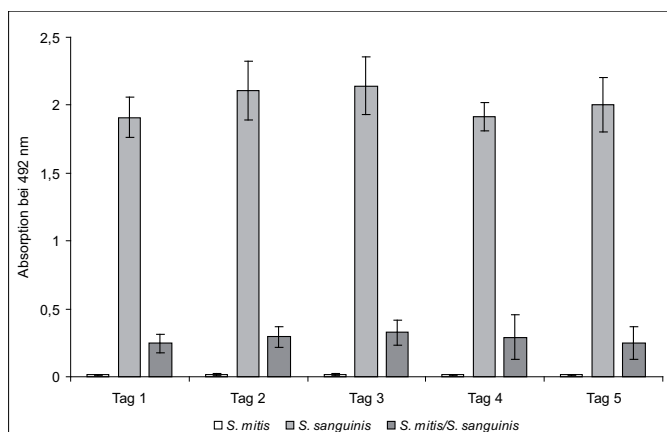


Abbildung 11B)

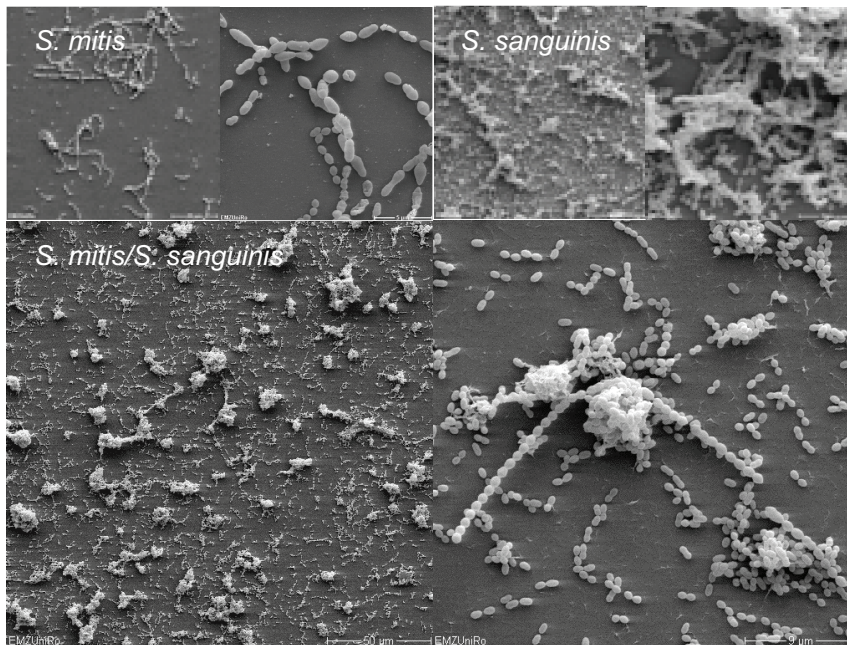


Abbildung 11C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. mitis</i>	1,83E+06	1,20E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mitis</i> (<i>S. sanguinis</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. sanguinis</i>	1,44E+08	1,66E+06	6,18E+03	3,50E+01	0,00E+00
<i>S. sanguinis</i> (<i>S. mitis</i>)	4,10E+08	9,95E+06	6,85E+04	1,22E+03	0,00E+00
pH					
<i>S. mitis</i>	4,77	4,72	4,72	4,8	4,76
<i>S. sanguinis</i>	4,73	4,73	4,76	4,7	4,78
<i>S. mitis</i> / <i>S. sanguinis</i>	4,67	4,63	4,63	4,58	4,62

Abbildung 11: Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit *S. sanguinis*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der *S. mitis* und *S. sanguinis* Mono- und des *S. mitis* / *S. sanguinis* Mischbiofilms. Vergrößerung 500x und 3000x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.3.3 Ko-Kultivierung von *Streptococcus mitis* mit *Streptococcus intermedius*

Die Kombination von *S. mitis* mit dem Parodontitis-assoziierten Bakterium *S. intermedius* resultierte im Vergleich zur Biofilm-Masse der *S. intermedius* Monokultur in einer verminderten Biofilm-Masse (Abbildung 12A). Mikroskopische Analysen zeigten eine vereinzelt Anheftung von *S. mitis* an die Deckglasoberfläche bzw. direkt an die Zellen von *S. intermedius*. Die Lebend/Tot-Färbung der Bakterien ergab, dass *S. intermedius* unter diesen Bedingungen hauptsächlich tot vorlag (rot gefärbt), während die Zellketten von *S. mitis* vornehmlich lebend (grün gefärbt) waren (Abbildung 12B). Die Bestimmung der Lebendkeimzahl zeigte, dass *S. intermedius* unter dem Einfluss von *S. mitis* innerhalb von 3 Tagen nicht mehr kultivierbar war. *S. intermedius* alleine konnte dagegen während des ganzen

5-tägigen Untersuchungszeitraumes aus dem Mono-Spezies-Biofilm kultiviert werden (Abbildung 12C). Die Messung des pH-Wertes der Kombination zeigte einen drastischen Abfall in den sauren Bereich verglichen mit der *S. intermedius* Monokultur. In dieser fiel der pH-Wert über den 5-tägigen Untersuchungszeitraum nur geringfügig ab (Abbildung 12C).

Abbildung 12A)

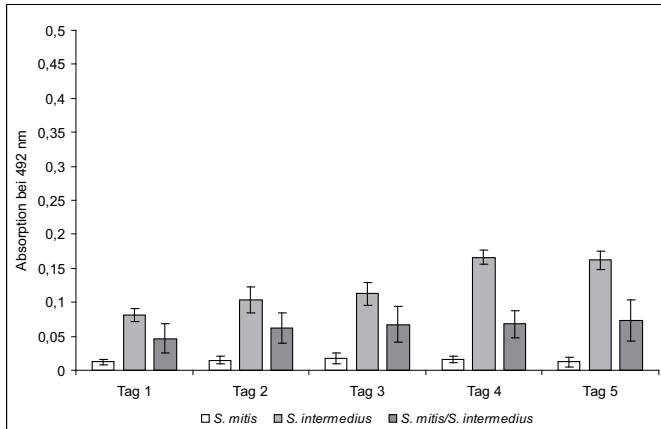


Abbildung 12B)

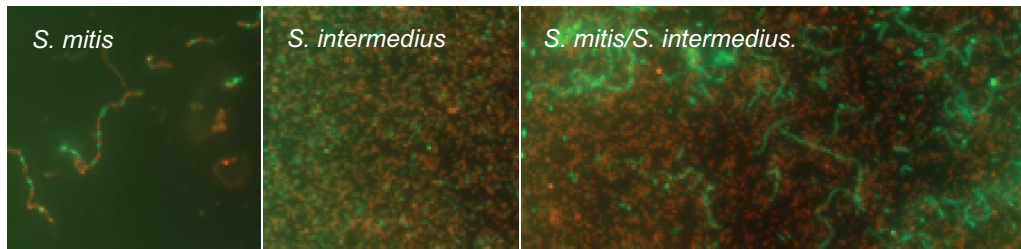


Abbildung 12C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. mitis</i>	1,83E+06	1,20E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mitis</i> (<i>S. intermedius</i>)	4,25E+05	3,98E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. intermedius</i>	5,88E+06	1,22E+06	4,72E+05	1,47E+05	3,51E+04
<i>S. intermedius</i> (<i>S. mitis</i>)	4,13E+06	3,83E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
pH					
<i>S. mitis</i>	4,77	4,72	4,72	4,8	4,76
<i>S. intermedius</i>	7,31	7,24	7,16	7,16	7,15
<i>S. mitis/S. intermedius</i>	4,69	4,65	4,64	4,65	4,63

Abbildung 12: Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit *S. intermedius*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Biofilmstruktur des *S. mitis* und *S. intermedius* Mono- und des *S. mitis* / *S. intermedius* Mischbiofilms nach Lebend/Tot-Färbung. Vergrößerung 400x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.3.4 Ko-Kultivierung von *Streptococcus mitis* mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DSMZ 11123 bzw. HK1651

Die Kombination von *S. mitis* mit den Parodontitis-assoziierten Bakterienstämmen *A. actinomycetemcomitans* DSMZ11123 bzw. HK1651 führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Daher werden exemplarisch nur die Ergebnisse mit *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 11123 gezeigt.

Die Kombination mit *S. mitis* resultierte in einer verminderten Menge adhärenter Zellen im Vergleich zur *A. actinomycetemcomitans* Monokultur (Abbildung 13A). Mikroskopische Analysen bestätigten diese Beobachtung und zeigten zudem eine vereinzelt Anheftung von *S. mitis* an die Deckglasoberfläche bzw. an die Zellen von *A. actinomycetemcomitans*. Die Lebend/Tot-Färbung der Bakterien ergab, ähnlich wie für die Kombination *S. mitis* / *S. intermedius*, dass *A. actinomycetemcomitans* unter diesen Bedingungen hauptsächlich tot vorlag, während die Zellketten von *S. mitis* vornehmlich grün gefärbt, und damit lebend waren. In Abbildung 13B sind die Ergebnisse der Konfokalen Laser Raster Mikroskopie nach Lebend/Tot-Färbung dargestellt. Die Bestimmung der Lebendkeimzahl zeigte, dass *A. actinomycetemcomitans* in der Kombination mit *S. mitis* nicht mehr kultivierbar war. Aus der Monokultur konnte *A. actinomycetemcomitans* dagegen auch nach 5-tägiger anaerober Inkubation angezüchtet werden (Abbildung 13C). Der pH-Wert der Kombination sank innerhalb von 24 Stunden in den sauren Bereich, und erreichte dabei etwas niedrigere Werte als die *S. mitis* Monokultur. Im Gegensatz dazu konnte für die *A. actinomycetemcomitans* Monokultur kaum eine Änderung im pH-Wert detektiert werden (Abbildung 13C).

Abbildung 13A)

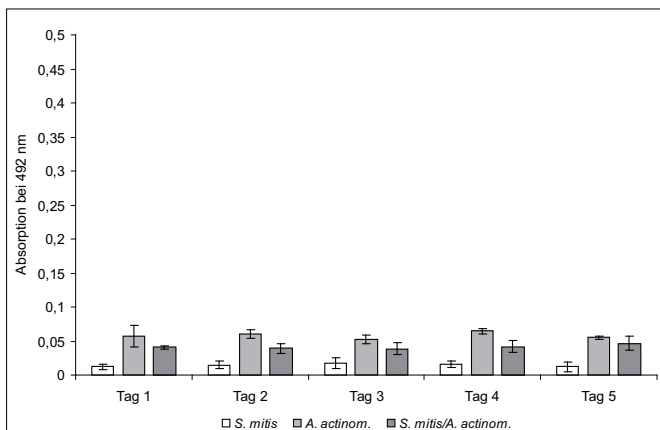


Abbildung 13B)

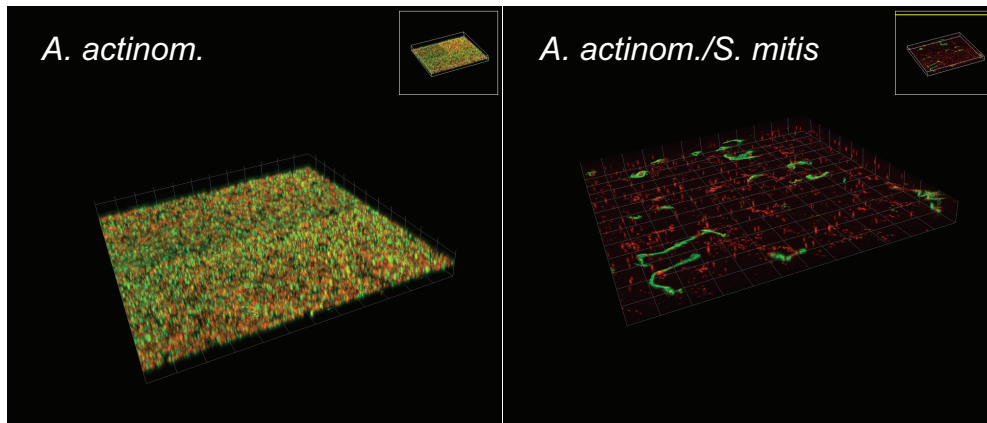


Abbildung 13C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. mitis</i>	1,83E+06	1,20E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mitis</i> (<i>A. actinom.</i>)	1,13E+05	5,88E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5,78E+07	7,19E+06	3,25E+05	9,75E+04	5,46E+04
<i>A. actinom.</i> (<i>S. mitis</i>)	5,00E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
pH					
<i>S. mitis</i>	4,77	4,72	4,72	4,8	4,76
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	7,47	7,38	7,38	7,27	7,35
<i>S. mitis/A. actinom.</i>	4,55	4,54	4,55	4,52	4,56

Abbildung 13: Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit *A. actinomycetemcomitans*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Konfokale Laser Raster Mikroskopie und 3-dimensionale Darstellung der Biofilmstruktur des *A. actinomycetemcomitans* Mono- und des *A. actinomycetemcomitans* / *S. mitis* Mischbiofilms nach Lebend/Tot-Färbung. Vergrößerung 630x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies Kultur. *A. actinom.* – *A. actinomycetemcomitans*.

3.3.5 Ko-Kultivierung von *Streptococcus salivarius* mit *Streptococcus mutans* DSM 20523 bzw. UA159

Die Ergebnisse der Kombination von *S. salivarius* mit den Karieserregern *S. mutans* DSM 20523 bzw. UA159 waren annähernd gleich. Deswegen wird exemplarisch nur das Resultat für die Ko-Kultur mit *S. mutans* DSM 20523 dargestellt.

Die Safranin-Färbung der Di-Spezies Kultur ergab eine erhöhte Biofilm-Masse im Vergleich zur Biofilm-Masse der *S. salivarius* und *S. mutans* Monokulturen (Abbildung 14A). Mikroskopische Analysen zeigten, dass *S. salivarius* in der Lage war in die Biofilmstrukturen von *S. mutans* zu integrieren (Abbildung 14B). Dabei ergab die Lebend/Tot-Färbung, dass *S. salivarius* im Verlauf der Integration abstarb. Allerdings war es aufgrund der hohen Biofilm-Masse (Dextranstrukturen von *S. mutans*) und der damit verbundenen starken Fluoreszenz kaum möglich, die Bakterien einzeln zu detektieren. Eine genaue Aussage zur Anzahl lebender/toter Bakterien konnte somit nicht getroffen werden.

Die Bestimmung der Lebendkeimzahl zeigte aber, dass keine wesentliche Änderung der *S. salivarius* bzw. *S. mutans* Mengen im Vergleich zu deren Monokulturen vorlag. Nach 5 Tagen war *S. salivarius* nicht mehr kultivierbar. Für *S. mutans* konnten dagegen über den ganzen Untersuchungszeitraum Zellen kultiviert werden (Abbildung 14C). Die Messung des pH-Wertes der Kombination zeigte einen stärkeren Abfall in den sauren Bereich verglichen mit den Monokulturen, besonders der *S. mutans* Monokultur (Abbildung 14C).

Abbildung 14A)

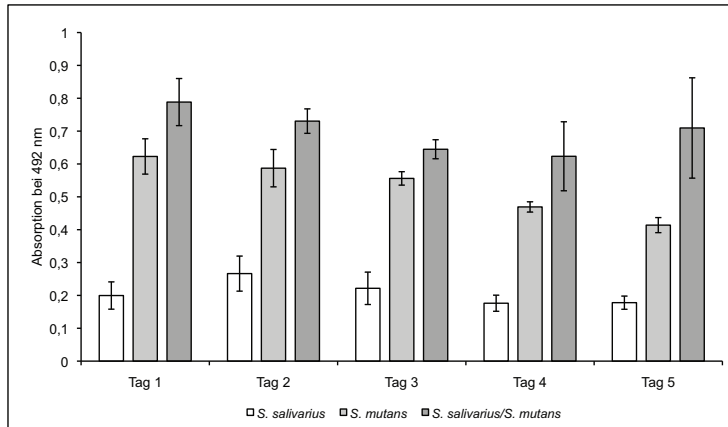


Abbildung 14B)

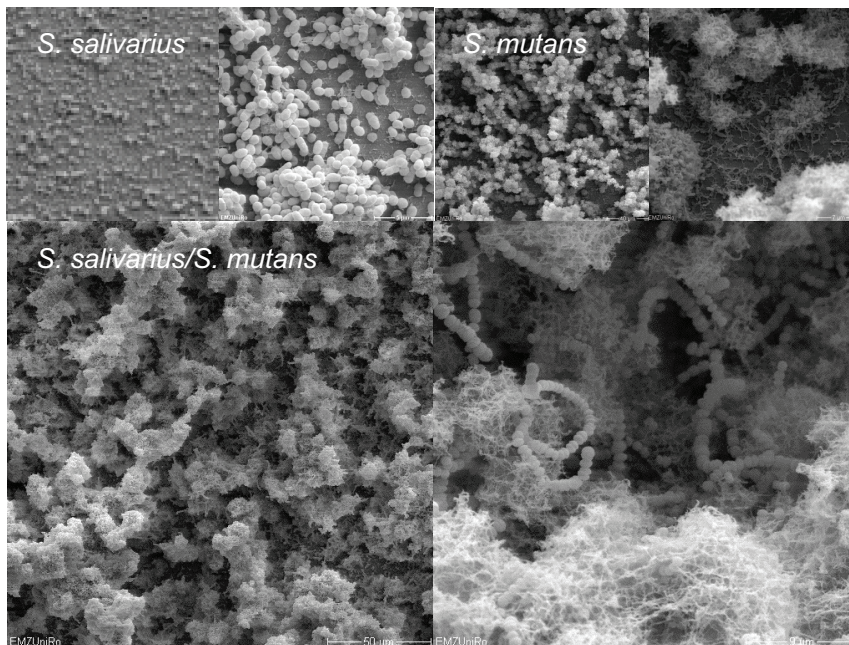


Abbildung 14C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. salivarius</i>	2,18E+07	3,01E+06	3,10E+04	9,10E+01	0,00E+00
<i>S. salivarius</i> (<i>S. mutans</i>)	3,18E+07	3,49E+05	2,13E+04	1,00E+00	0,00E+00
<i>S. mutans</i>	4,70E+07	6,82E+07	1,00E+07	5,94E+06	3,01E+06
<i>S. mutans</i> (<i>S. salivarius</i>)	9,90E+06	2,16E+07	1,00E+07	7,47E+06	7,91E+06
pH					
<i>S. salivarius</i>	4,63	4,6	4,58	4,6	4,57
<i>S. mutans</i>	5,39	5,23	5,23	5,1	5,13
<i>S. salivarius</i> / <i>S. mutans</i>	4,77	4,52	4,42	4,37	4,38

Abbildung 14: Ko-Kultivierung von *S. salivarius* mit *S. mutans*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der *S. salivarius* und *S. mutans* Mono- und des *S. salivarius* / *S. mutans* Mischbiofilms. Vergrößerung 500x und 3000x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.3.6 Ko-Kultivierung von *Streptococcus salivarius* mit *Streptococcus sanguinis* DSM 20567 bzw. SK36

Die für die menschliche Mundhöhle physiologischen Bakterien *S. sanguinis* DSM 20567 und SK36 wurden beide in Kombination mit *S. salivarius* analysiert. Für beide *S. sanguinis* Stämme ergaben sich wiederum gleichartige Resultate, deswegen werden exemplarisch nur die Ergebnisse für die Kombination *S. salivarius* / *S. sanguinis* DSM 20567 gezeigt. Die Safranin-Färbung der Di-Spezies Kombination ergab eine weit geringere Biofilm-Masse als für die *S. sanguinis* Monokultur, wogegen eine leichte Erhöhung verglichen mit der *S. salivarius* Monokultur vorlag (Abbildung 15A).

Raster- und fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, dass sowohl *S. salivarius* als auch *S. sanguinis* auf der Oberfläche gebunden vorlagen, aber auch eine weit geringere Zell-Masse als für die *S. sanguinis* Monokultur. Zudem wurde offensichtlich, dass *S. salivarius* der dominante Organismus in dieser Kombination war, während *S. sanguinis* hauptsächlich die Oberfläche in kleinen Zellhaufen besiedelte.

Die Mehrzahl der Zellen beider Mikroorganismen war vital, was in Abbildung 15B dargestellt ist. Ohne dies wegen des mehrschichtigen Biofilms genau quantifizieren zu können, war der Anteil toter *S. salivarius* und *S. sanguinis* Zellen im Vergleich mit den Monokulturen erhöht. Die Bestimmung der Lebendkeimzahl ergab eine verminderte Anzahl Kolonie-bildender Einheiten von *S. sanguinis* in der Kombination verglichen mit der *S. sanguinis* Monokultur. Für *S. salivarius* konnte hingegen eine Zunahme Kolonie-bildender Einheiten in der Di-Spezies Kombination beobachtet werden (Abbildung 15C). Beide Spezies säuerten das Medium in Monokultur an. Dieser Effekt verstärkte sich in der Ko-Kultivierung (Abbildung 15C).

Abbildung 15A)

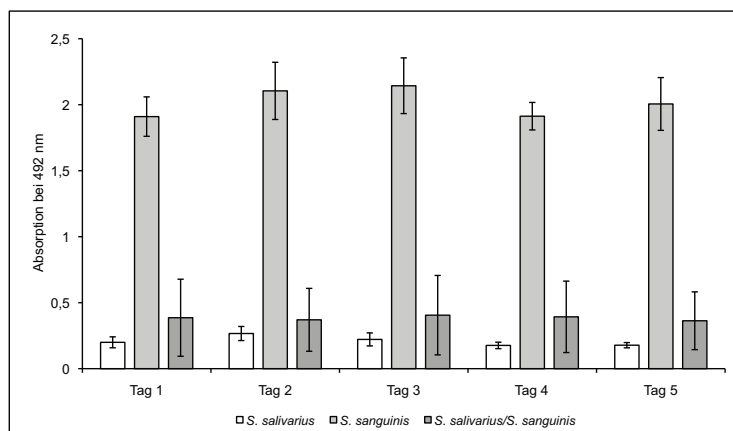


Abbildung 15B)

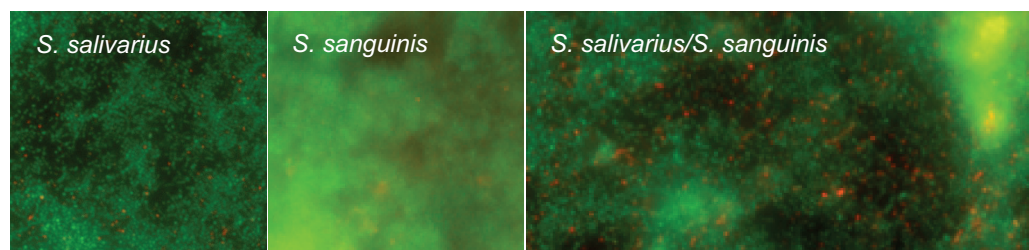


Abbildung 15C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. salivarius</i>	2,18E+07	3,01E+06	3,10E+04	9,10E+01	0,00E+00
<i>S. salivarius (S. sanguinis)</i>	1,77E+08	1,25E+07	3,83E+05	5,10E+03	5,00E+02
<i>S. sanguinis</i>	1,44E+08	1,66E+06	6,18E+03	3,50E+00	0,00E+00
<i>S. sanguinis (S. salivarius)</i>	4,75E+07	2,80E+05	3,00E+02	0,00E+00	2,00E+01
pH					
<i>S. salivarius</i>	4,63	4,6	4,58	4,6	4,57
<i>S. sanguinis</i>	4,73	4,73	4,76	4,7	4,78
<i>S. salivarius/S. sanguinis</i>	4,54	4,45	4,43	4,41	4,4

Abbildung 15: Ko-Kultivierung von *S. salivarius* mit *S. sanguinis*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Biofilmstruktur des *S. salivarius* und *S. sanguinis* Mono- und des *S. sanguinis* / *S. salivarius* Mischbiofilms. Vergrößerung 400x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.3.7 Ko-Kultivierung von *Streptococcus salivarius* mit *Streptococcus intermedius*

Die Kombination von *S. salivarius* mit dem Parodontitis-assoziierten Bakterium *S. intermedius* resultierte in einer stark erhöhten Biofilm-Masse im Vergleich zu der Biofilm-Masse der *S. intermedius* Monokultur. Verglichen mit der *S. salivarius* Monokultur konnte dagegen nur für Tag 1, 4 und 5 der Inkubation eine etwas erhöhte Biofilm-Masse detektiert werden (Abbildung 16A). Mikroskopische Analysen mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigten eine Dominanz von *S. salivarius*, während *S. intermedius* nur vereinzelt zu beobachten war (Abbildung 16B). Zudem ergab die Lebend/Tot-Färbung, dass die Mehrzahl der *S. intermedius* Zellen unter diesen Bedingungen

abstarb. Auch für *S. salivarius* wurde mikroskopisch im Mischbiofilm eine Zunahme toter Zellen beobachtet. Die *S. salivarius* Lebendkeimzahl war jedoch im Vergleich zur Monokultur unverändert. Dagegen nahm die Lebendkeimzahl von *S. intermedius* unter Mischkulturbedingungen stetig ab bis sie am 4. Tag den 0-Wert erreichte (Abbildung 16C).

Der pH-Wert der Ko-Kultur lag im sauren Bereich, während in der *S. intermedius* Monokultur der pH-Wert relativ konstant innerhalb des neutralen Bereiches blieb. Verglichen mit der *S. salivarius* Monokultur war der pH-Wert der Kombination nur unwesentlich niedriger (Abbildung 16C).

Abbildung 16A)

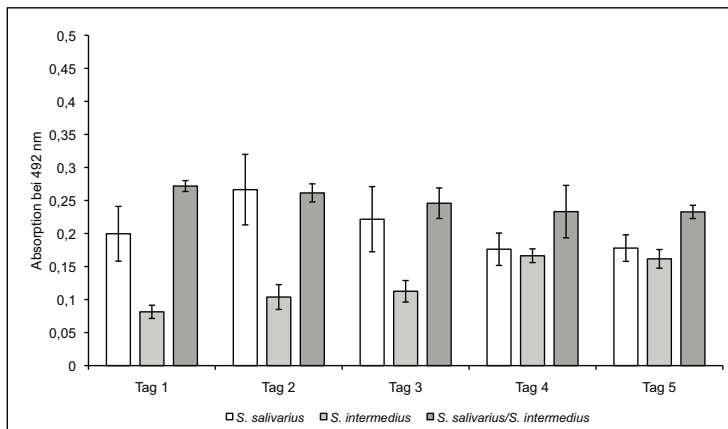


Abbildung 16B)

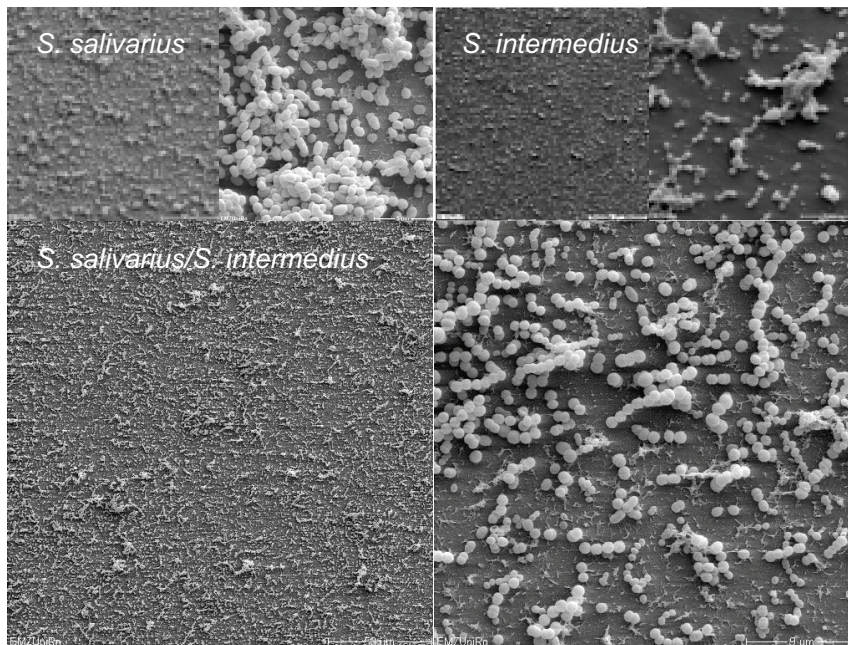


Abbildung 16C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. salivarius</i>	2,18E+07	3,01E+06	3,10E+04	9,10E+01	0,00E+00
<i>S. salivarius</i> (<i>S. intermedius</i>)	8,28E+07	5,55E+06	3,55E+04	6,65E+02	0,00E+00
<i>S. intermedius</i>	5,88E+06	1,22E+06	4,72E+05	1,47E+05	3,51E+04
<i>S. intermedius</i> (<i>S. salivarius</i>)	3,80E+06	2,83E+05	1,25E+03	0,00E+00	0,00E+00
pH					
<i>S. salivarius</i>	4,63	4,6	4,58	4,6	4,57
<i>S. intermedius</i>	7,31	7,24	7,16	7,16	7,15
<i>S. salivarius</i> / <i>S. intermedius</i>	4,52	4,43	4,44	4,43	4,41

Abbildung 16: Ko-Kultivierung von *S. salivarius* mit *S. intermedius*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des *S. salivarius* und *S. intermedius* Mono- und des *S. intermedius* / *S. salivarius* Mischbiofilms. Vergrößerung 500x und 3000x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.3.8 Ko-Kultivierung von *Streptococcus salivarius* mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DSMZ 11123 bzw. HK1651

Die Kombination von *S. salivarius* mit den Parodontitis-assoziierten Bakterien-Stämmen *A. actinomycetemcomitans* DSMZ11123 bzw. HK1651 führte zu ähnlichen Ergebnissen, so dass im Folgenden exemplarisch nur die Resultate mit *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 11123 beschrieben werden.

In der Ko-Kultur bildeten die Bakterien eine Biofilm-Masse aus, die in etwa der von *S. salivarius* in Monokultur entsprach und damit deutlich höher lag, als die „Biofilm-Masse“ der *A. actinomycetemcomitans* Monokultur (Abbildung 17A). Rasterelektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass sowohl *A. actinomycetemcomitans* als auch *S. salivarius* auf der Oberfläche gebunden vorlagen. Dabei schien der unmittelbar Oberflächen-assoziierte Anteil beider Bakterien niedriger zu sein als für die jeweiligen Monokulturen.

S. salivarius dominierte in der Kombination (Abbildung 17B). Dies konnte auch durch fluoreszenzmikroskopische Analysen nach Lebend/Tot-Färbung der Bakterien bestätigt werden. Hierbei wurde zudem ersichtlich, dass *A. actinomycetemcomitans* Zellen in der Kombination mehrheitlich abstarben. Für *S. salivarius* galt dies mit nicht ganz so großen Effekten auf die zelluläre Vitalität. Dies steht mit den Ergebnissen der Lebendkeimzählung in einem gewissen Widerspruch: *A. actinomycetemcomitans* war nicht mehr kultivierbar, *S. salivarius* wies gleich bleibende Bakterienzahlen auf (Abbildung 17C).

Der pH-Wert der Kombination lag im sauren Bereich, unwesentlich niedriger als für die *S. salivarius* Monokultur. Für die *A. actinomycetemcomitans* Monokultur blieb der pH-Wert dagegen im neutralen Bereich (Abbildung 17C).

Abbildung 17A)

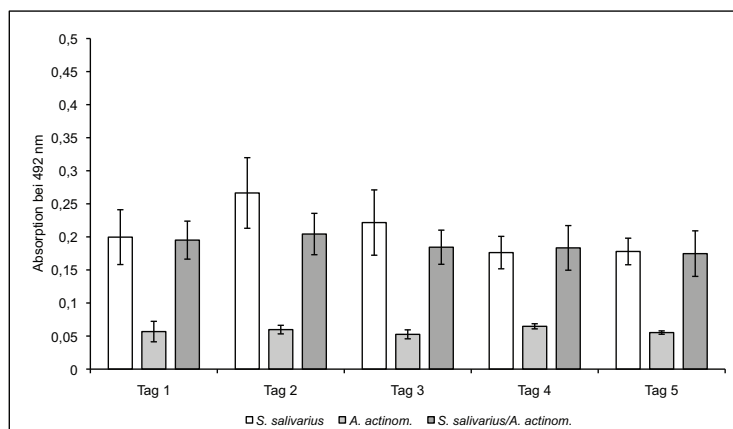


Abbildung 17B)

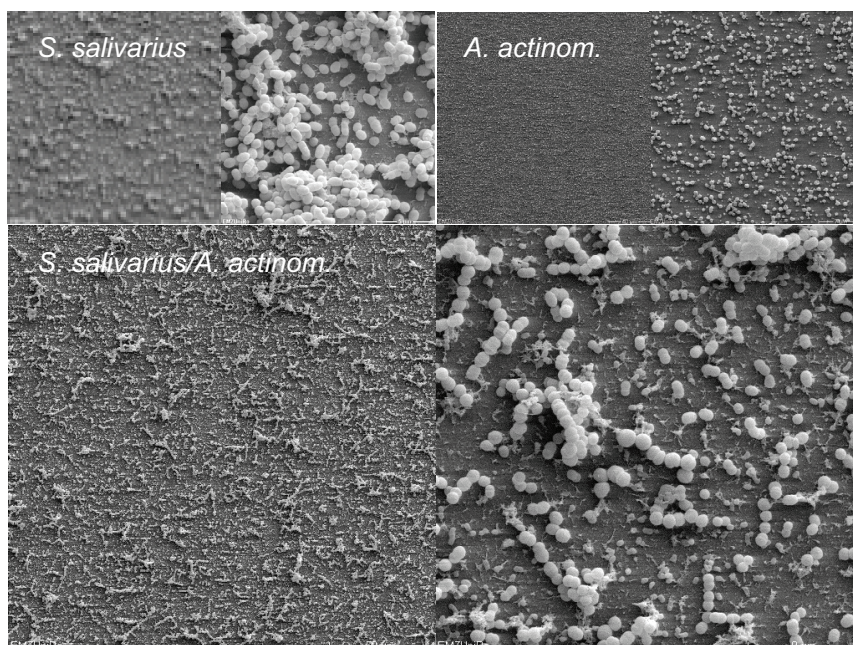


Abbildung 17C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. salivarius</i>	2,18E+07	3,01E+06	3,10E+04	9,10E+01	0,00E+00
<i>S. salivarius (A. actinom.)</i>	2,22E+07	2,72E+06	7,20E+03	1,56E+02	0,00E+00
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5,78E+07	7,19E+06	3,25E+05	9,75E+04	5,46E+04
<i>A. actinom. (S. salivarius)</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
pH					
<i>S. salivarius</i>	4,63	4,6	4,58	4,6	4,57
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	7,47	7,38	7,38	7,27	7,35
<i>S. salivarius/A. actinom.</i>	4,53	4,45	4,45	4,42	4,44

Abbildung 17: Ko-Kultivierung von *S. salivarius* mit *A. actinomycetemcomitans*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des *S. salivarius* und *A. actinomycetemcomitans* Mono- und *S. salivarius* / *A. actinomycetemcomitans* Mischbiofilms. Vergrößerung 500x und 3000x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der

planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Dwei-Spezies-Kultur. *A. actinom.* - *A. actinomycetemcomitans*.

3.4 Untersuchungen von Zwei-Spezies Kombinationen - Ko-Kultivierung der obligat anaeroben Bakterien mit *S. mitis* oder *S. salivarius* in künstlichem Speichel/Galaktose

Bevor *S. mitis* bzw. *S. salivarius* mit den obligat anaeroben Bakterien kombiniert wurden, wurde zunächst deren Adhärenz und/oder Biofilmbildung in künstlichem Speichel/Galaktose untersucht. Die Abbildung 18A-C zeigt die Ergebnisse für beide Bakterien.

Abbildung 18A)

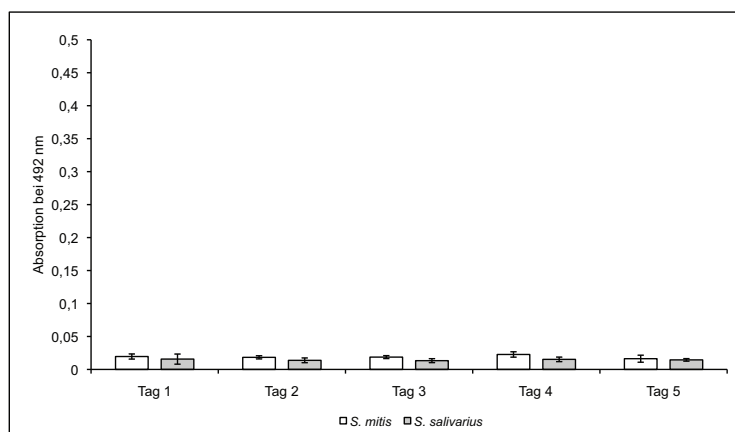


Abbildung 18B)

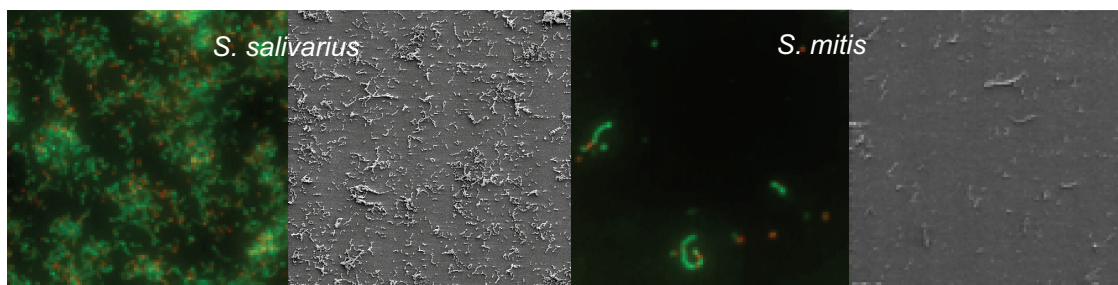


Abbildung 18C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. mitis</i>	2,24E+05	6,69E+03	7,08E+02	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. salivarius</i>	2,02E+06	4,96E+02	6,90E+01	0,00E+00	0,00E+00
pH					
<i>S. mitis</i>	4,45	4,51	4,55	4,6	4,56
<i>S. salivarius</i>	4,66	4,7	4,75	4,72	4,805

Abbildung 18: Eigenschaften von *S. mitis* und *S. salivarius* in künstlichem Speichel/Galaktose (SG). Die Analyse der Mono-Spezies-Kultur erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen unter anaeroben Bedingungen. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono-Spezies Kulturen. B)

Rasterelektronen- sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Lebend/Tot-Färbung. Vergrößerung 400x bzw. 500x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono-Spezies-Kultur.

Für *S. mitis* wurde auch in diesem Medium keine Biofilmbildung detektiert. Dies konnte sowohl durch Fluoreszenz- als auch Rasterelektronenmikroskopie gezeigt werden. Die Lebendkeimzahl adhärenter Zellen sank stetig. Nach 4 Tagen konnte *S. mitis* nicht mehr kultiviert werden. Der pH-Wert der *S. mitis* Monokultur lag im sauren Bereich und war zudem niedriger als in CDM/Saccharose.

S. salivarius war in diesem Medium ebenfalls nicht in der Lage, mehrschichtige Biofilmstrukturen zu etablieren. Jedoch konnte das Bakterium einen einschichtigen Zellrasen auf der Oberfläche der verwendeten Deckgläschen bilden, was mittels Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie bestätigt wurde. Die Lebendkeimzahl sank schnell, bis hin zur fehlenden Kultivierbarkeit nach 4 Tagen.

Der pH-Wert für *S. salivarius* war, entgegen dem für *S. mitis*, in künstlichem Speichel/Galaktose etwas höher als in CDM/Saccharose.

3.4.1 Ko-Kultivierung von *Streptococcus mitis* mit *Porphyromonas gingivalis* W83 bzw. W50

Die Zwei-Spezies Kombination wurde mit beiden *P. gingivalis* Stämmen durchgeführt, wird aber wegen der ähnlichen Ergebnisse exemplarisch nur für die Kombination *S. mitis* / *P. gingivalis* W83 vorgestellt.

Nach Anfärbung der Ko-Kultur mittels Safranin fand sich unter den gewählten Bedingungen keine Biofilm (Abbildung 19A). Die wenigen, an der Oberfläche adhärierenden Zellen von *P. gingivalis* nahmen dagegen in Anwesenheit von *S. mitis* noch ab, was auch durch fluoreszenzmikroskopische Analysen bestätigt wurde (Abbildung 19B). Die Ermittlung der Lebendkeimzahl ergab, dass *P. gingivalis* W83 bereits nach 24 Stunden Inkubation in Anwesenheit von *S. mitis* nicht mehr kultivierbar war. Für *S. mitis* konnten ab Tag 4 der Inkubation keine Kolonie-bildenden Einheiten mehr detektiert werden, ähnlich wie für dessen Monokultur. Allerdings waren die ermittelten Keimzahlen in der Di-Spezies Kombination niedriger.

Der pH-Wert der Ko-Kultur lag, wie für die *S. mitis* Monokultur, im sauren Bereich. Im Vergleich dazu blieb der pH-Wert der *P. gingivalis* Monokultur stabil (Abbildung 19C).

Abbildung 19A)

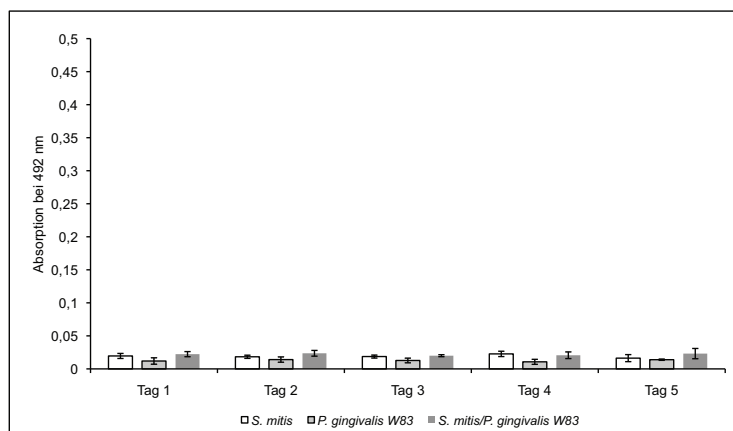


Abbildung 19B)

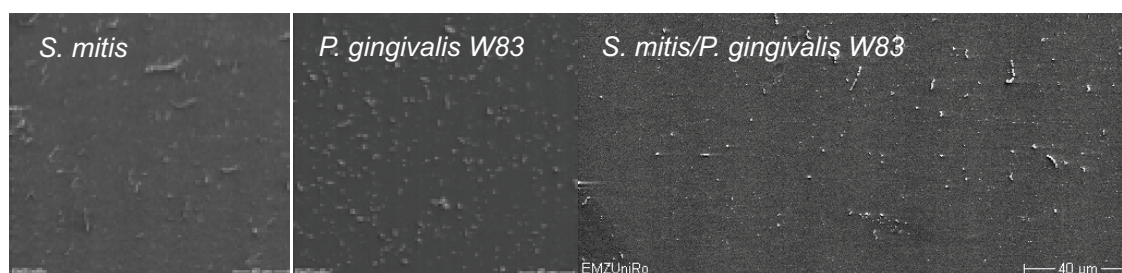


Abbildung 19C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. mitis</i>	2,24E+05	6,69E+03	7,08E+02	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mitis</i> (<i>P. gingivalis</i> W83)	3,67E+04	5,00E+01	3,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>P. gingivalis</i> W83	6,08E+06	9,22E+06	2,64E+07	1,21E+05	4,78E+04
<i>P. gingivalis</i> W83 (<i>S. mitis</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
pH					
<i>S. mitis</i>	4,45	4,51	4,55	4,6	4,56
<i>P. gingivalis</i> W83	6,79	6,87	6,88	6,79	6,83
<i>S. mitis/P. gingivalis</i> W83	4,42	4,44	4,52	4,42	4,4

Abbildung 19: Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit *P. gingivalis* W83 in künstlichem Speichel/Galaktose. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. **B)** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des *S. mitis* und *P. gingivalis* Mono- und des *S. mitis* / *P. gingivalis* Mischbiofilms. Vergrößerung 500x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. **C)** Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.4.2 Ko-Kultivierung von *Streptococcus mitis* mit *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586

Die Kombination von *F. nucleatum* mit *S. mitis* zeigte unter den gewählten Bedingungen ebenfalls keine Biofilmbildung (Abbildung 20A). Obwohl *F. nucleatum* in künstlichem Speichel/Galaktose gut an Oberflächen band, konnten in Anwesenheit von *S. mitis* sowohl rasterelektronenmikroskopisch

(Abbildung 20B) als auch fluoreszenzmikroskopisch kaum noch Zellen von *F. nucleatum* nachgewiesen werden. Die mikroskopische Inspektion der Lebend/Tot-gefärbten Kombinationspartner zeigte, dass die wenigen Zellen von *F. nucleatum*, aber auch ein Großteil adhärenter *S. mitis*-Zellen nicht mehr lebten. Die Bestimmung der Lebendkeimzahl ergab, dass weniger Zellen von *S. mitis* in Anwesenheit von *F. nucleatum* vorlagen. *F. nucleatum* konnte dagegen gar nicht mehr kultiviert werden.

Die pH-Werte der Mischkulturüberstände lagen im sauren Bereich, ähnlich der *S. mitis* Monokultur. Der pH-Wert der *F. nucleatum* Monokultur blieb hingegen vergleichsweise konstant (Abbildung 20C).

Abbildung 20A)

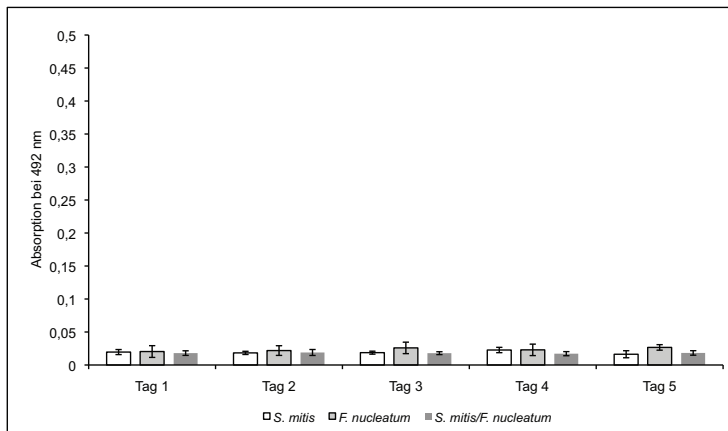


Abbildung 20B)

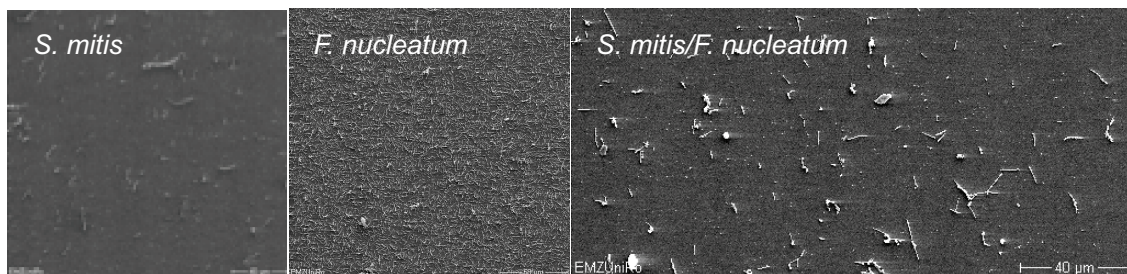


Abbildung 20C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. mitis</i>	2,24E+05	6,69E+03	7,08E+02	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mitis (F. nucleatum)</i>	1,44E+05	3,52E+02	1,35E+02	0,00E+00	0,00E+00
<i>F. nucleatum</i>	2,48E+07	4,63E+07	3,20E+07	3,81E+07	2,73E+07
<i>F. nucleatum (S. mitis)</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
pH					
<i>S. mitis</i>	4,45	4,51	4,55	4,6	4,56
<i>F. nucleatum</i>	6,76	6,78	6,85	6,65	6,7
<i>S. mitis/F. nucleatum</i>	4,37	4,39	4,51	4,42	4,46

Abbildung 20: Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit *F. nucleatum*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des *S. mitis* und *F. nucleatum* Mono- und des *S. mitis* / *F. nucleatum* Mischbiofilms. Vergrößerung 500x,

Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.4.3 Ko-Kultivierung von *Streptococcus mitis* mit *Parvimonas micra*

Die Analyse der Zwei-Spezies Kombination von *S. mitis* mit *P. micra* mittels Safranin-Färbung ergab, dass keine Biofilmbildung, jedoch eine leicht erhöhte Adhärenz beider Mikroorganismen unter den gewählten Bedingungen vorlag (Abbildung 21A).

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse zeigte, dass in der Kombination beide Bakterien auf der Oberfläche gebunden vorlagen, wobei keine offensichtliche Zunahme an Zellen ausgemacht werden konnte. Dieses Ergebnis wurde auch durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse nach Lebend/Tot-Färbung bestätigt. Hier konnte jedoch ein im Vergleich zur Monokultur deutlich erhöhter Anteil toter Zellen von *P. micra* beobachtet werden (Abbildung 21B).

Bei *S. mitis* wurden schon in der Monokultur sowohl lebende als auch tote Zellen detektiert. Die Lebendkeimzählung für beide Organismen ergab keine offensichtliche Änderung der Kultivierbarkeit von *S. mitis*, während die Keimzahlen für *P. micra* im Vergleich zur Monokultur stark reduziert waren. Ab Tag 4 der Inkubation konnten keine kultivierbaren *P. micra* Zellen ermittelt werden.

Der pH-Wert der Ko-Kultur entsprach dem der *S. mitis* Monokultur und war demnach deutlich saurer als der pH-Wert der *P. micra* Monokultur (Abbildung 21C).

Abbildung 21A)

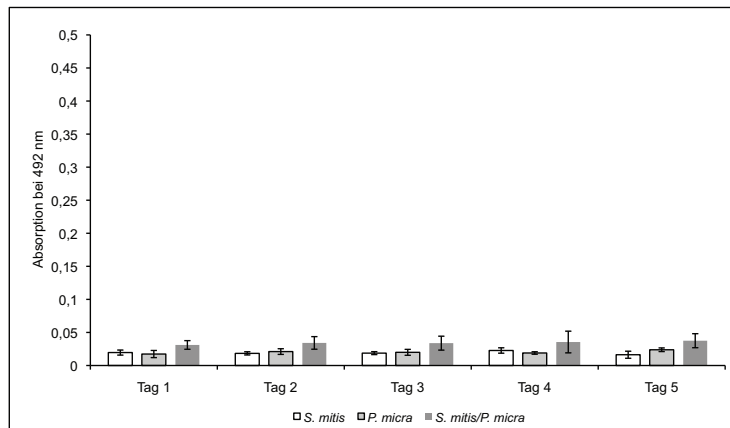


Abbildung 21B)

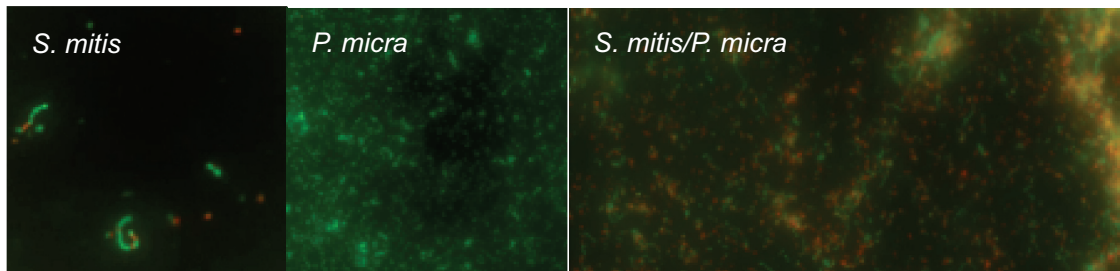


Abbildung 21C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. mitis</i>	2,24E+05	6,69E+03	7,08E+02	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mitis</i> (<i>P. micra</i>)	1,60E+05	3,15E+03	1,00E+02	0,00E+00	0,00E+00
<i>P. micra</i>	3,65E+06	4,34E+06	5,45E+06	2,68E+06	2,20E+06
<i>P. micra</i> (<i>S. mitis</i>)	2,00E+02	2,00E+02	1,93E+02	0,00E+00	0,00E+00
pH					
<i>S. mitis</i>	4,45	4,51	4,55	4,6	4,56
<i>P. micra</i>	6,64	6,72	6,76	6,58	6,7
<i>S. mitis</i> / <i>P. micra</i>	4,4	4,44	4,55	4,47	4,53

Abbildung 21: Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit *P. micra*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Biofilmstruktur des *S. mitis* und *P. micra* Mono- und des *S. mitis* / *P. micra* Mischbiofilms. Vergrößerung 400x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.4.4 Ko-Kultivierung von *Streptococcus salivarius* mit *Porphyromonas gingivalis* W83 bzw. W50

Die Versuche zur Zwei-Spezies Kultivierung von *S. salivarius* mit *P. gingivalis* erfolgten sowohl mit *P. gingivalis* W50 als auch mit *P. gingivalis* W83. Im Folgenden soll jedoch exemplarisch nur auf die Ergebnisse der Kombination *S. salivarius* / *P. gingivalis* W50 eingegangen werden.

Im Gegensatz zu den Mono-Spezies Kulturen beider Mikroorganismen zeigte deren Kombination unter den gewählten Bedingungen eine gute Biofilmbildung (Abbildung 22A). Fluoreszenz- aber auch rasterelektronenmikroskopische Analysen ergaben, dass *S. salivarius* dominant auf der Oberfläche gebunden vorlag und durch die Anwesenheit von *P. gingivalis* zur Biofilmbildung befähigt wurde.

Mikroskopisch konnten im Biofilm lebende und tote *S. salivarius* Zellen beobachtet werden (Abbildung 22B1). Zellen von *P. gingivalis* konnten innerhalb dieser Biofilmstrukturen nur in geringer Zahl mit dem Rasterelektronenmikroskop detektiert und identifiziert werden (Abbildung 22B2). *P. gingivalis* war in dieser Kombination nicht mehr kultivierbar, während *S. salivarius* in seiner Kultivierbarkeit keine offensichtlichen Unterschiede zur Monokultur zeigte. Der pH-Wert der Ko-Kultur lag, wie für die *S. salivarius* Monokultur, im sauren Bereich. Im Vergleich dazu war der pH-Wert der *P. gingivalis* Monokultur im neutralen Bereich, und blieb über den Untersuchungszeitraum relativ konstant (Abbildung 22C).

Abbildung 22A)

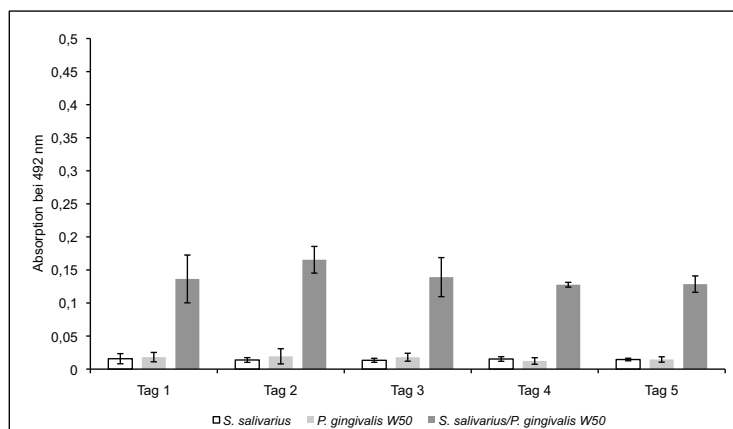


Abbildung 22B1)

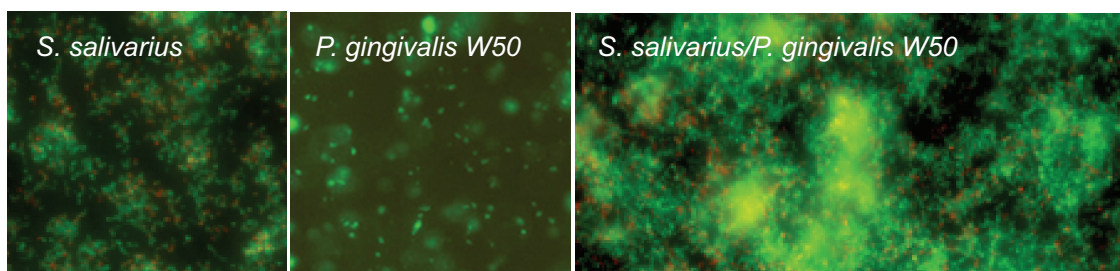
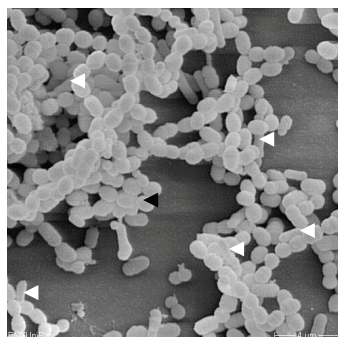


Abbildung 22B2)



S. salivarius, schwarzer Pfeil

P. gingivalis W50, weißer Pfeil

Abbildung 22C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. salivarius</i>	2,02E+06	4,96E+02	6,90E+01	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. salivarius</i> (<i>P. gingivalis</i> W50)	1,43E+06	3,83E+02	1,18E+02	0,00E+00	0,00E+00
<i>P. gingivalis</i> W50	1,60E+07	8,55E+06	3,27E+06	1,24E+04	5,28E+03
<i>P. gingivalis</i> W50 (<i>S. salivarius</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
pH					
<i>S. salivarius</i>	4,66	4,7	4,75	4,72	4,805
<i>P. gingivalis</i> W50	6,74	6,68	6,56	6,6	6,45
<i>S. salivarius/P. gingivalis</i> W50	4,61	4,64	4,68	4,7	4,72

Abbildung 22: Ko-Kultivierung von *S. salivarius* mit *P. gingivalis* W50. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B1) Fluoreszenzmikroskopische Analysen des *S. salivarius* und *P. gingivalis* Mono- und des

S. salivarius / *P. gingivalis* Mischbiofilms. Vergrößerung 400x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. B2) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des *S. salivarius* / *P. gingivalis* Mischbiofilms. Kennzeichnung von *S. salivarius* (schwarze Pfeilspitze) bzw. *P. gingivalis* (weiße Pfeilspitze), Vergrößerung 3000x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.4.5 Ko-Kultivierung von *Streptococcus salivarius* mit *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586

Für die Kombination von *S. salivarius* mit *F. nucleatum* konnte keine Biofilmbildung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Safranin-Analysen zeigten gegenüber den Monokulturen kaum eine Änderung (Abbildung 23A). Sowohl rasterelektronenmikroskopische als auch fluoreszenzmikroskopische Analysen ergaben, dass nur noch vereinzelt *F. nucleatum* Zellen in Anwesenheit von *S. salivarius* vorhanden waren. *S. salivarius* konnte als das dominante Bakterium auf der Oberfläche bestimmt werden. Die wenigen verbliebenen *F. nucleatum* Zellen waren in dieser Kombination abgestorben, während für *S. salivarius* sowohl tote als auch lebende Zellen detektiert wurden. Es gab jedoch keine offensichtlichen Unterschiede in der Menge toter/lebender Zellen im Vergleich zur *S. salivarius* Monokultur (Abbildung 23B). In der Lebendkeimzählung war *F. nucleatum* aus der Mischkultur nicht mehr kultivierbar. Die Anzahl der *S. salivarius* Zellen nahm dagegen, verglichen mit der Monokultur, am Tag 2 und 3 der Inkubation zu, um danach plötzlich auf 0 abzufallen.

Der pH-Wert der Mischkultur-Überstände lag, wie für die *S. salivarius* Monokultur, im sauren Bereich. Die Monokultur von *F. nucleatum* wies dagegen einen pH-Wert im neutralen Bereich auf (Abbildung 23C).

Abbildung 23A)

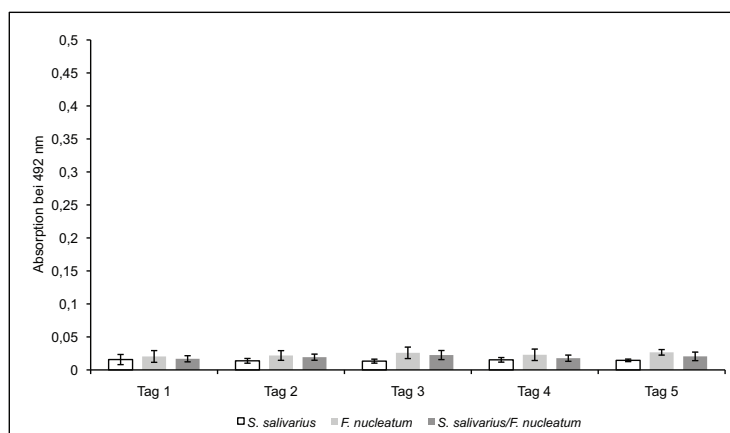


Abbildung 23B)

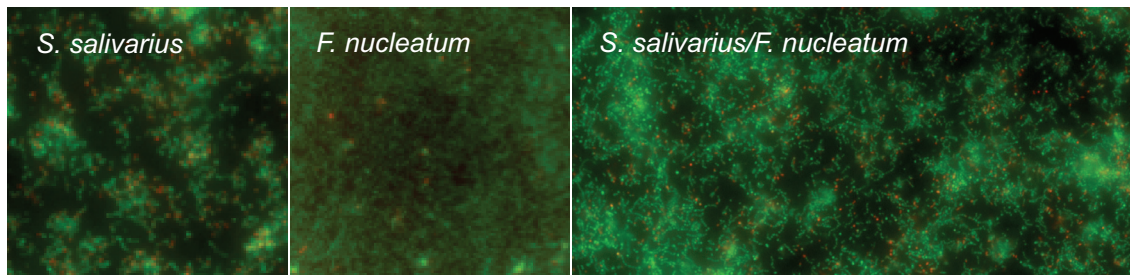


Abbildung 23C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
<i>S. salivarius</i>	2,02E+06	4,96E+02	6,90E+01	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. salivarius</i> (<i>F. nucleatum</i>)	4,07E+06	1,41E+05	2,64E+04	0,00E+00	0,00E+00
<i>F. nucleatum</i>	2,48E+07	4,63E+07	3,20E+07	3,81E+07	2,73E+07
<i>F. nucleatum</i> (<i>S. salivarius</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
pH					
<i>S. salivarius</i>	4,66	4,7	4,75	4,72	4,805
<i>F. nucleatum</i>	6,76	6,78	6,85	6,65	6,7
<i>S. salivarius</i> / <i>F. nucleatum</i>	4,66	4,65	4,73	4,56	4,78

Abbildung 23: Ko-Kultivierung von *S. salivarius* mit *F. nucleatum*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des *S. salivarius* und *F. nucleatum* Mono- und des *S. salivarius* / *F. nucleatum* Mischbiofilms. Vergrößerung 400x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.4.6 Ko-Kultivierung von *Streptococcus salivarius* mit *Parvimonas micra*

Wie bereits für die Kombination mit *F. nucleatum* beobachtet, bewirkte die Kombination von *S. salivarius* mit *P. micra* ebenfalls keine Biofilmbildung unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 24A).

Rasterelektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass hauptsächlich *S. salivarius* auf der Oberfläche gebunden vorlag. Nur wenige adhärente Zellen von *P. micra* konnten dazwischen detektiert werden (Abbildung 24B). Die Analyse der Bakterien auf der Deckglasoberfläche mit dem Fluoreszenzmikroskop nach Lebend/Tot-Färbung zeigte, dass bereits nach Tag 1 der Inkubation hauptsächlich tote *P. micra* Zellen vorlagen. Für *S. salivarius* konnten ähnlich zur Monokultur sowohl tote als auch lebende Zellen beobachtet werden. Die Lebendkeimzählung wies im Gegensatz zur Monokultur nur wenige *P. micra* Kolonien am Tag 1 und 2 der Inkubation nach. *S. salivarius* war in seiner Kultivierbarkeit dagegen nur dahingehend beeinflusst, dass in der Kombination die Zellen einen Tag früher nicht mehr detektiert wurden.

Die Messung des pH-Wertes zeigte, dass auch in dieser Kombination der saure Bereich erreicht wurde, wiederum ähnlich wie in der *S. salivarius* Monokultur. Für *P. micra* war der pH-Wert in Monokultur, wie bereits für *P. gingivalis* und *F. nucleatum* beobachtet, im neutralen Bereich (Abbildung 24C).

Abbildung 24A)

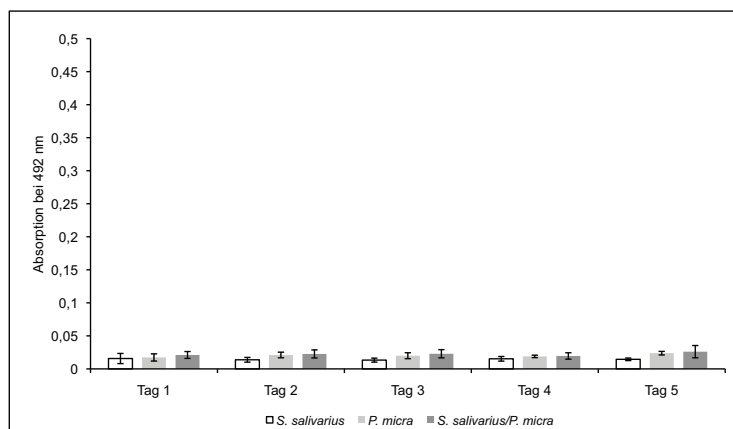


Abbildung 24B)

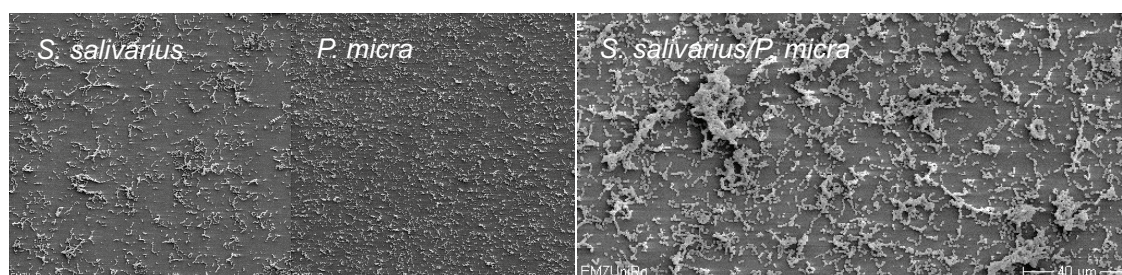


Abbildung 24C)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
S. salivarius	2,02E+06	4,96E+02	6,90E+01	0,00E+00	0,00E+00
S. salivarius (P. micra)	3,03E+06	2,38E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
P. micra	3,65E+06	4,34E+06	5,45E+06	2,68E+06	2,20E+06
P. micra (S. salivarius)	2,50E+02	5,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
pH					
S. salivarius	4,66	4,7	4,75	4,72	4,805
P. micra	6,64	6,72	6,76	6,58	6,7
S. salivarius/P. micra	4,64	4,66	4,63	4,7	4,82

Abbildung 24: Ko-Kultivierung von *S. salivarius* mit *P. micra*. A) Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kultur. B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des *S. salivarius* und *P. micra* Mono- und *S. salivarius* / *P. micra* Mischbiofilms. Vergrößerung 500x, Aufnahmen exemplarisch für Tag 1. C) Lebendkeimzahlen (KBE/ml) der Biofilmbakterien nach Entfernen der planktonischen Bakterien und Suspension der Biofilmbakterien in PBS und pH-Werte der Kulturüberstände beider Bakterien in Mono- und Di-Spezies-Kultur.

3.5 Funktionelle Charakterisierung von Zwei-Spezies Kombinationen

Im Folgenden wurde die funktionelle Basis der Beeinflussung der Biofilmbildung durch Anwesenheit eines zweiten Bakteriums untersucht. Dazu gehörten der Nachweis von sezernierten Faktoren sowie einer möglichen sterischen Konkurrenz.

3.5.1 Untersuchungen zur Bakteriozin-Produktion

Die Bakteriozin-Produktion ist ein weit verbreitetes Phänomen der Bakterien. Bakteriozine sind proteinogene Substanzen, die von Bakterienstämmen produziert werden (z. B. Colicine [Colibakterien], Mutacine [*S. mutans*], Nisin A [*Lactococcus lactis*], Duramycin [*Streptomyces*]) und das Wachstum anderer Stämme derselben oder ähnlicher Bakterienarten inhibieren (Reeves, 1965; Hamada und Ooshima, 1975; Tagg *et al.*, 1976; Joerger, 2003; Iwatani *et al.*, 2007). In dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, inwiefern die hier untersuchten Bakterien in der Lage sind Bakteriozine zu produzieren und damit andere Stämme in ihrem Wachstum zu hemmen. Dafür wurden wiederum die Kombination *S. mitis* bzw. *S. salivarius* mit den anderen oralen Bakterien untersucht.

Die Untersuchungen zeigten, dass *S. sanguinis*, *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans*, *S. intermedius*, *P. gingivalis* und *P. micra* durch *S. salivarius* in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Umgekehrt lag keine hemmende Wirkung dieser Stämme auf das Wachstum von *S. salivarius* vor. *S. mitis* hatte keinen hemmenden Effekt auf das Wachstum der getesteten Bakterienstämme, wurde jedoch selbst in seinem Wachstum durch *S. mutans* gehemmt. In der nachfolgenden Abbildung 25 sind die Ergebnisse einer orientierenden Untersuchung der Wachstumshemmung dargestellt.

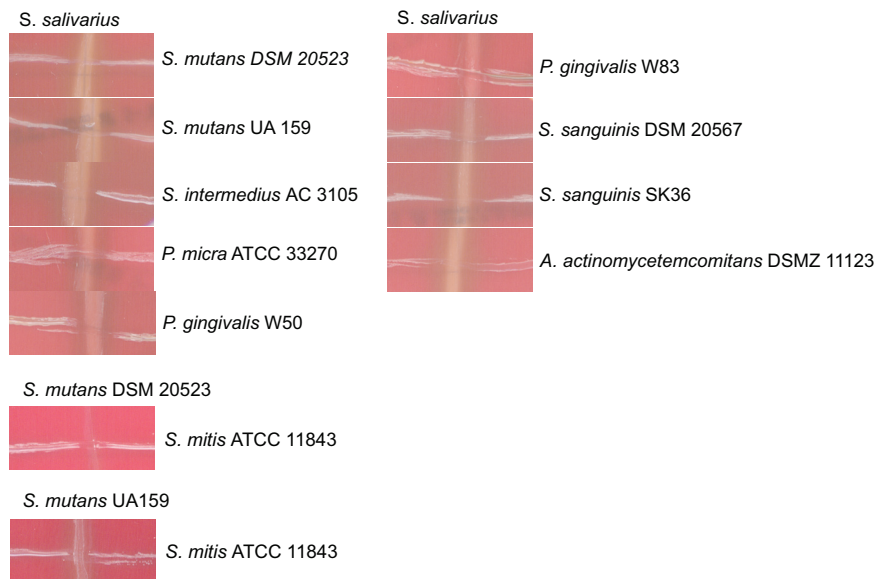


Abbildung 25: Ergebnisse des Bakteriozin-Tests. Dargestellt sind die Bakterienkombinationen, bei denen eine Hemmung des Wachstums erfolgte.

3.5.2 Einfluss verschiedener Animpfstrategien auf die Di-Spezies Biofilmbildung

Um zu überprüfen, inwiefern die Erstbesiedlung einer Oberfläche einen Einfluss auf die Adhärenz und Biofilmbildung einer zweiten Spezies hat, wurde eine sukzessive Animpfstrategie etabliert (siehe 2.16, Abbildung 3). Diese ermöglichte die Aussage, ob es sich bei den getesteten Bakterien um Erst- oder Zweit-Kolonisierer einer Oberfläche handelt. Als feste Kombinationspartner wurden wiederum

S. mitis oder *S. salivarius* eingesetzt. Die Experimente erfolgten je nach Spezies-Kombination in CDM/Saccharose (Kombination von *S. mitis* oder *S. salivarius* mit den fakultativ aeroben Bakterien) oder künstlichem Speichel/Galaktose (Kombination von *S. mitis* oder *S. salivarius* mit den obligat anaeroben Bakterien).

3.5.2.1 Sukzessive Inokulation mit *S. mitis*

Obleich *S. mitis* nicht in der Lage war, einen Biofilm auf den gewählten Oberflächen zu bilden, konnte dieses Bakterium zumindest an die Oberfläche binden.

Die Erst-Kolonisation von *S. mitis* in 24- oder 96-Well-Platten offenbarte einen zumeist inhibitorischen Effekt von *S. mitis* auf die Adhärenz und Biofilmbildung der anschließend inokulierten Bakterien. Dies konnte sowohl mittels Safranin-Färbung als auch Mikroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 26, exemplarisch für Tag 1 der Ko-Inkubation).

Abbildung 26A) Sukzessive Inokulation von *S. mutans* zu *S. mitis*

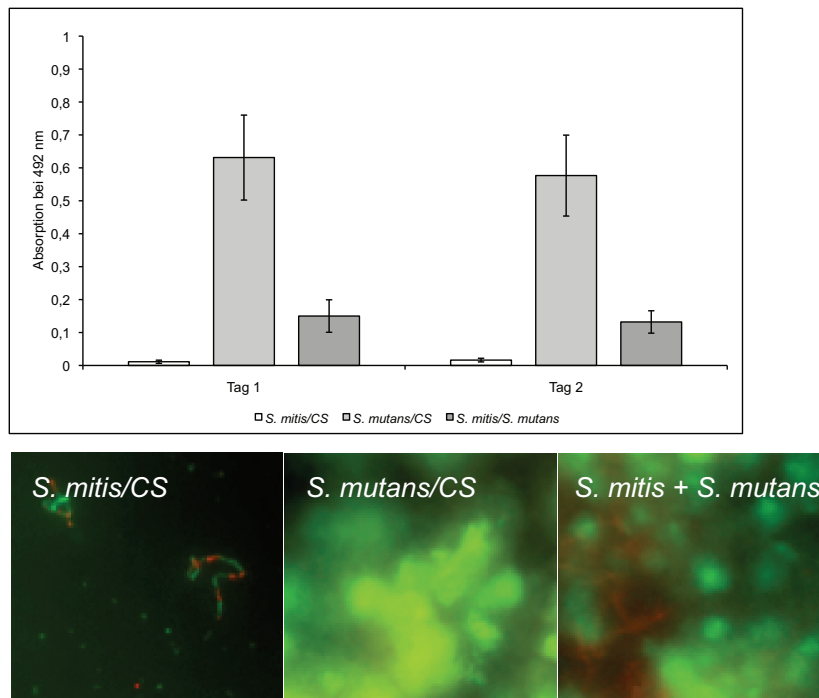


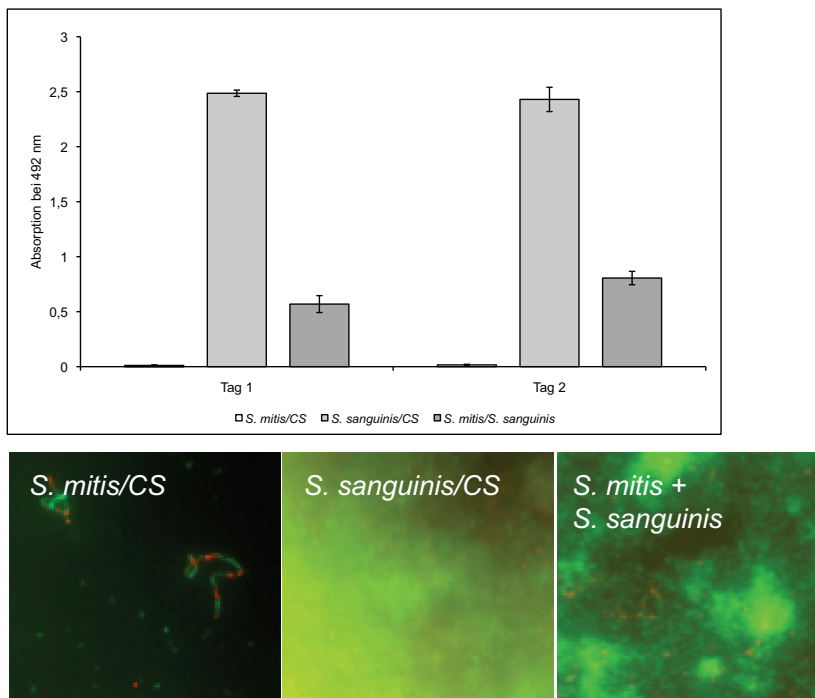
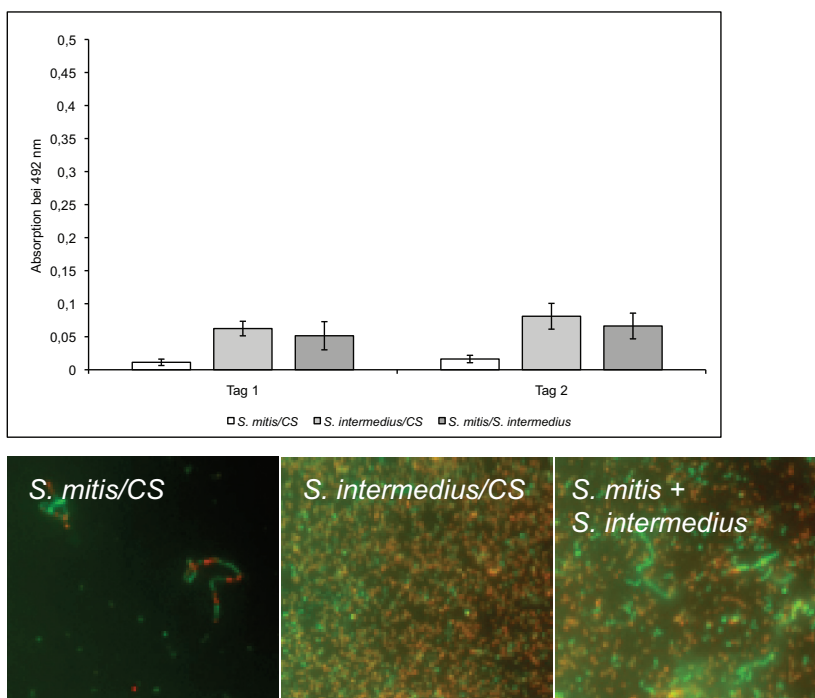
Abbildung 26B) Sukzessive Inokulation von *S. sanguinis* zu *S. mitis*Abbildung 26C) Sukzessive Inokulation von *S. intermedius* zu *S. mitis*

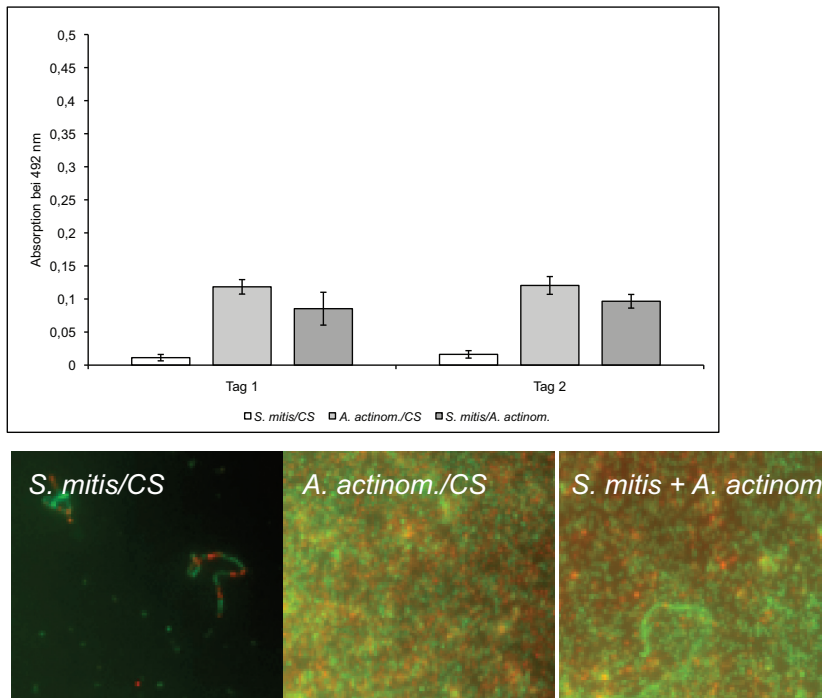
Abbildung 26D) Sukzessive Inokulation von *A. actinomycetemcomitans* zu *S. mitis*

Abbildung 26A-D: Ergebnisse des sukzessiven Animpfens von *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans* zu *S. mitis*. Dargestellt sind die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung nach 1 und 2 Tagen des um 24 Stunden versetzten Animpfens zum zuerst inokulierten *S. mitis*, sowie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am Tag 1 nach sukzessiver Inokulation. Vergrößerung 400x. *A. actinom.* - *A. actinomycetemcomitans*, CS – CDM/Saccharose.

Es konnte beobachtet werden, dass besonders die Biofilmbildung von *S. mutans* und *S. sanguinis* durch das zeitversetzte Animpfen zu *S. mitis* vermindert war. Die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse untermauerten die Ergebnisse der Safranin-Färbung.

Das sukzessive Inokulieren von *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans* zu adhärennten *S. mitis* Zellen deutete ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von *S. mitis* an.

Die Lebendkeimzählung ergab für *S. mutans* und *S. intermedius* trotz reduzierter Biofilm-Masse ähnlich viele KBE wie für die Monokultur. Die *S. sanguinis* Keimzahl war leicht reduziert, während *A. actinomycetemcomitans* nicht mehr kultivierbar war. *S. mitis* wurde durch Zugabe aller Kombinationspartner in seiner Kultivierbarkeit beeinträchtigt. Das sukzessive Animpfen mit *S. mutans* als Kombinationspartner resultierte in der Nicht-Kultivierbarkeit von *S. mitis*. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Lebendkeimzahlen der Bakterien bei sukzessivem Animpfen zu *S. mitis* adhärennten Zellen im Vergleich zur jeweiligen Monokultur. Das an erster Stelle stehende Bakterium in einer Kombination wurde als Erst-Kolonisierer eingesetzt (i.d.F. *S. mitis*), das an zweiter Stelle stehende Bakterium nach 24 Stunden zugeimpft. Die Keimzahl ist immer für das nicht in Klammern geschriebene Bakterium angegeben. *A. actinom.* - *A. actinomycetemcomitans*, CS – CDM/Saccharose.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2
<i>S. mitis</i> /CS	1,02E+07	1,35E+05
<i>S. mutans</i> /CS	2,86E+07	1,90E+07
<i>S. mitis</i> /(<i>S. mutans</i>)	0,00E+00	0,00E+00
(<i>S. mitis</i>)/ <i>S. mutans</i>	3,58E+07	3,67E+07
<i>S. sanguinis</i> /CS	1,26E+08	3,35E+06
<i>S. mitis</i> /(<i>S. sanguinis</i>)	1,37E+06	2,55E+04
(<i>S. mitis</i>)/ <i>S. sanguinis</i>	5,64E+07	7,53E+05
<i>S. intermedius</i> /CS	2,86E+07	1,10E+05
<i>S. mitis</i> /(<i>S. intermedius</i>)	5,68E+05	2,60E+05
(<i>S. mitis</i>)/ <i>S. intermedius</i>	6,55E+06	1,32E+06
<i>A. actinom.</i> /CS	4,21E+07	3,83E+06
<i>S. mitis</i> /(<i>A. actinom.</i>)	1,41E+06	1,15E+05
(<i>S. mitis</i>)/ <i>A. actinom.</i>	0,00E+00	0,00E+00

Die umgekehrte Reihenfolge der vorgestellten Animpfstrategie, also die Inokulation von *S. mitis* als Zweit-Kolonisierer zu *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* oder *A. actinomycetemcomitans* ergab, dass nur eine leichte Reduzierung der Biofilm-Masse von *S. mutans* und *S. sanguinis* im Vergleich mit den Monokulturen vorlag. Für das versetzte Animpfen von *S. mitis* zu *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans* konnte ebenfalls ein reduzierender Effekt auf die Biofilm-Masse beobachtet werden. Die Abbildung 27 zeigt wiederum die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung und fluoreszenzmikroskopischer Analyse für das sukzessive Animpfen von *S. mitis* als Zweit-Kolonisierer.

Abbildung 27A) Sukzessive Inokulation von *S. mitis* zu *S. mutans*

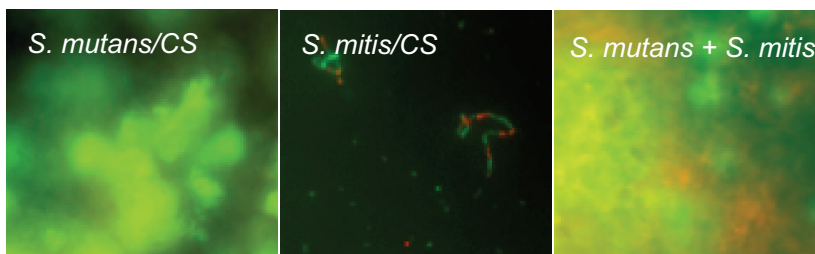
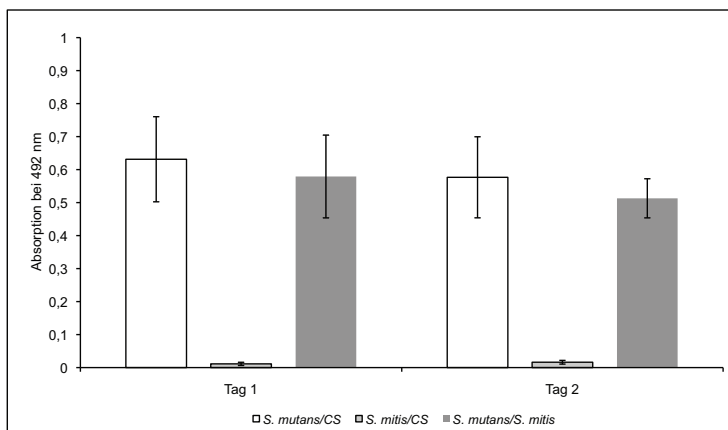


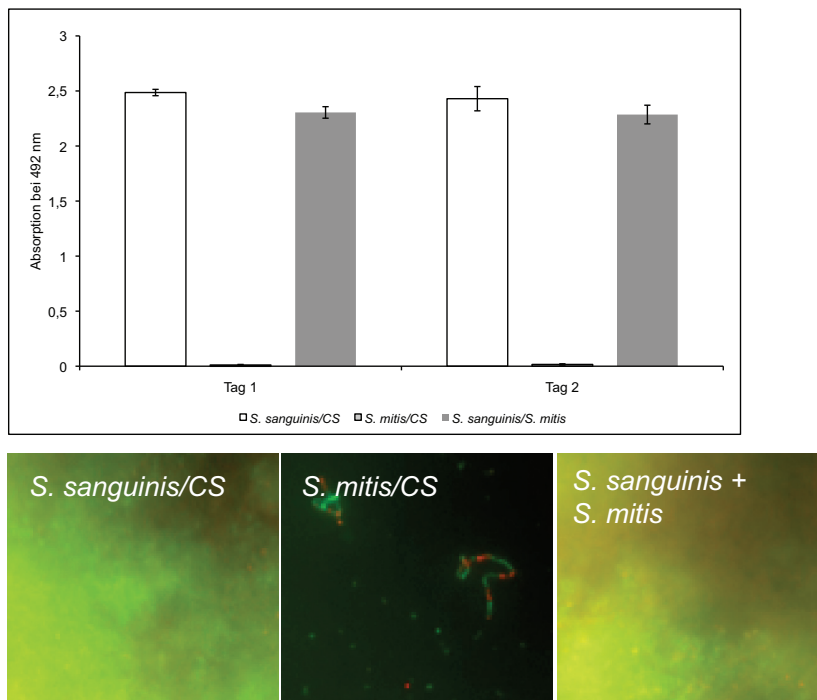
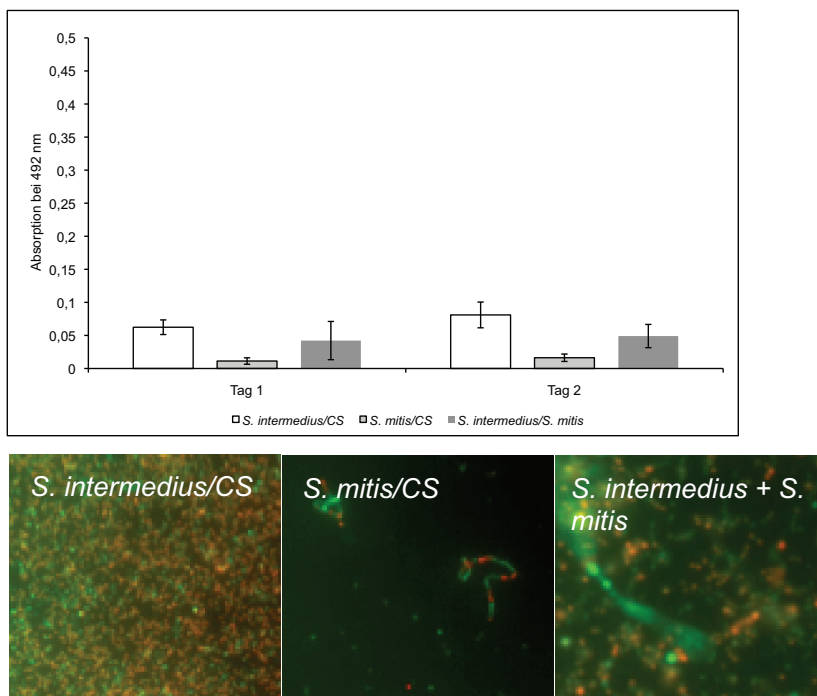
Abbildung 27B) Sukzessive Inokulation von *S. mitis* zu *S. sanguinis*Abbildung 27C) Sukzessive Inokulation von *S. mitis* zu *S. intermedius*

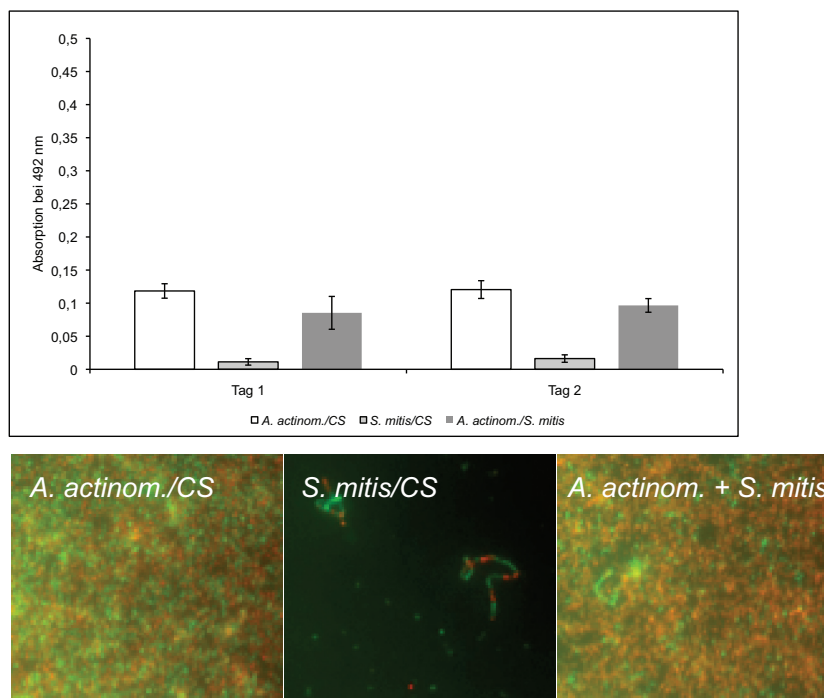
Abbildung 27D) Sukzessive Inokulation von *S. mitis* zu *A. actinomycetemcomitans*

Abbildung 27A-D: Ergebnisse des sukzessiven Animpfens von *S. mitis* zu *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans*. Dargestellt sind die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung nach 1 und 2 Tagen des um 24 Stunden versetzten Animpfens von *S. mitis* zu *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans*, sowie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am Tag 1 nach sukzessiver Inokulation. Vergrößerung 400x. *A. actinom.* - *A. actinomycetemcomitans*, CS – CDM/Saccharose.

Die Lebendkeimzählung für diese Reihenfolge der Inokulation ergab eine unveränderte Kultivierbarkeit von *S. mutans*. Dagegen wurden für die anderen drei Spezies geringere Keimzahlen ermittelt als für deren Mono-Spezies Kulturen. *S. mitis* wurde ebenfalls durch alle Kombinationspartner in seiner Kultivierbarkeit negativ beeinflusst. In Kombination mit *S. mutans* konnten wiederum keine KBE mehr ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Lebendkeimzahlen von *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans* nach sukzessivem Animpfen von *S. mitis* im Vergleich zur jeweiligen Monokultur. Das an erster Stelle stehende Bakterium in einer Kombination wurde als Erst-Kolonisierer eingesetzt, das an zweiter Stelle stehende Bakterium nach 24 Stunden zugeimpft. Die Keimzahl ist immer für das nicht in Klammern geschriebene Bakterium angegeben. *A. actinom.* – *A. actinomycetemcomitans*, CS – CDM/Saccharose.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2
<i>S. mitis</i> /CS	1,02E+07	1,35E+05
<i>S. mutans</i> /CS	2,86E+07	1,90E+07
<i>S. mutans</i> /(<i>S. mitis</i>)	8,46E+07	2,86E+07
(<i>S. mutans</i>)/ <i>S. mitis</i>	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. sanguinis</i> /CS	1,26E+08	3,35E+06
<i>S. sanguinis</i> /(<i>S. mitis</i>)	8,61E+07	2,53E+06
(<i>S. sanguinis</i>)/ <i>S. mitis</i>	1,62E+06	5,63E+04
<i>S. intermedius</i> /CS	2,86E+07	1,10E+05
<i>S. intermedius</i> /(<i>S. mitis</i>)	1,59E+06	0,00E+00
(<i>S. intermedius</i>)/ <i>S. mitis</i>	2,13E+05	0,00E+00
<i>A. actinom.</i> /CS	4,21E+07	3,83E+06
<i>A. actinom.</i> /(<i>S. mitis</i>)	2,00E+04	0,00E+00
(<i>A. actinom.</i>)/ <i>S. mitis</i>	5,10E+04	1,63E+04

Für Kombinationen von *S. mitis* mit den obligat anaeroben Bakterienspezies konnte auch für diese Inokulationsstrategie wie bereits für das simultane Animpfen der Ko-Kulturen keine Biofilm-Masse mittels Safranin-Färbung nachgewiesen werden. Infolge dessen erübrigt sich an dieser Stelle die Darstellung der Lebendkeimzählungen und der fluoreszenzmikroskopischen Analysen.

3.5.2.2 Sukzessive Inokulation mit *S. salivarius*

Das simultane Animpfen von *S. salivarius* mit den fakultativ aeroben Bakterien hatte gezeigt, dass *S. salivarius* einen negativen Einfluss auf die *S. sanguinis* Biofilmbildung hatte. Andererseits konnte mit *S. mutans* und im geringeren Maß auch mit *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans* ein leichter Anstieg der Biofilm-Masse detektiert werden.

Das zeitversetzte Animpfen von *S. mutans* oder *S. sanguinis* zu *S. salivarius* ergab eine Reduzierung der Biofilm-Masse verglichen mit den *S. mutans* bzw. *S. sanguinis* Monokulturen. Für die sukzessive Inokulation von *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans* zu *S. salivarius* Biofilm-Strukturen konnte dagegen, verglichen mit deren beiden Monokulturen, ein Anstieg der Biofilm-Masse ermittelt werden. Verglichen mit der *S. salivarius* Monokultur war die Biofilm-Masse jedoch etwas geringer. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen ergaben, dass *S. salivarius*, abgesehen von der Kombination mit *S. mutans*, das dominante Bakterium auf der Oberfläche darstellte.

In Abbildung 28 ist das Resultat der Safranin-Färbung und der fluoreszenzmikroskopischen Analyse des Animpfens von *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans* zu *S. salivarius* Biofilmen 1 und 2 Tage nach dem um 24 Stunden versetzten Animpfen dargestellt.

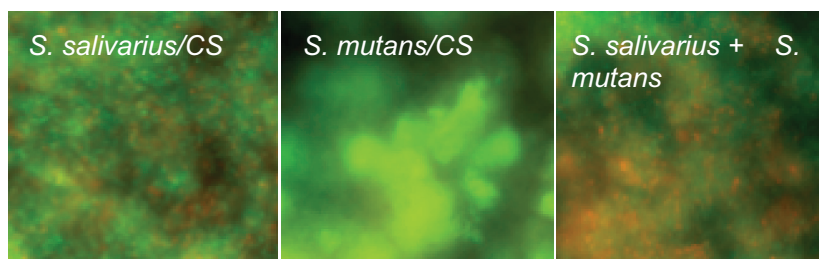
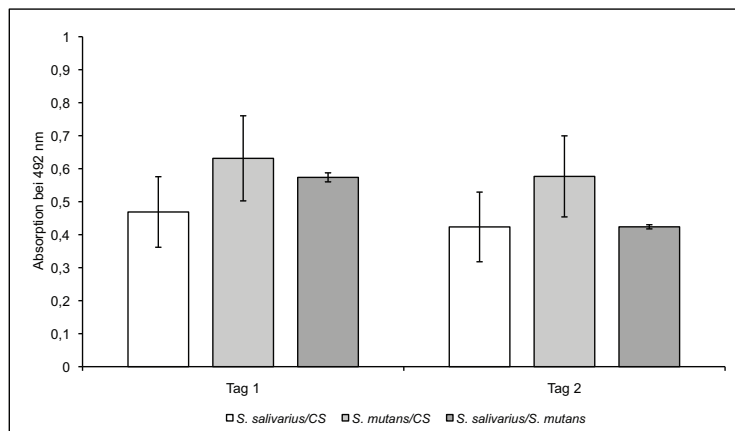
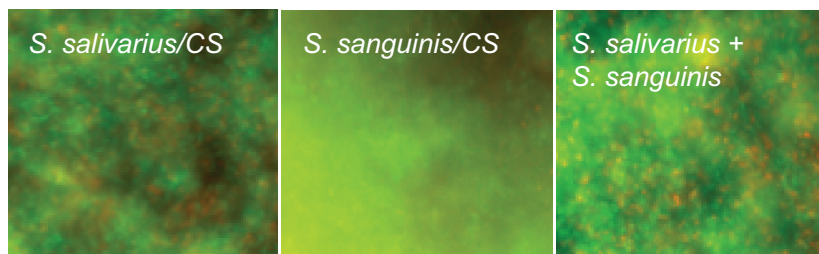
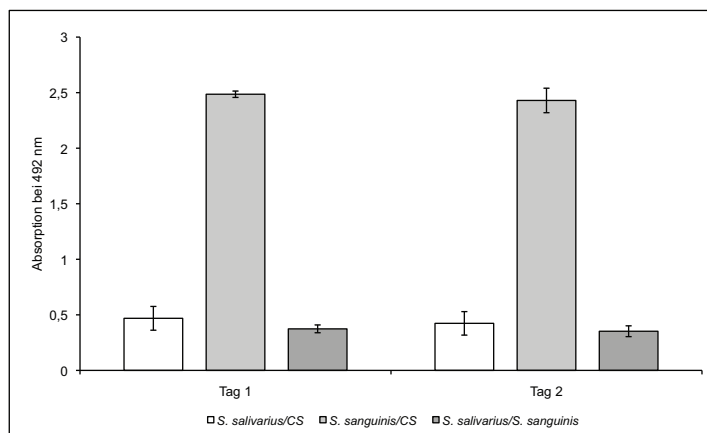
Abbildung 28A) Sukzessive Inokulation von *S. mutans* zu *S. salivarius*Abbildung 28B) Sukzessive Inokulation von *S. sanguinis* zu *S. salivarius*

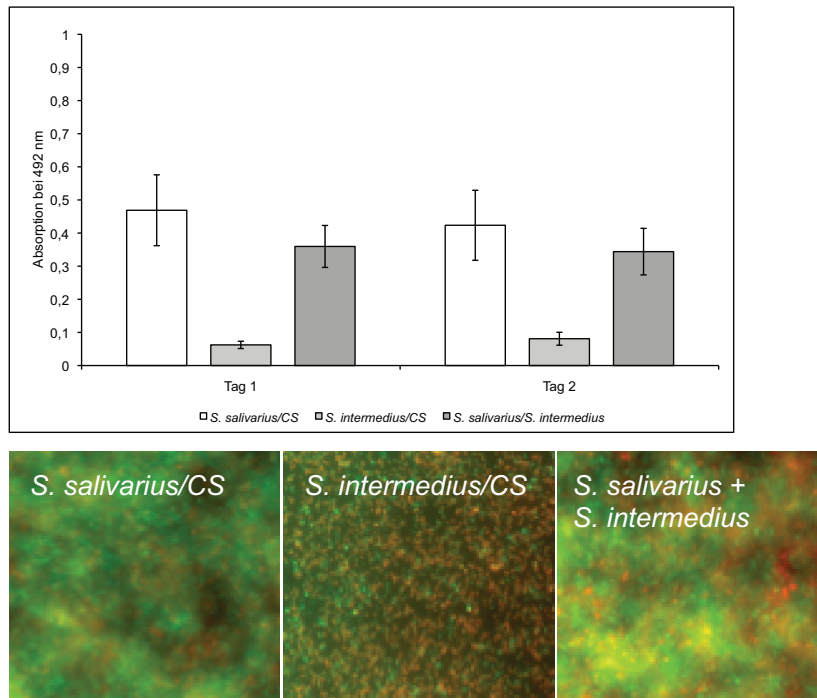
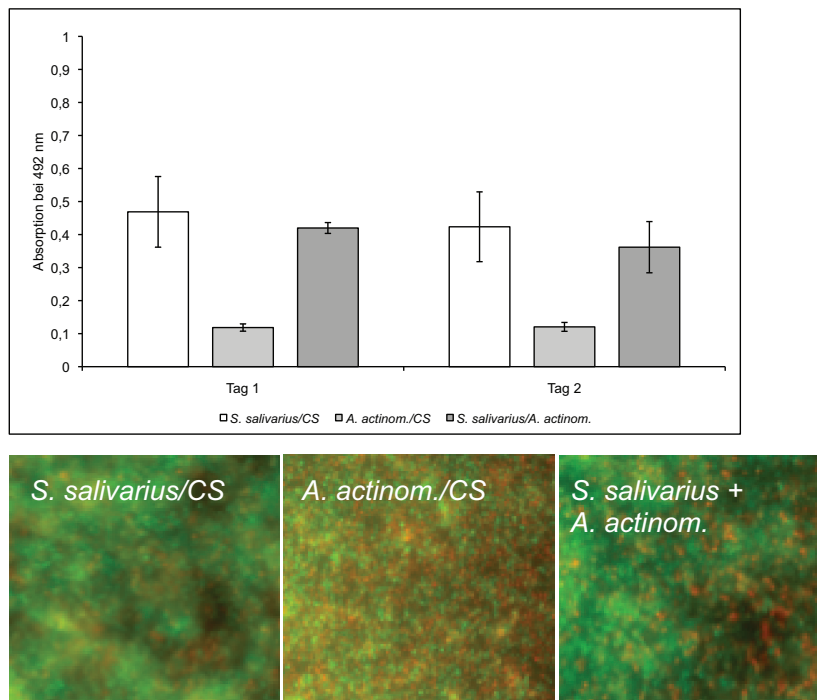
Abbildung 28C) Sukzessive Inokulation von *S. intermedius* zu *S. salivarius*Abbildung 28D) Sukzessive Inokulation von *A. actinomycetemcomitans* zu *S. salivarius*

Abbildung 28A-D: Ergebnisse des sukzessiven Animpfens von *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans* zu *S. salivarius*. Dargestellt sind die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Messung nach 1 und 2 Tagen des um 24 Stunden versetzten Animpfens zum zuerst inokulierten *S. salivarius*, sowie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am Tag 1 nach sukzessiver Inokulation. Vergrößerung 400x. *A. actinom.* - *A. actinomycetemcomitans*, CS – CDM/Saccharose. Vergrößerung 400x.

Die Lebendkeimzählung ergab, dass die Kultivierbarkeit aller Spezies mit Ausnahme von *S. mutans* reduziert war. *S. sanguinis* und *A. actinomycetemcomitans* konnten nicht mehr nachgewiesen werden. *S. salivarius* wurde ebenfalls durch alle getesteten Bakterien, und insbesondere durch *S. mutans*, in seiner Kultivierbarkeit beeinflusst. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse dazu dokumentiert.

Tabelle 8: Lebendkeimzahlen der Bakterien bei sukzessivem Animpfen zu *S. salivarius* Biofilmzellen im Vergleich zur jeweiligen Monokultur. Das an erster Stelle stehende Bakterium in einer Kombination wurde als Erst-Kolonisierer eingesetzt (i.d.F. *S. salivarius*), das an zweiter Stelle stehende Bakterium nach 24 Stunden zugeimpft. Die Keimzahl ist immer für das nicht in Klammern geschriebene Bakterium angegeben. *A. actinom.* - *A. actinomycetemcomitans*, CS – CDM/Saccharose.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2
<i>S. salivarius</i>/CS	1,49E+08	6,07E+06
<i>S. mutans</i>/CS	2,86E+07	1,90E+07
<i>S. salivarius</i>/(<i>S. mutans</i>)	6,67E+04	0,00E+00
(<i>S. salivarius</i>)/<i>S. mutans</i>	1,19E+07	4,62E+07
<i>S. sanguinis</i>/CS	1,26E+08	3,35E+06
<i>S. salivarius</i>/(<i>S. sanguinis</i>)	2,99E+07	5,37E+06
(<i>S. salivarius</i>)/<i>S. sanguinis</i>	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. intermedius</i>/CS	2,86E+07	1,10E+05
<i>S. salivarius</i>/(<i>S. intermedius</i>)	3,64E+07	5,83E+06
(<i>S. salivarius</i>)/<i>S. intermedius</i>	1,12E+06	3,33E+03
<i>A. actinom.</i>/CS	4,21E+07	3,83E+06
<i>S. salivarius</i>/(<i>A. actinom.</i>)	4,81E+07	2,66E+06
(<i>S. salivarius</i>)/<i>A. actinom.</i>	0,00E+00	0,00E+00

Die umgekehrte Situation, also das Animpfen von *S. salivarius* zu bestehenden Strukturen von *S. mutans*, ergab eine Steigerung der Biofilm-Masse, wie sie bereits bei der simultanen Animpfstrategie beobachtet wurde. In den Untersuchungen mit *S. sanguinis* zeigte sich, dass das zeitveretzte Animpfen von *S. salivarius* zu bestehenden Biofilmstrukturen von *S. sanguinis* keinen Einfluss hatte. Die zeitveretzte Inokulation von *S. salivarius* zu *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans* führte im Vergleich mit den Monokulturen zu einer gesteigerten Biofilm-Masse. Im Vergleich zur *S. salivarius* Monokultur war aber auch hier, wie oben bereits für die Erstkolonisation durch *S. salivarius* beschrieben, eine geringere Biofilm-Masse vorhanden.

In Abbildung 29 sind die Resultate der Safranin-Färbung und der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der verschiedenen Kombinationen für Tag 1 und 2 nach dem um 24 Stunden versetzten Inokulieren der Spezies dargestellt.

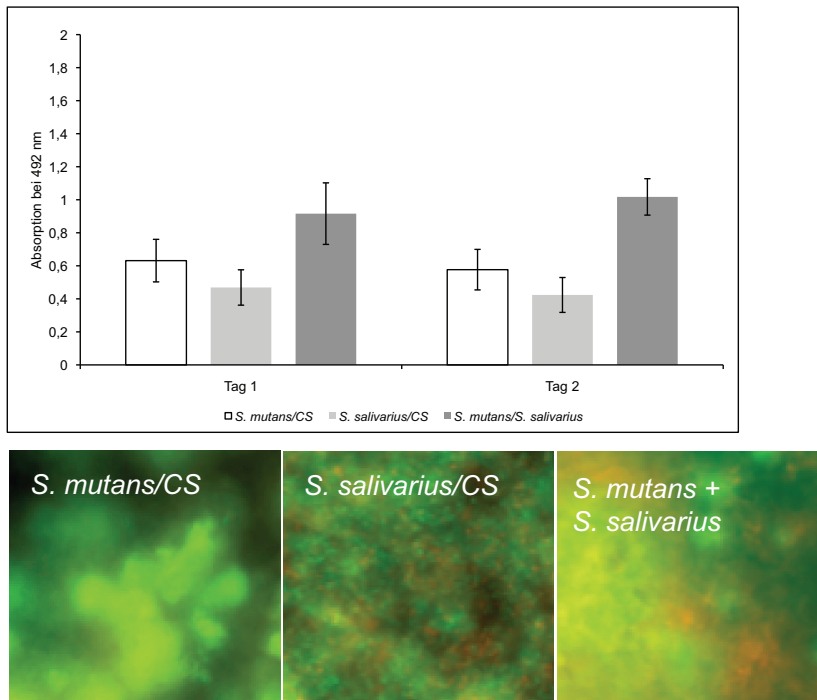
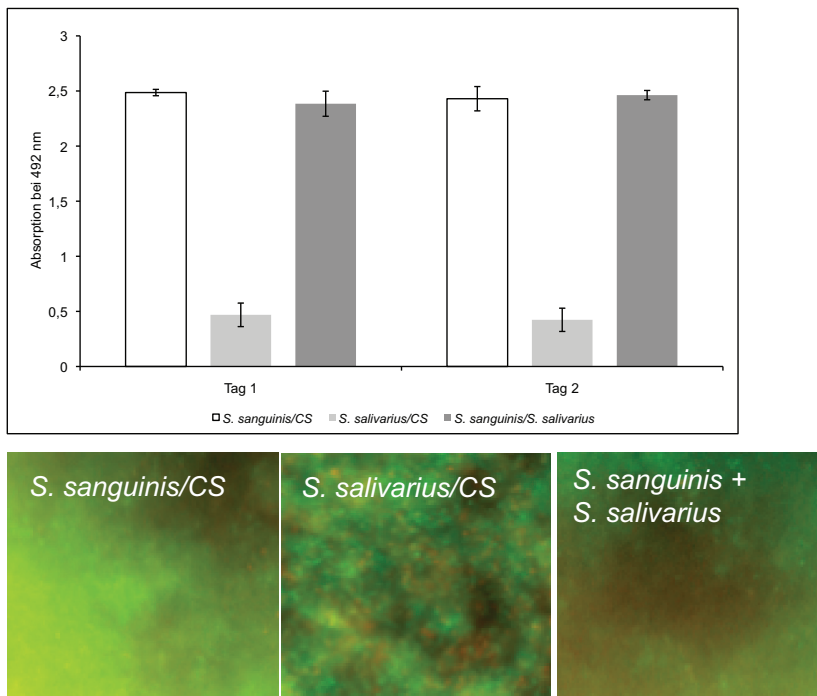
Abbildung 29A) Sukzessive Inokulation von *S. salivarius* zu *S. mutans* BiofilmenAbbildung 29B) Sukzessive Inokulation von *S. salivarius* zu *S. sanguinis* Biofilmen

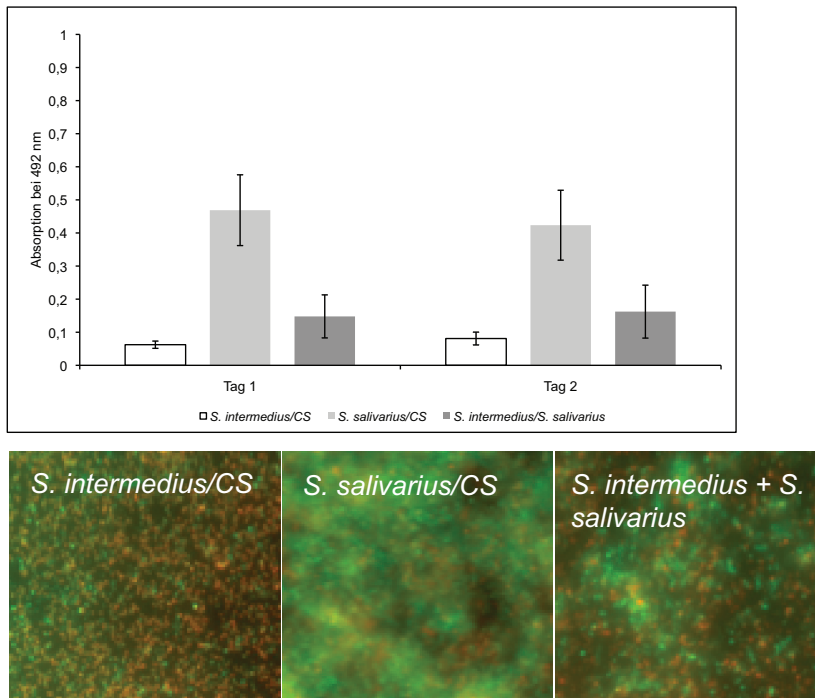
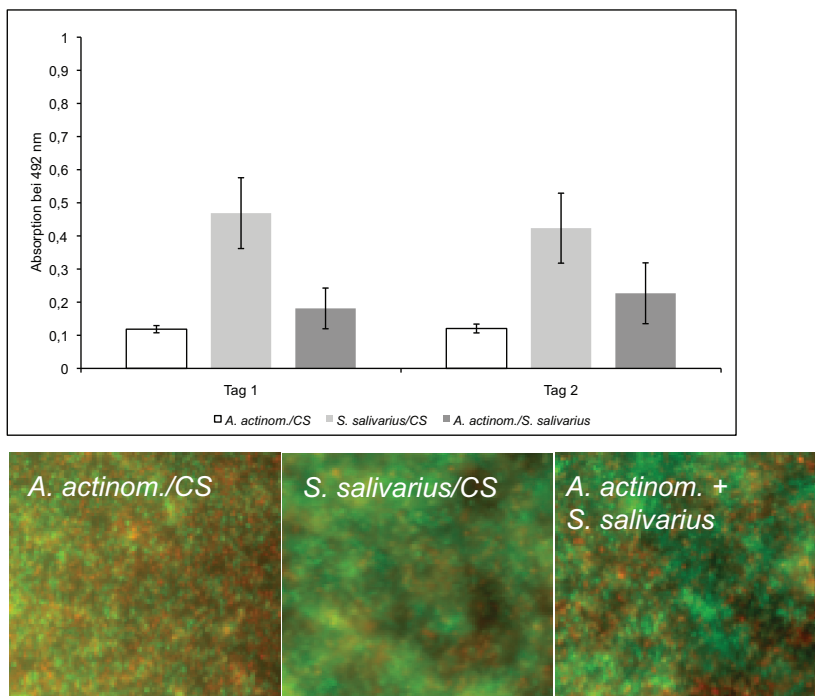
Abbildung 29C) Sukzessive Inokulation von *S. salivarius* zu *S. intermedius* BiofilmenAbbildung 29D) Sukzessive Inokulation von *S. salivarius* zu *A. actinomycetemcomitans* Biofilmen

Abbildung 29 A-D: Ergebnisse des sukzessiven Animpfens von *S. salivarius* zu *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans*. Dargestellt sind die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung nach 1 und 2 Tagen des um 24 Stunden versetzten Animpfens von *S. salivarius* zu *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* bzw. *A. actinomycetemcomitans*, sowie die fluoreszenzmikroskopischen

Aufnahmen am Tag 1 nach sukzessiver Inokulation. Vergrößerung 400x. *A. actinom.* - *A. actinomycetemcomitans*, CS – CDM/Saccharose.

Die Lebendkeimzählung ergab, dass *S. salivarius* nicht mehr kultiviert werden konnte, sobald dieses Bakterium zum bestehenden Biofilm von *S. mutans* inokuliert wurde. Auch in den anderen Kombinationen war die Anzahl der *S. salivarius* Zellen geringer als in der Monokultur. Für *S. mutans* wurde am Tag 1 nach dem versetzten Animpfen eine leichte Steigerung der Keimzahl beobachtet, für *S. sanguinis* und *S. intermedius* wurde dagegen eine Abnahme gezählt. *S. intermedius* war zudem ab Tag 2 der Inkubation nicht mehr kultivierbar. *A. actinomycetemcomitans* war unter diesen Bedingungen nicht kultivierbar. Die Resultate sind in der nachfolgenden Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Lebendkeimzahlen von *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans* nach sukzessivem Animpfen von *S. salivarius* im Vergleich zur jeweiligen Monokultur. Das an erster Stelle stehende Bakterium in einer Kombination wurde als Erst-Kolonisierer eingesetzt, das an zweiter Stelle stehende Bakterium nach 24 Stunden zugeimpft. Die Keimzahl ist immer für das nicht in Klammern geschriebene Bakterium angegeben. *A. actinom.* - *A. actinomycetemcomitans*, CS – CDM/Saccharose.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2
<i>S. salivarius</i> /CS	1,49E+08	6,07E+06
<i>S. mutans</i> /CS	2,86E+07	1,90E+07
<i>S. mutans</i> /(<i>S. salivarius</i>)	1,41E+08	2,69E+07
(<i>S. mutans</i>)/ <i>S. salivarius</i>	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. sanguinis</i> /CS	1,26E+08	3,35E+06
<i>S. sanguinis</i> /(<i>S. salivarius</i>)	8,62E+07	2,54E+06
(<i>S. sanguinis</i>)/ <i>S. salivarius</i>	3,50E+06	6,56E+06
<i>S. intermedius</i> /CS	2,86E+07	1,10E+05
<i>S. intermedius</i> /(<i>S. salivarius</i>)	7,07E+06	0,00E+00
(<i>S. intermedius</i>)/ <i>S. salivarius</i>	1,85E+05	9,25E+04
<i>A. actinom.</i> /CS	4,21E+07	3,83E+06
<i>A. actinom.</i> /(<i>S. salivarius</i>)	0,00E+00	0,00E+00
(<i>A. actinom.</i>)/ <i>S. salivarius</i>	3,11E+07	3,53E+06

Auf der Basis der Safranin-Färbung war die Menge adhärenter Zellen bei sukzessivem Animpfen von *S. salivarius* mit *F. nucleatum* bzw. *P. micra* nicht anders als beim simultanen Animpfen. Aus diesem Grund wird auf die Lebendkeimzählung und Fluoreszenzmikroskopie nicht eingegangen.

Beim sukzessiven Animpfen von *S. salivarius* vor oder nach *P. gingivalis* fand keine Biofilmbildung mehr statt, wie sie für das simultane Animpfen beider Spezies beobachtet werden konnte. Die nachfolgende Abbildung 30 zeigt am Beispiel von *S. salivarius* und *P. gingivalis* W50 die Resultate der Safranin-Färbung und der fluoreszenzmikroskopischen Analyse 1 und 2 Tage nach dem um 24 Stunden versetzten Animpfen.

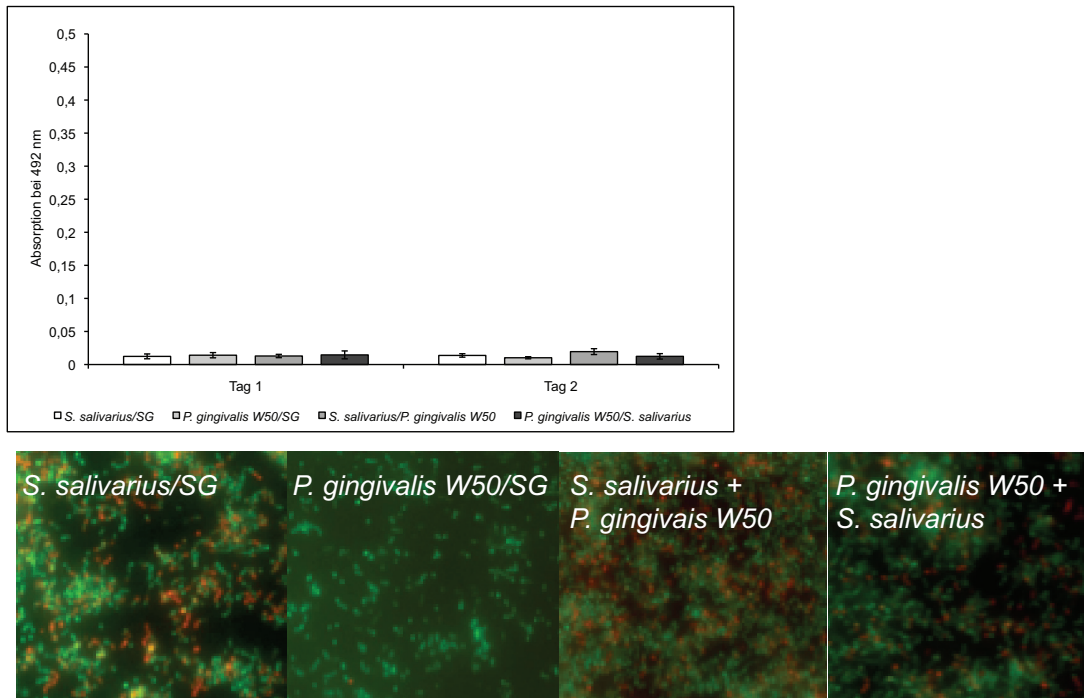


Abbildung 30: Ergebnisse des sukzessiven Animpfens von *S. salivarius* zu *P. gingivalis* W50 und umgekehrt. Dargestellt sind die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung nach 1 und 2 Tagen des um 24 Stunden versetzten Animpfens zum zuerst inokulierten *S. salivarius* bzw. *P. gingivalis*, sowie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am Tag 1 nach sukzessiver Inokulation. Vergrößerung 400x. SG – künstlicher Speichel/Galaktose.

Bei der Lebendkeimzählung erwies sich *P. gingivalis* W50 innerhalb von 24 Stunden als nicht mehr kultivierbar. Für *S. salivarius* wurden hingegen ähnliche Werte wie für die Mono-Spezies Kultur in künstlichem Speichel/Galaktose (SG) ermittelt (siehe Anhang, Tabelle 24).

3.5.3 Bestimmung bakterieller Effekte im indirekten Zellkontakt

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Reduktionen der Biofilm-Masse in simultan angeimpften Kulturen Folge eines direkten Zellkontaktes oder der Produktion löslicher Substanzen ist, wurden Transwell-Experimente durchgeführt.

Das Transwell-System ermöglicht die freie Diffusion sezernierter Substanzen zwischen durch eine Membran getrennten Bakterien (siehe 2.15, Abbildung 2).

Mit dem System sollte analysiert werden, welchen mittelbaren Einfluss *S. mitis* bzw. *S. salivarius* auf die Adhärenz, Biofilmbildung und Lebensfähigkeit der ko-inkubierten Bakterienspezies bzw. diese auf die entsprechenden Parameter von *S. mitis* und *S. salivarius* hatten. Die Studien wurden in CDM/Saccharose (fakultativ aerobe Bakterien) bzw. in künstlichem Speichel/Galaktose (obligat anaerobe Bakterien) durchgeführt. Für die Dokumentation wurde sowohl die Safranin-Färbung, als auch die Fluoreszenzmikroskopie nach Lebend/Tot-Färbung der Bakterien im unteren Transwell-

Kompartiment eingesetzt. Die Lebendkeimzählung wurde für die Bakterien im unteren Kompartiment nach Spülen und Abkratzen des Biofilms bzw. der adhären Zellen vorgenommen.

3.5.3.1 Transwell-Untersuchungen mit *S. mitis*

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass *S. mitis* im direkten Kontakt einen reduzierenden Effekt auf die Biofilmbildung fast aller untersuchten Spezies hatte. Die einzige Ausnahme ist hier *S. mutans*. Um zu klären, ob diese Beobachtungen der Produktion/Sekretion löslicher Substanzen zuzuschreiben ist, wurden Transwell-Untersuchungen durchgeführt.

Die Analyse mit den verschiedenen fakultativ aeroben Spezies im Transwell-System ergab, dass die Anwesenheit von *S. mitis* im oberen Kompartiment einen fördernden Einfluss auf die Biofilmbildung von *S. mutans* und *S. sanguinis* hatte. In Abbildung 31 sind die entsprechenden Ergebnisse der Safranin-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie dargestellt.

Abbildung 31A)

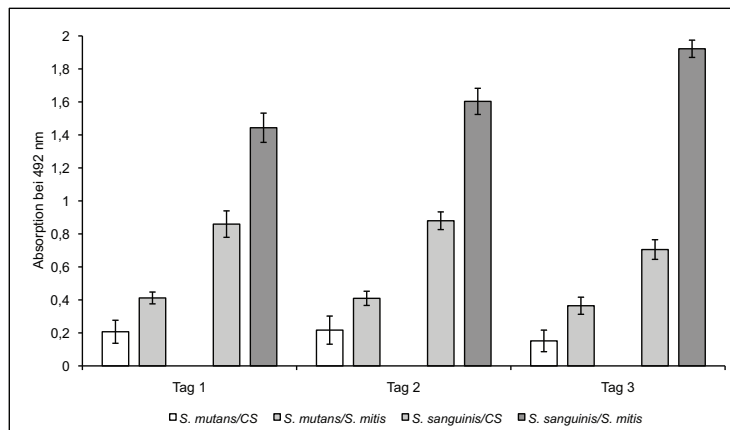


Abbildung 31B)

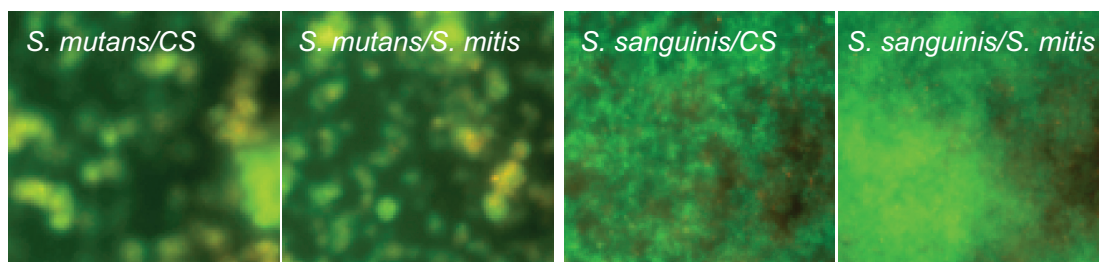


Abbildung 31: Ergebnisse der Transwell-Experimente mit *S. mitis* im oberen Kompartiment und *S. mutans* und *S. sanguinis* im unteren Kompartiment. A) Bestimmung der Biofilm-Masse im unteren Kompartiment mittels Safranin-Färbung; B) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Oberfläche im unteren Kompartiment nach Lebend/Tot-Färbung. CS - CDM/Saccharose. Vergrößerung 400x.

Für *A. actinomycetemcomitans* sowie *S. intermedius* war die mittels Safranin-Färbung bestimmte Biofilm-Masse im unteren Kompartiment des Transwell-Systems geringer als in den sonst genutzten

96-well Mikrotiter-Platten. Mikroskopisch wurde dementsprechend lediglich ein einschichtiger Zellrasen beider Bakterienspezies detektiert. Die Anwesenheit von *S. mitis* im oberen Kompartiment des Transwell-Systems hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Menge adhärenter *S. intermedius* Zellen. Dagegen konnte ein positiver Einfluss von *S. mitis* auf die Menge adhärenter *A. actinomycetemcomitans* Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 32A). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte zudem im Vergleich mit der *A. actinomycetemcomitans* Mono-Spezies Kultur am Tag 1 des Untersuchungszeitraumes mehr lebende Bakterien (Abbildung 32B). Nach 3 Tagen der Inkubation konnte jedoch auch hier beobachtet werden, dass der überwiegende Anteil der Bakterien tot vorlag (nicht gezeigt).

Abbildung 32A)

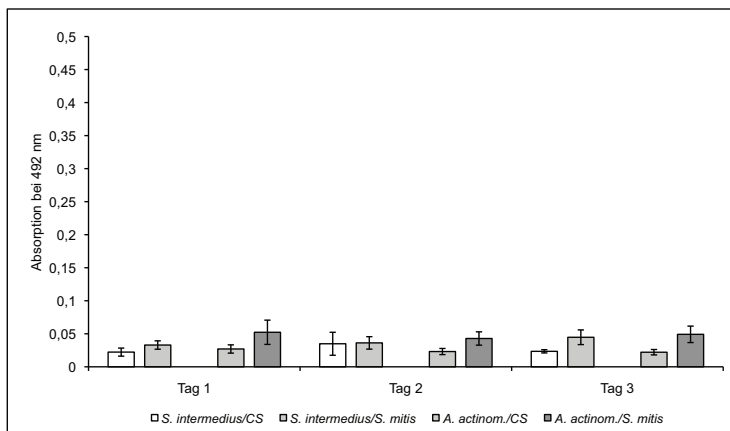


Abbildung 32B)

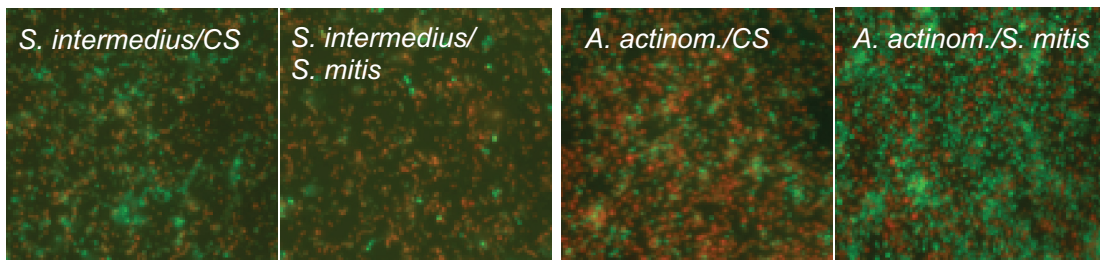


Abbildung 32: Ergebnisse der Transwell-Experimente mit *S. mitis* im oberen Kompartiment und *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans* im unteren Kompartiment. A) Bestimmung der Biofilm-Masse im unteren Kompartiment mittels Safranin-Färbung; B) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Oberfläche im unteren Kompartiment nach Lebend/Tot-Färbung. CS - CDM/Saccharose. Vergrößerung 400x. *A. actinom.* – *A. actinomycetemcomitans*

Im Vergleich zur Monokultur hatte keines der getesteten Bakterien einen Einfluss auf die Adhärenz von *S. mitis* (siehe Anhang, Abbildung 56).

Im Kontrast zu diesen Beobachtungen stehen die Veränderungen der Lebendkeimzahlen. Während für *S. mutans* keine signifikante Änderung der Kolonie-Bildenden Einheiten vorlag, konnte für

S. sanguinis und *S. intermedius* eine Verminderung der Anzahl vermehrungsfähiger Keime dokumentiert werden. *A. actinomycetemcomitans* erreichte bereits nach 24-stündiger Inkubation unter dem Einfluss von *S. mitis* im Transwell-System den 0-Wert.

Umgekehrt konnte für *S. mitis* eine Keimzahl-Reduzierung unter dem Einfluss aller ko-inkubierten Spezies beobachtet werden. In Anwesenheit von *S. mutans* erreichte die *S. mitis* Keimzahl den 0-Wert am 2. Tag der Inkubation. Tabelle 10 fasst die Ergebnisse der Lebendkeimzählungen zusammen.

Tabelle 10: Lebendkeimzahlen von im Transwell-System ko-inkubierten aeroben Bakterien. Die Keimzahlen wurden jeweils aus dem unteren Kompartiment des Systemes ermittelt. Dafür wurde der Biofilm in diesem Kompartiment vor der Zählung gewaschen und in einer definierten Flüssigkeitsmenge suspendiert. Die Tabelle gibt die KBE/ml für *S. mitis* unter dem Einfluss von *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans*, sowie für diese verschiedenen Spezies unter dem Einfluss von *S. mitis* wieder. Das ohne bzw. mit Klammern aufgezählte Bakterium befand sich im unteren bzw. oberen Kompartiment des Transwell-Systems.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3
<i>S. mitis</i>	1,18E+07	3,10E+05	5,70E+02
<i>S. mitis</i> (<i>S. mutans</i>)	4,20E+05	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mitis</i> (<i>S. sanguinis</i>)	2,59E+06	1,50E+04	8,50E+01
<i>S. mitis</i> (<i>S. intermedius</i>)	3,01E+06	1,59E+04	2,80E+02
<i>S. mitis</i> (<i>A. actinom.</i>)	1,43E+06	3,92E+04	1,84E+02
<i>S. mutans</i>	2,99E+07	1,86E+07	1,21E+07
<i>S. mutans</i> (<i>S. mitis</i>)	9,94E+07	4,40E+07	3,43E+07
<i>S. sanguinis</i>	1,90E+07	3,29E+06	5,00E+04
<i>S. sanguinis</i> (<i>S. mitis</i>)	4,45E+06	2,54E+06	0,00E+00
<i>S. intermedius</i>	8,32E+07	1,08E+07	2,12E+06
<i>S. intermedius</i> (<i>S. mitis</i>)	5,93E+06	1,66E+06	2,89E+04
<i>A. actinom.</i>	8,40E+07	8,35E+07	1,75E+06
<i>A. actinom.</i> (<i>S. mitis</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Untersuchungen von *S. mitis* mit den obligat anaeroben Bakterien im Transwell-System (*S. mitis* im oberen Kompartiment bzw. umgekehrt) ergaben keine wesentlichen Änderungen in der Anzahl adhärenter Anaerobierzellen. Zudem konnten für *P. gingivalis*, *F. nucleatum* und *P. micra* bereits nach 24 Stunden Ko-Inkubation in der Lebendkeimzählung keine kultivierbaren Bakterien mehr nachgewiesen werden. Umgekehrt war *S. mitis* unter dem Einfluss von *F. nucleatum* und *P. micra* ab Tag 2, unter *P. gingivalis* W50 und W83 ab Tag 3 der Inkubation nicht mehr nachweisbar (Tabelle 11).

Tabelle 11: Lebendkeimzahlen von im Transwell-System ko-inkubierten anaeroben Bakterien mit *S. mitis*. Die Keimzahlen wurden jeweils aus dem unteren Kompartiment des Systemes ermittelt. Dafür wurde der Biofilm in diesem Kompartiment vor der Zählung gewaschen und in einer definierten Flüssigkeitsmenge suspendiert. Die Tabelle gibt die KBE/ml für *S. mitis* unter dem Einfluss von *F. nucleatum*, *P. gingivalis* W50, *P. gingivalis* W83 und *P. micra*, sowie für diese verschiedenen Spezies unter dem Einfluss von *S. mitis* wieder. Das ohne bzw. mit Klammern aufgezählte Bakterium befand sich im unteren bzw. oberen Kompartiment des Transwell-Systems.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3
<i>S. mitis</i>	2,08E+05	4,97E+03	1,20E+02
<i>S. mitis</i> (<i>F. nucleatum</i>)	1,30E+05	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mitis</i> (<i>P. gingivalis</i> W50)	2,96E+05	2,14E+03	0,00E+00
<i>S. mitis</i> (<i>P. gingivalis</i> W83)	3,99E+05	1,39E+04	0,00E+00
<i>S. mitis</i> (<i>P. micra</i>)	8,80E+04	0,00E+00	0,00E+00
<i>F. nucleatum</i>	1,50E+07	8,70E+06	8,45E+03
<i>F. nucleatum</i> (<i>S. mitis</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>P. gingivalis</i> W50	3,08E+07	6,95E+07	1,92E+07
<i>P. gingivalis</i> W50 (<i>S. mitis</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>P. gingivalis</i> W83	4,41E+06	2,18E+06	5,07E+06
<i>P. gingivalis</i> W83 (<i>S. mitis</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>P. micra</i>	1,07E+07	1,74E+06	1,02E+06
<i>P. micra</i> (<i>S. mitis</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

3.5.3.2 Transwell-Untersuchungen mit *S. salivarius*

Die bisher in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur bakteriellen Interaktion in simultan beimpften Biofilm-Kulturen zeigten, dass *S. salivarius* die Adhärenz bzw. Biofilmbildung der koinkubierten Bakterien sowohl positiv als auch negativ beeinflusste. In der Ko-Kultur mit *P. gingivalis* W50 und W83 wurde ein Biofilm maßgeblich durch *S. salivarius* gebildet. Die Adhärenz und Lebensfähigkeit von *P. gingivalis* war in dieser Mischkultur beeinträchtigt.

Bei Kultivierung von *S. salivarius* im oberen Transwell-Kompartiment mit *S. mutans* und *A. actinomycetemcomitans* im unteren Transwell-Kompartiment führte die Anwesenheit von *S. salivarius* zu einer leicht verstärkten Biofilmbildung bzw. zur Bildung eines einschichtigen Zellrasens. Verglichen mit der Monokultur wurde durch Anwesenheit von *S. salivarius* für *S. sanguinis* eine verminderte Biofilm-Masse bewirkt. Die Menge adhärenter *S. intermedius* Zellen unterschied sich nicht von der in der Kontrollkultur von *S. intermedius* mit CDM/Saccharose im oberen Kompartiment. Die Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse der Safranin-Färbung und der fluoreszenzmikroskopischen Analyse für *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans* nach Ko-Inkubation mit *S. salivarius*.

Abbildung 33A)

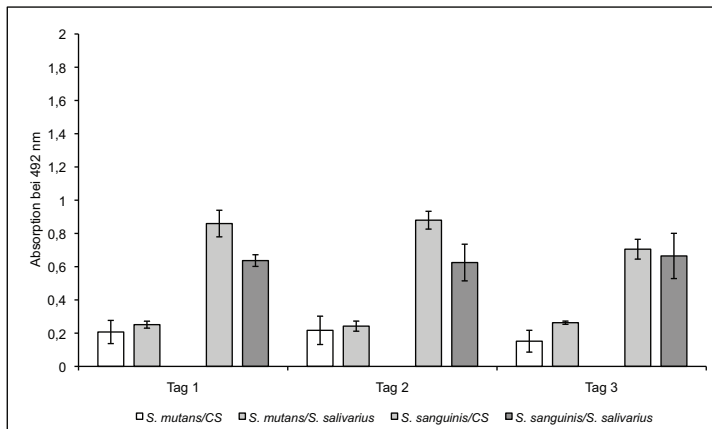


Abbildung 33B)

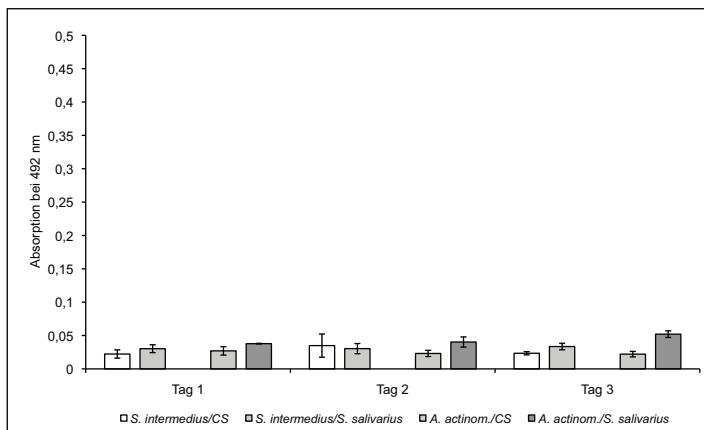


Abbildung 33C)

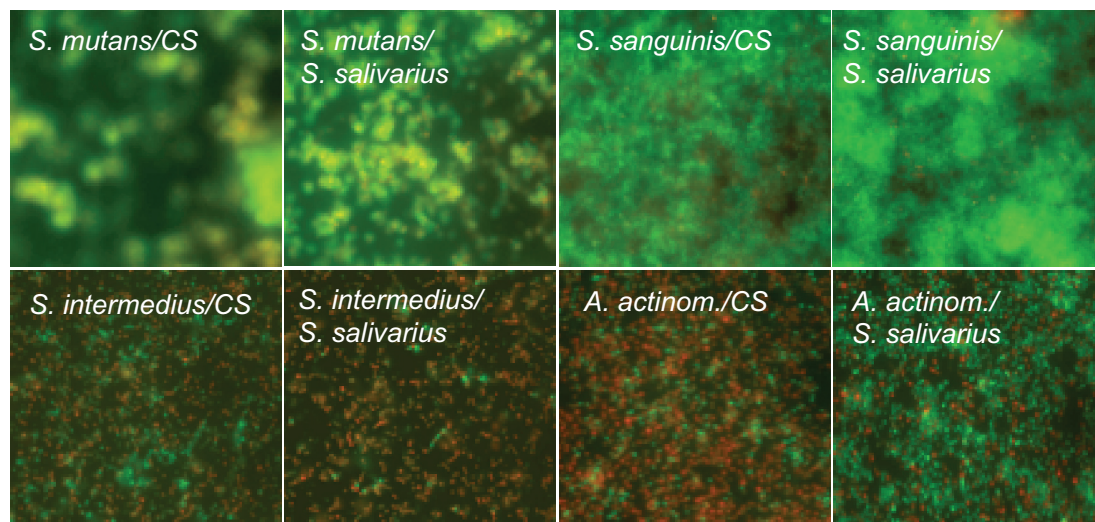


Abbildung 33: Ergebnisse der Transwell-Experimente mit *S. salivarius* im oberen Kompartiment und *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans* im unteren Kompartiment. A) und B) Bestimmung der Biofilm-Masse im unteren Kompartiment mittels Safranin-Färbung; (C)

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Oberfläche im unteren Kompartiment nach Lebend/Tot-Färbung. CS - CDM/Saccharose. Vergrößerung 400x. *A. actinom.* - *A. actinomycetemcomitans*.

Im umgekehrten Versuch, also bei Anwesenheit der getesteten Spezies im oberen Kompartiment und *S. salivarius* im unteren Kompartiment, war ein Anstieg der Biofilm-Masse von *S. salivarius* im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Die Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Safranin-Färbung der fluoereszenzmikroskopischen Analyse für *S. salivarius* nach Ko-Inkubation mit *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans*.

Abbildung 34A)

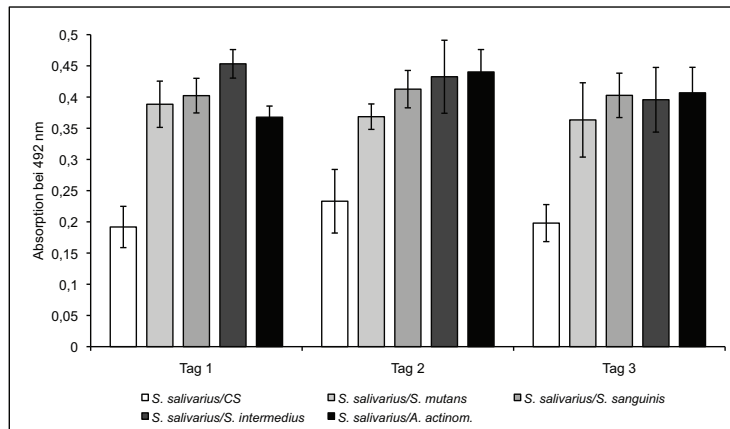


Abbildung 34B)

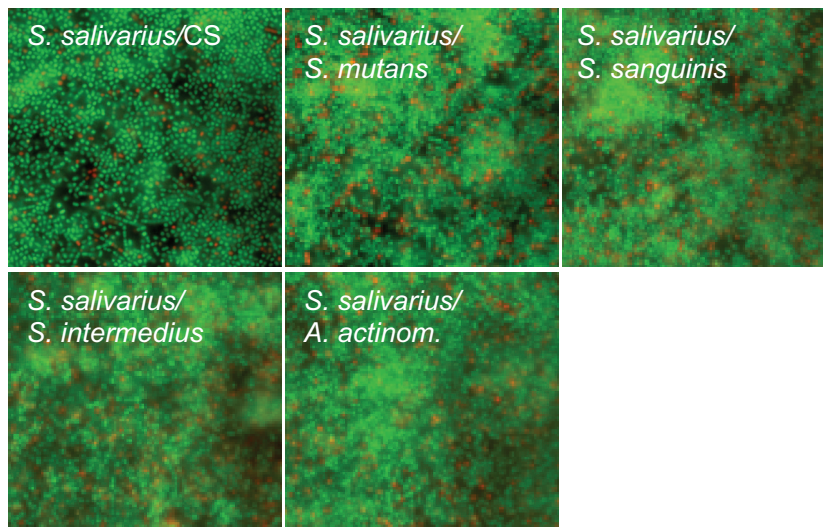


Abbildung 34: Ergebnisse der Transwell-Experimente mit *S. salivarius* im unteren Kompartiment und *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans* im oberen Kompartiment. A) Bestimmung der Biofilm-Masse im unteren Kompartiment mittels Safranin-Färbung; B) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Oberfläche im unteren Kompartiment nach Lebend/Tot-Färbung. CS - CDM/Saccharose. Vergrößerung 400x.

Die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmungen für die Transwell-Experimente mit den fakultativ aeroben Bakterien sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Lebendkeimzahlen von im Transwell-System ko-inkubierten aeroben Bakterien. Die Keimzahlen wurden jeweils aus dem unteren Kompartiment des Systems ermittelt. Dafür wurde der Biofilm in diesem Kompartiment vor der Zählung gewaschen und in einer definierten Flüssigkeitsmenge suspendiert. Die Tabelle gibt die KBE/ml für *S. salivarius* unter dem Einfluss von *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans*, sowie für diese verschiedenen Spezies unter dem Einfluss von *S. salivarius* wieder. Das ohne bzw. mit Klammern aufgezählte Bakterium befand sich im unteren bzw. oberen Kompartiment des Transwell-Systems.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3
<i>S. salivarius</i>	1,04E+08	5,00E+06	3,97E+05
<i>S. salivarius</i> (<i>S. mutans</i>)	4,56E+07	1,65E+06	1,00E+05
<i>S. salivarius</i> (<i>S. sanguinis</i>)	7,33E+07	5,35E+06	4,63E+05
<i>S. salivarius</i> (<i>S. intermedius</i>)	6,21E+07	3,68E+06	1,98E+05
<i>S. salivarius</i> (<i>A. actinom.</i>)	1,29E+08	2,52E+06	4,32E+05
<i>S. mutans</i>	2,99E+07	1,86E+07	1,21E+07
<i>S. mutans</i> (<i>S. salivarius</i>)	3,25E+07	5,23E+07	3,44E+07
<i>S. sanguinis</i>	1,90E+07	3,29E+06	5,00E+04
<i>S. sanguinis</i> (<i>S. salivarius</i>)	5,65E+06	1,00E+05	0,00E+00
<i>S. intermedius</i>	8,32E+07	1,08E+07	2,12E+06
<i>S. intermedius</i> (<i>S. salivarius</i>)	6,70E+06	1,28E+06	0,00E+00
<i>A. actinom.</i>	8,40E+07	8,35E+07	1,75E+06
<i>A. actinom.</i> (<i>S. salivarius</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Der Tabelle 12 ist zu entnehmen, dass die Anwesenheit von *S. salivarius* einen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit/Kultivierbarkeit der getesteten Spezies außer *S. mutans* hatte. *A. actinomycetemcomitans* konnte unter diesen Bedingungen nicht mehr kultiviert werden. Für *S. salivarius* konnte in Anwesenheit der anderen Spezies im oberen Kompartiment, mit Ausnahme von *A. actinomycetemcomitans*, am Tag 1 eine leicht verminderte Keimzahl beobachtet werden.

Für die obligat anaeroben Bakterien im unteren Kompartiment ergab sich im Safranin-Test unter dem Einfluss von *S. salivarius* keine Veränderung der Menge adhärenter Zellen. Laut Lebendkeimzählung ließen sich bereits nach 24 Stunden Inkubation die obligat anaeroben Bakterien nicht mehr anzüchten. In der umgekehrten Anordnung verstärkte sich die Adhärenz von *S. salivarius*, wie es bereits für die Kombination mit den fakultativ aeroben Spezies beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung ist in Abbildung 35 graphisch dargestellt.

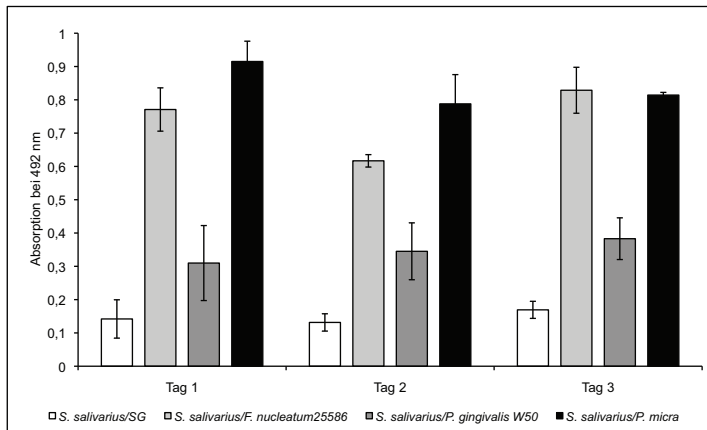


Abbildung 35: Ergebnisse der Transwell-Experimente mit *S. salivarius* im unteren Kompartiment und *F. nucleatum*, *P. gingivalis* W50 und *P. micra* im oberen Kompartiment. Bestimmung der Biofilm-Masse im unteren Kompartiment mittels Safranin-Färbung; SG – künstlicher Speichel/Galaktose.

Die Lebendkeimzahlen von *S. salivarius* waren unter dem Einfluss von *F. nucleatum* und *P. micra* gegenüber der Monokultur unverändert. In Gegenwart von *P. gingivalis* W50 bzw. W83 konnten im Gegensatz zur Monokultur auch am Tag 3 KBE von *S. salivarius* detektiert werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: Lebendkeimzahlen von im Transwell-System ko-inkubierten anaeroben Bakterien mit *S. salivarius*. Die Keimzahlen wurden jeweils aus dem unteren Kompartiment des Systems ermittelt. Dafür wurde der Biofilm in diesem Kompartiment vor der Zählung gewaschen und in einer definierten Flüssigkeitsmenge suspendiert. Die Tabelle gibt die KBE/ml für *S. salivarius* unter dem Einfluss von *F. nucleatum*, *P. gingivalis* W50, *P. gingivalis* W83 und *P. micra*, sowie für diese verschiedenen Spezies unter dem Einfluss von *S. salivarius* wieder. Das ohne bzw. mit Klammern aufgezählte Bakterium befand sich im unteren bzw. oberen Kompartiment des Transwell-Systems.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3
<i>S. salivarius</i>	3,11E+06	8,70E+02	0,00E+00
<i>S. salivarius</i> (<i>F. nucleatum</i>)	2,83E+06	1,40E+03	0,00E+00
<i>S. salivarius</i> (<i>P. gingivalis</i> W50)	1,14E+06	1,90E+02	1,60E+02
<i>S. salivarius</i> (<i>P. gingivalis</i> W83)	1,66E+06	2,03E+02	6,00E+01
<i>S. salivarius</i> (<i>P. micra</i>)	2,95E+06	1,60E+03	0,00E+00
<i>F. nucleatum</i>	1,50E+07	8,70E+06	8,45E+03
<i>F. nucleatum</i> (<i>S. salivarius</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>P. gingivalis</i> W50	3,08E+07	6,95E+07	1,92E+07
<i>P. gingivalis</i> W50 (<i>S. salivarius</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>P. gingivalis</i> W83	4,41E+06	2,18E+06	5,07E+06
<i>P. gingivalis</i> W83 (<i>S. salivarius</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>P. micra</i>	1,07E+07	1,74E+06	1,02E+06
<i>P. micra</i> (<i>S. salivarius</i>)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

3.5.4 Untersuchungen zur Biofilm-Komposition

Der bakterielle Biofilm enthält außer den Mikroorganismen hauptsächlich Wasser und von den Mikroorganismen sezernierte extrazelluläre polymere Stoffe (EPS). Diese Biopolymere bilden in

Verbindung mit Wasser Hydrogele, so dass eine schleimartige Matrix entsteht. Hier sind zum einen Nährstoffe und andere Substanzen gelöst, die der Versorgung der Mikroorganismen dienen, und zum anderen geben diese Hydrogele dem Biofilm eine stabile Form und schützen die eingebetteten Bakterien vor Umwelteinflüssen.

Bei den Biopolymeren handelt es sich um Gemische aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren. Welche dieser Komponenten für die Biofilmbildung der getesteten Spezies bzw. deren Biofilmstabilität verantwortlich waren, sollte in weiteren Analysen untersucht werden.

Zunächst erfolgten direkte Analysen der Menge sezernierter Proteine (Bradford *et al.* 1976), Kohlenhydrate (Dubois *et al.*, 2005) und extrazellulärer DNA (eDNA) (OD₂₆₀) nach Ultraschallbehandlung der Biofilme. Die erhaltenen Daten wiesen jedoch relativ starke Schwankungen auf. Zudem konnte das angewendete Verfahren nicht ausschließen, dass die Messwerte durch Bestandteile toter Bakterien im Biofilm verfälscht wurden. Aus diesem Grund wurde die Messmethoden von Inoue und Kollegen verwendet (Inoue *et al.*, 2003). Diese beruhen auf dem katalytischen Aufschluß der Biofilme mit den Enzymen Pronase (Pro) und DNase (DN) sowie mit Natriummetaperiodat (NMP).

Für die Untersuchungen wurden die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen und Applikationsformen getestet. Zum einen erfolgte die Zugabe direkt zum Inkubationsmedium und anschließender Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung nach entsprechender 1-, 2- oder 3-tägiger Inkubation (direkte Disorganisation). Zum anderen wurden 1, 2 oder 3 Tage alte Biofilme zunächst gewaschen und anschließend mit diesen Substanzen in entsprechender Pufferlösung versetzt. Nach einer zweistündigen Inkubation erfolgte auch hier die Quantifizierung der Biofilm-Masse mittels Safranin-Färbung (indirekte Disorganisation). Die Testung der Substanzen erfolgte zunächst für alle Mono-Spezies Kulturen. Im Fall von primär Biofilm-negativen Stämmen sollte ein möglicher positiver Effekt der Substanzen auf die Adhärenz und eine so induzierte Biofilmbildung geprüft werden.

3.5.4.1 Einfluss von Pronase, DNase und Natriummetaperiodat auf die Bildung von Biofilmen (direkte Disorganisation)

Bei der direkten Zugabe von Pro, DN und NMP zu den fakultativ aeroben Bakterien konnte für *S. mitis* auch weiterhin keine Biofilmbildung beobachtet werden. Bei *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* und *A. actinomycetemcomitans* bewirkte die Zugabe von Natriummetaperiodat bzw. Pronase eine Inhibition der Biofilmbildung.

Die minimale inhibitorische Konzentration lag für Pronase hier bei einer Menge von 50 µg/ml. Nur bei *A. actinomycetemcomitans* konnte bereits eine Hemmung der Bildung des bakteriellen Zellrasens ab 5 µg/ml beobachtet werden. Natriummetaperiodat hatte einen hemmenden Effekt bei einer Konzentration von 10 mM.

Für *S. intermedius* konnte kein offensichtlicher Effekt bei Zugabe von Pronase ins Inkubationsmedium detektiert werden, wogegen 10 mM Natriummetaperiodat einen inhibitorischen Effekt auf die Biofilmbildung hatte.

Die Zugabe von DNase hatte für *S. mutans* ab einer Konzentration von 45 Units/ml einen positiven Effekt auf die Biofilmbildung. Bei den anderen Bakterienspezies wurde dagegen eine verringerte Biofilmbildung (*S. salivarius*, *S. sanguinis*) bzw. eine komplette Hemmung der Biofilmbildung (*S. intermedius*, *A. actinomycetemcomitans*) durch DNase beobachtet.

Für *S. salivarius* fand sich eine verminderte Biofilmbildung bereits ab einer Konzentration von 1,8 Units/ml DNase im Inkubationsmedium. Bei *S. sanguinis* und *A. actinomycetemcomitans* waren dagegen 18 Units/ml und bei *S. intermedius* 36 Units/ml für eine Verminderung bzw. Verhinderung der Biofilmbildung notwendig.

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der direkten Disorganisation für die höchsten getesteten Konzentrationen der verschiedenen Substanzen zusammengefasst.

Tabelle 14: Untersuchungen zur direkten Disorganisation von Biofilmen oraler Bakterien durch ausgewählte Enzyme / Substanzen. Dargestellt sind die Zu- (↑) oder Abnahme (↓) der Biofilm-Masse bzw. Inhibition der Biofilmbildung (-) unter dem Einfluss von 500 µg/ml Pronase, 90 Units/ml DNase bzw. 10 mM Natriummetaperiodat im Inkubationsmedium. Zu- oder Abnahme bzw. Inhibition der Biofilmbildung beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle (ohne Zugabe der Substanzen). k. E. – kein Effekt. *A. actinom.* – *A. actinomycetemcomitans*, NMP – Natriummetaperiodat, U - Units.

	Pronase (500 µg/ml)	NMP (10 mM)	DNase (90 U/ml)
<i>S. mitis</i> ATCC 11843	k. E.	k. E.	k. E.
<i>S. salivarius</i> SK12	-	-	↓
<i>S. sanguinis</i> DSM 20567	-	-	↓
<i>S. mutans</i> DSM 523	-	-	↑
<i>A. actinom.</i> DSMZ 11123	-	-	-
<i>S. intermedius</i> AC 3105	k. E.	-	-
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	k. E., sterilfiltriert ↑	k. E.	k. E.
<i>P. gingivalis</i> W83	k. E.	k. E.	k. E.
<i>P. micra</i> ATCC 33270	k. E.	k. E.	k. E.

Für die obligat anaeroben Bakterien, die bisher unter keiner der getesteten Bedingungen einen Biofilm bildeten, wurde auch durch die Zugabe der Substanzen i. d. R. kein Biofilm induziert. Als einzige Ausnahme konnte für *F. nucleatum* ATCC 25586 eine Biofilmbildung beobachtet werden. Dies war aber nur dann der Fall, wenn das verwendete Medium Pronase enthielt und vor Zugabe des Bakteriums sterilfiltriert wurde. Eine Pronase-Stamm-Lösung aus sterilen Komponenten ohne zusätzliche Sterilfiltration des Mediums bewirkte dagegen keine Biofilmbildung von *F. nucleatum* ATCC 25586. Dieser Effekt wurde auch nur mit der höchsten Menge an Pronase-Supplement (500 µg/ml) beobachtet. In Abschnitt 3.6.1 wird auf diesen Effekte detaillierter eingegangen.

Um zu zeigen, ob es sich bei den durch die getesteten Substanzen beobachteten Auswirkungen auf die Biofilm-Masse tatsächlich um Biofilm-spezifische Effekte und nicht um allgemeine Effekte auf das Bakterienwachstum handelte, wurden Wachstumsversuche mit planktonischen Kulturen durchgeführt. Die Substanzen wurden dabei in einer Konzentration von 500 µg/ml Pronase, 90 Units/ml DNase bzw. 10 mM Natriummetaperiodat zum Inkubationsmedium gegeben.

Es wurden nur die Spezies untersucht, bei denen zuvor ein Einfluss auf die Biofilm-Bildung gemessen wurde (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. intermedius*, *A. actinomycetemcomitans*), sowie *F. nucleatum* ATCC 25586 wegen der Induktionswirkung von Pronase.

Bei den fakultativ aeroben Bakterien zeigte sich, dass die Anwesenheit von Natriummetaperiodat in CDM/Saccharose das Wachstum stark verminderte. Demnach war diese Substanz für den direkten Einsatz im Kulturmedium ungeeignet, da es von vornherein keine Vermehrung der Bakterien zuließ. DNase und Pronase hatten dagegen keinen, bzw. einen positiven Effekt auf das Wachstum der Bakterien im Vergleich zum ursprünglichen Kulturmedium. Die An- oder Abwesenheit von Pronase in künstlichem Speichel/Galaktose ohne oder nach Sterilfiltration hatte keinen Einfluss auf die Generationszeit und Zelldichte von *F. nucleatum* ATCC 25586 (siehe Anhang, Abbildung 57).

3.5.4.2 Einfluss von Pronase, DNase und Natriummetaperiodat auf etablierte Biofilme (indirekte Disorganisation)

In diesem Versuch erfolgte die Zugabe der Substanzen zu 1, 2 oder 3 Tage alten, etablierten Biofilmen, so dass etwaige Einflüsse auf das Wachstum der Bakterien irrelevant waren.

Die Zugabe der verschiedenen Substanzen auf etablierte Biofilme wurde für alle Spezies durchgeführt, die in der Lage waren, Biofilme bzw. zumindest einschichtige Zellrasen zu bilden. Zudem wurde wegen der Ergebnisse in der vorangegangenen Versuchsserie *F. nucleatum* ATCC 25586 in die Untersuchung einbezogen.

Die Ergebnisse der Biofilm-Masse-Bestimmungen mittels Safraninfärbung zeigten eine Abhängigkeit des Wirkungsgrades der Substanzen vom Alter der Biofilme. Für *S. salivarius*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans* konnte eine Abnahme der Biofilm-Masse bereits bei Zugabe von 5 µg/ml, für *S. sanguinis* bei 500 µg/ml Pronase am Tag eins beobachtet werden. Für *S. mutans* zeigte sich dagegen ein Anstieg der Biofilm-Masse bei einem zwei Tage alten Biofilm ab einer Konzentration von 500 µg/ml Pronase. *F. nucleatum* ATCC 25586 bildete bei nachträglicher Zugabe von Pronase keine Biofilmstrukturen aus.

Die Behandlung der Biofilme mit Natriummetaperiodat führte bei *S. intermedius*, unabhängig vom Alter des Biofilms, zu einer Zunahme der Biofilm-Masse. Bei *S. salivarius* konnte zu jedem getesteten Zeitpunkt eine Abnahme der Biofilm-Masse durch Natriummetaperiodat gemessen werden. Bei *S. mutans* Biofilmen bewirkte die Substanz nur bei einem 1 Tag alten Biofilm eine Minderung der Biofilm-Masse. Für alle anderen getesteten Bakterien zeigte die indirekte Zugabe von NMP keinen offensichtlichen Effekt.

Die Zugabe von DNase ab einer Konzentration von mehr als 36 Units/ml führte bei *S. sanguinis* und *S. intermedius* Biofilmen zu einer Zunahme der Biofilm-Masse. *S. mutans* erreichte, vor allem bei Zusatz von DNase zu 2 und 3 Tage alten Biofilmen, eine höhere Biofilm-Masse als die Kontrolle. Die Biofilm-Masse von *S. salivarius* nahm bei Zugabe von 90 Units/ml DNase zu 1 oder 2 Tage alten Biofilmen dagegen ab. Für *F. nucleatum* und *A. actinomycetemcomitans* konnten keine Effekte durch

DNase-Zugabe beobachtet werden. Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der indirekten Disorganisation zusammen.

Tabelle 15: Untersuchungen zur indirekten Disorganisation von Biofilmen oraler Bakterien durch ausgewählte Enzyme / Substanzen. Dargestellt sind die Zu- (↑) oder Abnahme (↓) der Biofilm-Masse bzw. Inhibition der Biofilmbildung (-) nach Zugabe von 500 µg/ml Pronase, 90 Units/ml DNase bzw. 10 mM Natriummetaperiodat zu 1, 2 bzw. 3 Tage alten Biofilmen. Zu- oder Abnahme bzw. Inhibition der Biofilmbildung beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle (ohne Zugabe der Substanzen). k. E. – kein Effekt, T1, T2, T3 – Tag 1, 2 bzw. 3, *A. actinom.* – *A. actinomycetemcomitans*, NMP – Natriummetaperiodat, U - Units.

	Pronase (500 µg/ml)	NMP (10 mM)	DNase (90 U/ml)
<i>S. sanguinis</i> DSM 20567	↓	k. E.	↑
<i>S. salivarius</i> SK12	↓	↓	↓ (T1, T2)
<i>S. mutans</i> DSM 523	↑ (T2)	↓ (T1)	↑ (T2, T3)
<i>A. actinom. DSMZ 11123</i>	↓	k. E.	k. E.
<i>S. intermedius</i> AC 3105	↓	↑ (T2, T3)	↑
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	k. E.	k. E.	k. E.

Die Analyse der indirekten Disorganisation erfolgte auch für die Zwei-Spezies Kombinationen. Dabei wurden jene Bakterien-Kombinationen untersucht, die Biofilmstrukturen ausbildeten.

Die Analyse dieser Di-Spezies Biofilme mit 500 µg/ml Pronase, 90 Units/ml DNase bzw. 10 mM Natriummetaperiodat zeigte, dass Pronase den Biofilm von *S. mitis* / *S. intermedius*, *S. mitis* / *A. actinomycetemcomitans*, *S. salivarius* / *S. sanguinis*, *S. salivarius* / *S. intermedius* und *S. salivarius* / *A. actinomycetemcomitans* destabilisierte, und damit zu einer gegenüber dem Kontrollansatz verringerten Biofilm-Masse führte.

Die 2-stündige Inkubation der Di-Spezies Biofilme mit DNase hatte keinen Effekt auf die Kombinationen *S. salivarius* / *S. intermedius* und *S. mitis* / *S. sanguinis*. Bei allen anderen Di-Spezies Biofilmen führte die DNase-Behandlung zu einer Abnahme der Biofilm-Masse.

Der Zusatz von Natriummetaperiodat hatte für die Kombinationen *S. salivarius* / *S. sanguinis*, *S. mitis* / *S. mutans* bei 1 Tag alten Biofilmen, *S. salivarius* / *S. intermedius* bei 3 Tage alten Biofilmen, sowie *S. salivarius* / *A. actinomycetemcomitans* bei 2 und 3 Tage alten Biofilmen eine leichte Abnahme der Biofilm-Masse zur Folge. Dagegen konnte für die Zwei-Spezies Kombination *S. mitis* / *S. sanguinis* bei 1 und 2 Tage alten Biofilmen, sowie bei *S. mitis* / *S. intermedius* und *S. mitis* / *A. actinomycetemcomitans* eine leichte Zunahme der Biofilm-Masse detektiert werden. Die Analyse der Biofilmkomposition von *S. salivarius* / *P. gingivalis* W50 zeigte, dass sowohl Pronase als auch Natriummetaperiodat zu einer Abnahme der Biofilm-Masse der Zwei-Spezies Kombination führten. Die Zugabe von DNase hatte dagegen keinen offensichtlichen Effekt. Die Tabelle 16 fasst die Ergebnisse für die indirekte Disorganisation von Di-Spezies Biofilmen zusammen.

Tabelle 16: Untersuchungen zur indirekten Disorganisation von Di-Spezies Biofilmen oraler Bakterien durch ausgewählte Enzyme / Substanzen. Dargestellt sind die Zu- (↑) oder Abnahme (↓) der Biofilm-Masse bzw. Inhibition der Biofilmbildung (-) nach Zugabe von 500 µg/ml Pronase, 90 Units/ml DNase bzw. 10 mM Natriummetaperiodat zu 1, 2 bzw. 3 Tage alten Biofilmen. Zu- oder Abnahme bzw. Inhibition der Biofilmbildung

beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle (ohne Zugabe der Substanzen). k. E. – kein Effekt, T1, T2, T3 – Tag 1, 2 bzw. 3, *A. actinom.* – *A. actinomycetemcomitans*, NMP – Natriummetaperiodat, U - Units.

	Pronase (500 µg/ml)	NMP (10 mM)	DNase (90 U/ml)
<i>S. mitis/S. mutans</i>	k. E.	↓ (T1)	↓
<i>S. mitis/S. sanguinis</i>	k. E.	↑	k. E.
<i>S. mitis/S. intermedius</i>	↓	↑	↓
<i>S. mitis/A. actinom.</i>	↓	↑ (T1, T2)	↓
<i>S. salivarius/S. mutans</i>	k. E.	k. E.	↓
<i>S. salivarius/S. sanguinis</i>	↓	↓	↓
<i>S. salivarius/S. intermedius</i>	↓	↓ (T3)	k. E.
<i>S. salivarius/A. actinom.</i>	↓	↓ (T2, T3)	↓
<i>S. salivarius/P. gingivalis</i>	↓	↓	k. E.

3.6 Weiterreichende Analysen zu ausgewählten Bakterien und Zwei-Spezies-Kombinationen

Aus arbeitsökonomischen Gründen und zur besseren Übersichtlichkeit wurden weitere Studien nur noch mit *F. nucleatum*, *S. salivarius* / *P. gingivalis* und *S. mitis* / *S. sanguinis* durchgeführt. Wenn eine Kontrolle mit einer anderen Spezies angebracht war, wurde diese in die Analytik integriert.

3.6.1 Effekte von Pronase auf *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 und ATCC 23726 sowie auf ausgewählte Zwei-Spezies Kombinationen

F. nucleatum ATCC 25586 war nur im sterilfiltrierten Medium (künstlicher Speichel/Galaktose, SG) bei Zugabe von Pronase in der Lage einen Biofilm zu bilden (3.5.4). Dies deutete auf das Fehlen einer Biofilm-inhibierenden Komponente nach Sterilfiltration hin. Das im ursprünglichen Medium enthaltene, hochpolymere und visköse Mucin gehörte zu den wahrscheinlichen Kandidaten. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde das Medium ohne Zusatz von Mucin angesetzt (SG-) und vor der Verwendung mit Pronase versetzt (SG-/Pro). Tatsächlich war auch hier die Biofilmbildung von *F. nucleatum* ATCC 25586 zu beobachten. Dagegen war ohne Zusatz von Pronase (SG-) sowie in nicht filtriertem künstlichen Speichel/Galaktose mit (SG/Pro) und ohne Pronase (SG) keine Biofilmbildung nachweisbar.

Abbildung 36 zeigt die Ergebnisse der Biofilm-Masse-Bestimmung mittels Safranin-Färbung in allen vier Medien.

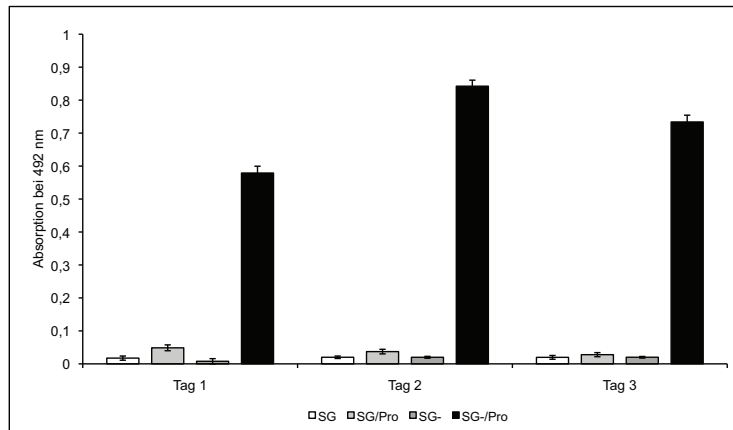


Abbildung 36: Analyse der Biofilmbildung von *F. nucleatum* ATCC 25586 in vier Kulturmedien (SG, SG-, SG/Pro und SG-/Pro). Die Bestimmung der Biofilm-Masse erfolgte mittels Safranin-Färbung. SG – künstlicher Speichel/Galaktose, SG- - künstlicher Speichel/Galaktose ohne Mucin, SG/Pro – künstlicher Speichel/Galaktose mit Pronase, SG-/Pro – künstlicher Speichel/Galaktose ohne Mucin mit Pronase.

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der Rasterelektronen- und Fluoreszenzmikroskopie von *F. nucleatum* in SG- (Abbildung 37A) und SG-/Pro (Abbildung 37B) dargestellt.

Abbildung 37A)

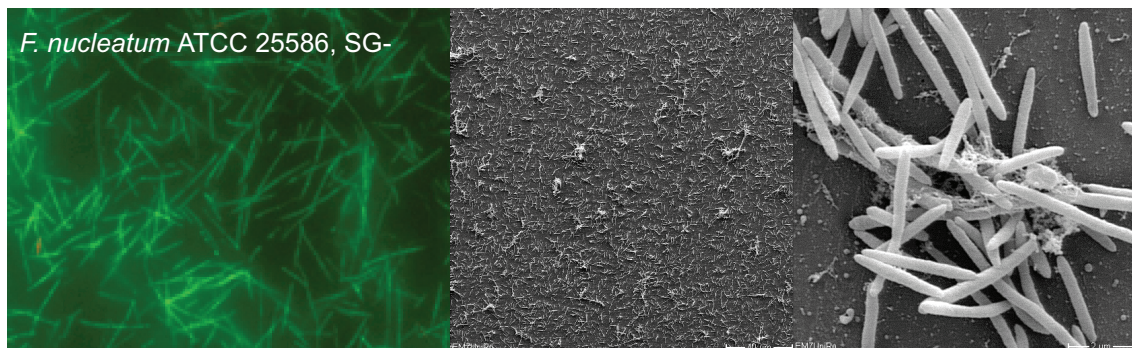


Abbildung 37B

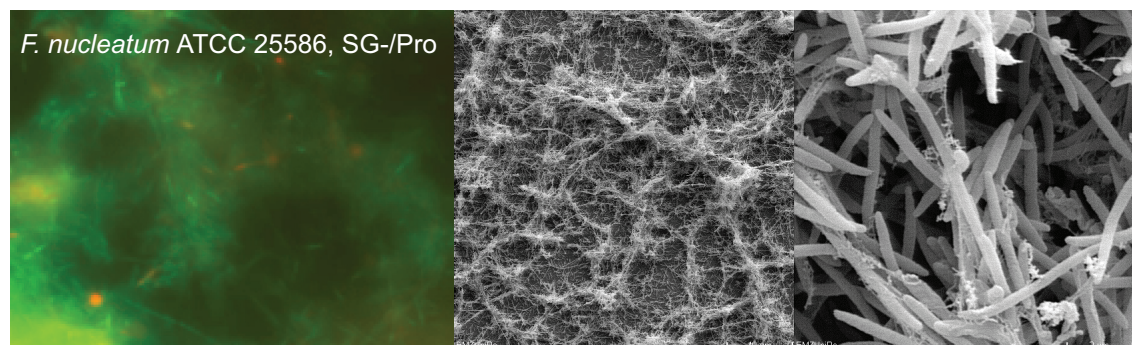


Abbildung 37: Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie von *F. nucleatum* ATCC 25586 in SG- und SG-/Pro. A) Ergebnisse der Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie in SG-. B) Ergebnisse der Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie in SG-/Pro. Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskop erfolgten

nach Lebend/Tot-Färbung, Vergrößerung 400x. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen sind mit einer Vergrößerung von 500x und 10 000x dargestellt.

Wenn Proteinase K anstelle von Pronase zum Medium gegeben wurde, erfolgte keine Biofilmbildung durch *F. nucleatum* ATCC 25586. Dies war auch zu beobachten, wenn das Medium mit Pronase vorbehandelt und das Enzymgemisch anschließend inaktiviert (Hitze 10 min 85 °C oder Zugabe eines Proteaseinhibitors) wurde, bzw. wenn die Bakterienzellen mit Pronase vorbehandelt wurden, anschließend das Enzym durch mehrmaliges Waschen entfernt wurde und schließlich die Bateriaen in SG- inkubiert wurden (siehe Anhang, Abbildung 58).

Das Wachstum von planktonischen *F. nucleatum* ATCC 25586 wurde durch den Zusatz von Pronase, aber auch durch das Fehlen von Mucin nicht beeinflusst (siehe Anhang, Abbildung 3D). Bei Lebendkeimzählung der adhärenenten bzw. aus dem Biofilm mobilisierten Zellen fand sich eine höherer Zahl von *F. nucleatum* ATCC 25586 in SG-/Pro als in SG- (Tabelle 17).

Tabelle 17: Lebendkeimzahlen von Biofilm-assoziierten *F. nucleatum* ATCC 25586 in SG und SG-/Pro.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3
SG -	2,30E+06	3,60E+07	4,08E+06
SG-/Pro	2,30E+08	1,90E+08	1,07E+08

Um zu untersuchen, ob und wie Fusobakterien unter diesen besonderen Inkubationsbedingungen mit den anderen Spezies dieser Studie interagieren, wurden verschiedene Zwei-Spezies Kombinationen in SG- bzw. SG-/Pro inkubiert. Als Kombinationspartner wurden *S. salivarius*, *S. mitis* sowie *P. gingivalis*, *P. micra*, *S. intermedius* und *A. actinomycetemcomitans* gewählt. *F. nucleatum* kommt in dieser Kombination nicht nur eine ätiologische Rolle bei der Parodontitis-Genese sondern auch die Funktion als Brückenbakterium zwischen Erst- und weiteren Kolonisierern zu (Kolenbrander *et al.*, 2002).

Vorab wurde die Biofilmbildung der verschiedenen Mono-Spezies Kulturen in SG- und SG-/Pro untersucht. Für *S. salivarius* und *A. actinomycetemcomitans* konnte nur in SG- eine Biofilmbildung nachgewiesen werden. *S. intermedius* bildete sowohl in SG- als auch in SG-/Pro einen Biofilm aus (Abbildung 38A1). Dagegen war von den obligat anaeroben Bakterien nur *F. nucleatum* ATCC 25586 in der Lage, Biofilmstrukturen, und dies nur in SG-/Pro, auszubilden (Abbildung 38A2).

Die Zwei-Spezies Kombination *F. nucleatum* / *S. mitis* zeigte in beiden Medien keine Biofilmbildung, während die Kombination mit *S. salivarius* zumindest in SG- in einer Biofilmbildung resultierte (Abbildung 38B1). In Kombination mit *S. intermedius* konnte in beiden Medien eine Biofilmbildung gezeigt werden, während die Kombinationen mit den anderen Parodontitis-assoziierten Organismen nur in SG-/Pro zur Biofilmbildung führte (s. Abbildung 38B1 bzw. B2).

Abbildung 38A1)

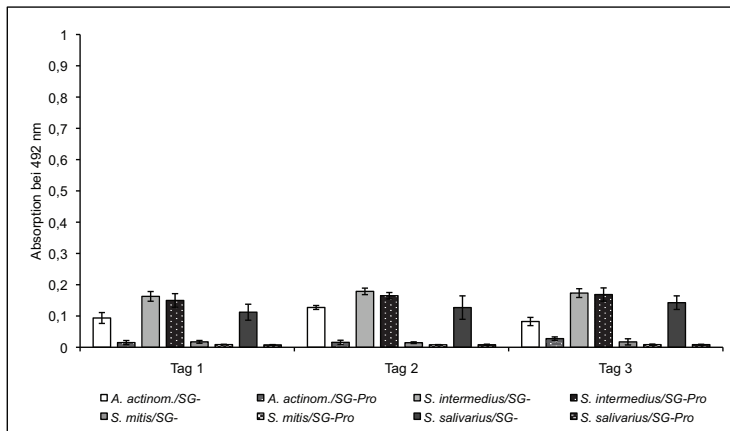


Abbildung 38A2)

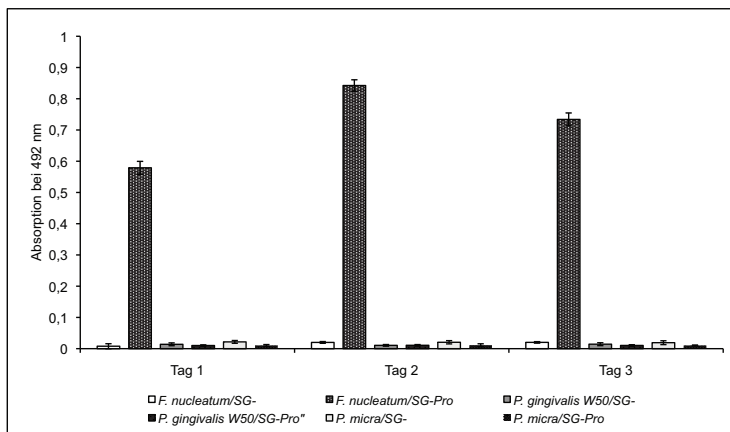


Abbildung 38B1)

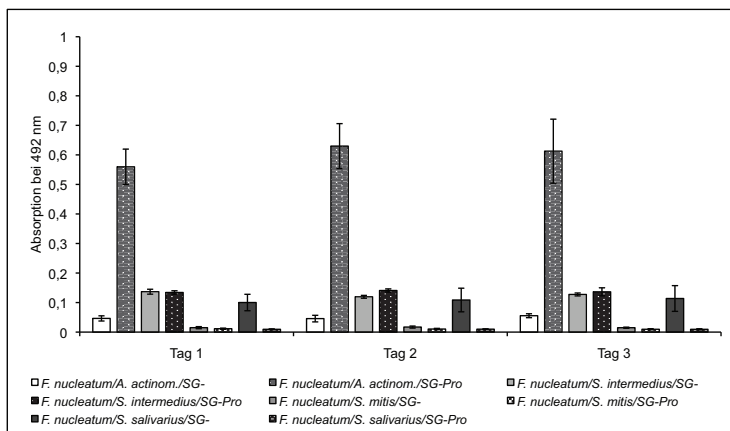


Abbildung 38B2)

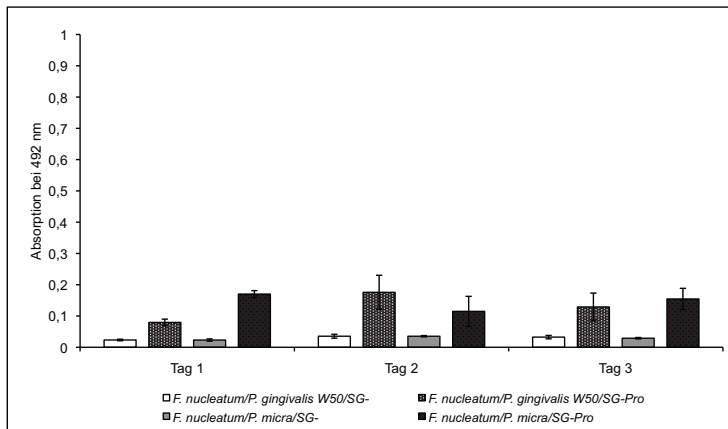


Abbildung 38: Biofilmbildung von oralen Bakterienspezies alleine und in Kombinationen mit *F. nucleatum* ATCC 25586 in den Kulturmedien SG- und SG-/Pro. A1) und A2) Biofilm-Masse-Bestimmungen für die Monokulturen in SG- und SG-/Pro mittels Safranin-Färbung. B1) und B2) Biofilm-Masse-Bestimmungen für die Zwei-Spezies Kombinationen in SG- und SG-/Pro mittels Safraninfärbung.

Im Vergleich aller Zwei-Spezies Kombinationen zeigte nur die Kombination *A. actinomycetemcomitans* / *F. nucleatum* ähnlich grosse Biofilm-Massen wie die *F. nucleatum* Monokultur. In allen anderen Kombinationen ergab die Safraninfärbung geringere Werte. Zudem zeigte die *S. intermedius* Monokultur ähnliche Biofilm-Massen wie die Kombination *S. intermedius* / *F. nucleatum*.

Rasterelektronenmikroskopische Studien der bakteriellen Interaktionen in SG-/Pro wurden anschließend für *F. nucleatum* in Kombination mit *S. mitis*, *S. salivarius*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. micra* und *P. gingivalis* W50 durchgeführt. Die Kombinationspartner von *F. nucleatum* ATCC 25586 waren in dessen Biofilmstrukturen integriert, wobei *F. nucleatum* das dominante Bakterium auf der Oberfläche war. Die Zwei-Spezies Kombination mit *S. salivarius* und *S. mitis* zeigte dagegen, dass kaum Bakterien auf der Oberfläche gebunden vorlagen (Abbildung 39).

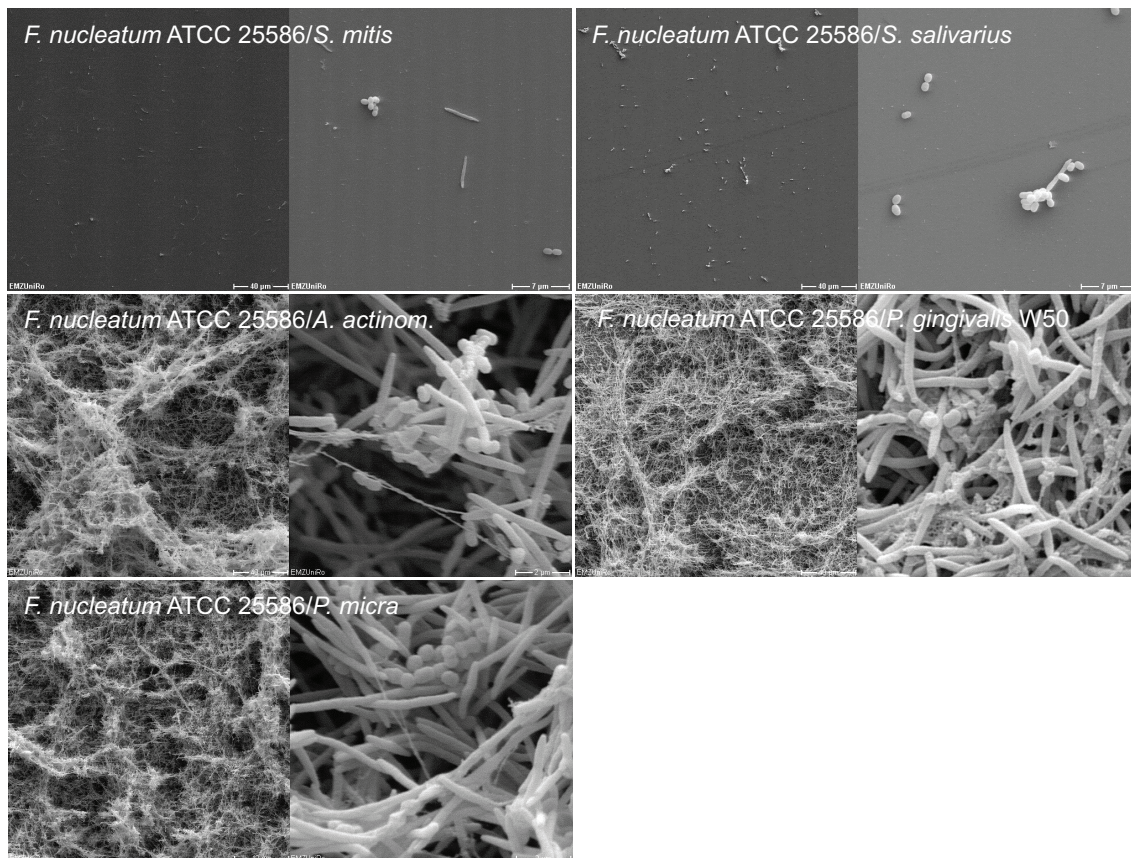


Abbildung 39: REM-Analysen der Biofilmbildung von *F. nucleatum* ATCC 25586 in Kombination mit *S. mitis*, *S. salivarius*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. micra* und *P. gingivalis* W50 im Kulturmedium SG-/Pro. Vergrößerungsfaktoren: *F. nucleatum* ATCC 25586 mit *S. mitis* bzw. *S. salivarius* 500x und 3000x, mit *A. actinomycetemcomitans*, *P. micra* und *P. gingivalis* W50 500x und 10 000x.

Eine Studie von Kaplan und Kollegen zeigte, dass der *F. nucleatum* Stamm ATCC 23726 mit *S. sanguinis* ko-aggregieren kann und diese Eigenschaft durch die Gegenwart von Pronase aufgehoben wird (Kaplan *et al.*, 2003). Daraufhin wurde die Biofilmbildung von *F. nucleatum* ATCC 23726 in SG bzw. SG- (mit und ohne Pronase) geprüft. Anders als *F. nucleatum* ATCC 25586 baute dieser Stamm unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen in keinem der Medien Biofilmstrukturen auf (Abbildung 40).

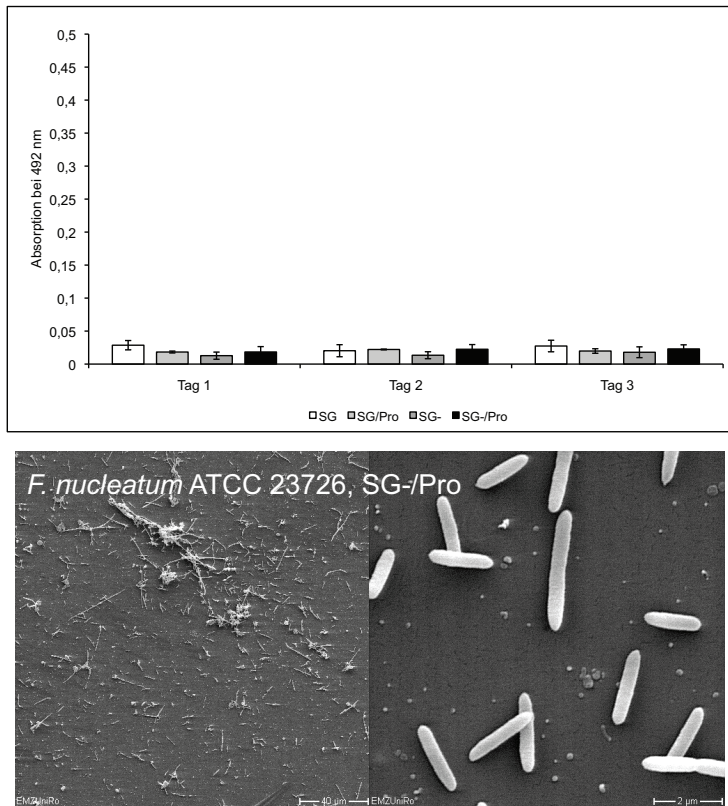


Abbildung 40: Analyse der Biofilmbildung von *F. nucleatum* ATCC 23726 in vier Kulturmedien (SG, SG-, SG/Pro und SG-/Pro). Die Bestimmung der Biofilm-Masse erfolgte mittels Safranin-Färbung. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten nach Wachstum in SG-/Pro und sind mit einer Vergrößerung von 500x und 10 000x dargestellt. SG – künstlicher Speichel/Galaktose, SG- - künstlicher Speichel/Galaktose ohne Mucin, SG/Pro – künstlicher Speichel/Galaktose mit Pronase, SG-/Pro – künstlicher Speichel/Galaktose ohne Mucin mit Pronase.

Auch in Kombination mit *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *S. mitis* oder *S. salivarius* war *F. nucleatum* ATCC 23726 nicht in der Lage Biofilmstrukturen zu bilden, wie sie für *F. nucleatum* ATCC 25586 in Kombination mit den genannten Bakterien beobachtet wurde.

Da Pronase einen Effekt auf die Biofilmbildung des in dieser Studie verwendeten *F. nucleatum* ATCC 25586, nicht aber auf *F. nucleatum* ATCC 23726 hatte, wurde der Einfluss des Enzymgemisches auf die Zellstruktur/Zelloberflächenstruktur untersucht. Dazu wurde zunächst eine Analyse mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) durchgeführt. Als Proben dienten Biofilmzellen von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Inkubation in SG-/Pro und als Kontrolle die Mischung aus adhärenen und planktonischen Zellen von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Wachstum in SG-. Hierzu belegt die Abbildung 41 Unterschiede an der Zelloberfläche, aber auch im Zell-Durchmesser der Bakterien nach Inkubation in den zwei Medien.

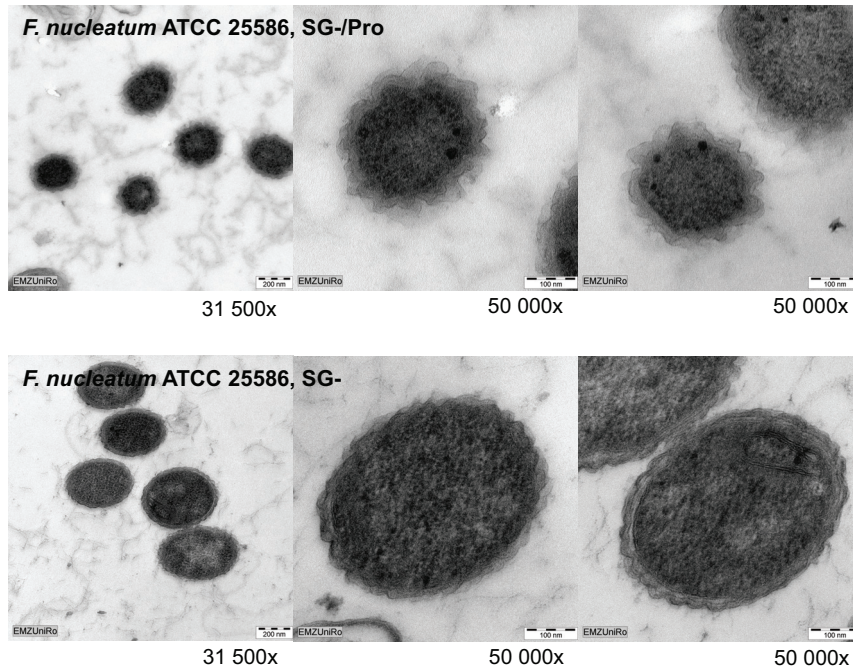


Abbildung 41: TEM-Aufnahmen von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Inkubation in den Kulturmedien SG-/Pro und SG-. Vergrößerungsfaktor 31 500x und 50 000x.

Um zu überprüfen, ob diese Effekte nur bei dem hier untersuchten Stamm auftreten und damit eventuell mit der Biofilmbildung korrelieren könnten, wurden die TEM-Analysen auch für *F. nucleatum* ATCC 23726 durchgeführt. Dafür wurden die planktonischen Zellen nach Wachstum in SG- und in SG-/Pro untersucht. Anders als für den Stamm ATCC 25586 wurden jedoch keine Änderungen der Oberflächenstruktur entdeckt (Abbildung 42).

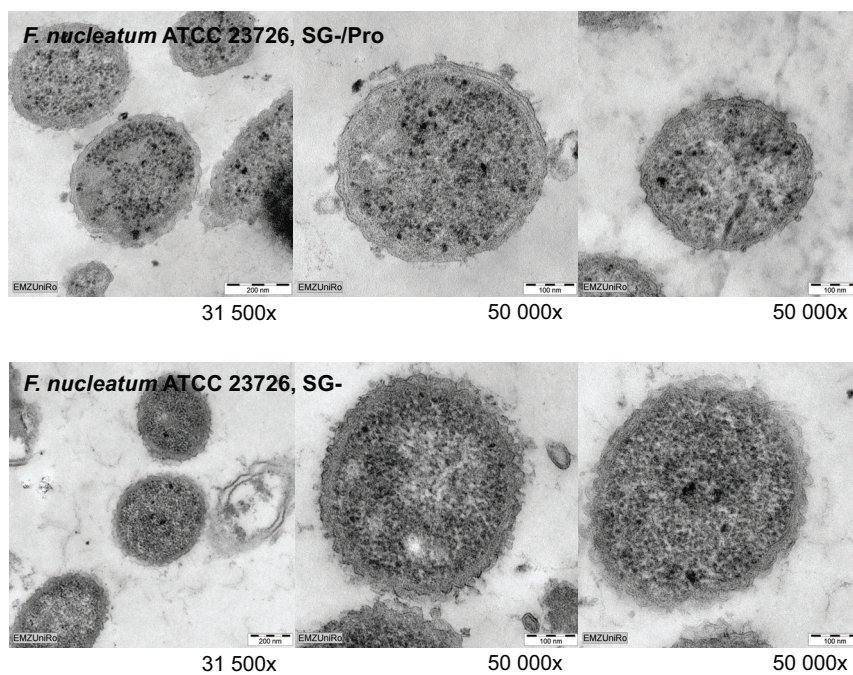


Abbildung 42: TEM-Aufnahmen von *F. nucleatum* ATCC 23726 nach Inkubation in den Kulturmedien SG-/Pro und SG-. Vergrößerungsfaktor 31 500x und 50 000x.

Aufgrund der Analysen mit dem Transmissionselektronenmikroskop wurde nun untersucht, ob die beobachteten Änderungen mit Veränderungen der löslichen und Membran-assoziierten Proteinfractionen aus den Bakterien in Verbindung zu bringen waren. Die Isolierung der Proteinfractionen erfolgte aus Bakterien nach Wachstum in SG- bzw. SG-/Pro. Die resultierenden Proteinlösungen wurden zunächst mittels 1-D SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Hierbei konnten Unterschiede im Bandenmuster sowohl bei den löslichen als auch bei den Membran-assoziierten Proteinfractionen festgestellt werden (Abbildung 43).

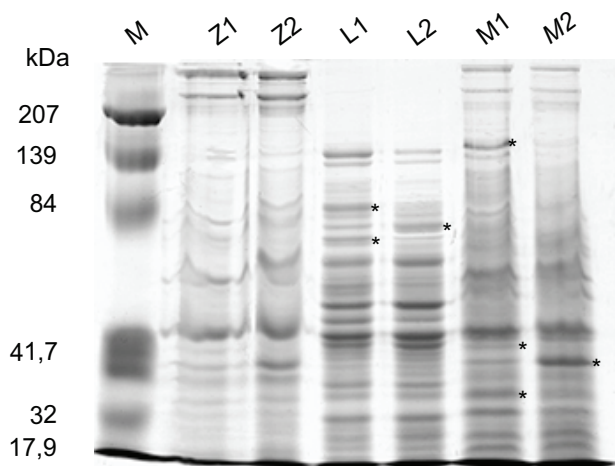


Abbildung 43: Ergebnisse einer 1-D SDS-PAGE der löslichen und Membran-assoziierten Proteinfractionen von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Kultur in den Medien SG- und SG-/Pro. Es wurden die Proteine der „Zelltrümmer“-Fraktion (Z1 und Z2), der löslichen (L1 und L2) und der Membran-assoziierten (M1 und M2) Fraktion aufgetragen. Proben mit einer 1 wurden von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Wachstum in SG-, mit einer 2 nach Wachstum in SG-/Pro gewonnen. Die mit einem Stern gekennzeichneten Banden unterscheiden sich in den jeweiligen Fraktionen nach Inkubation in den zwei Medien. Proteinkonzentration pro Spur jeweils 15 µg/ml. M – Proteinstandard.

Eine genauere Analyse der verschiedenen exprimierten Banden wurde nicht durchgeführt. Untersuchungen zum Transkriptom von *F. nucleatum* ATCC 25586 erfolgten nach Kultivierung in SG-/Pro und wurden mit dem Transkriptom nach Kultur in SG- Medium verglichen. Für die Bewertung wurden nur die Gene berücksichtigt, deren Transkripte unter den beiden Inkubationsbedingungen in mindestens 3-fach unterschiedlicher Menge vorlagen (*fold change* $\geq 3,07$). Es konnten 94 Gene ermittelt werden, deren Transkripte dieser Anforderung entsprachen. Dabei waren die Transkripte von 69 Genen nach Inkubation in SG-/Pro Medium vermehrt vorhanden, von 25 Genen dagegen in verminderter Menge. 21 dieser Gene trugen die Annotationen „Funktion bisher nicht bekannt“ bzw. „hypothetisches Protein, ohne weitere Zuordnung“.

Mit Hilfe der KEGG- sowie COGs-Datenbanken (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.jp/kegg/>, COGs: Clusters of Orthologous Groups of proteins <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) konnten 18 vermehrt und 19 vermindert exprimierte Gene metabolischen Wegen zugeordnet werden. Weitere 28 Gene wurden dem *genetic information processing* zugeordnet, wobei nur das Transkript von einem, FN1392 – SSU ribosomales Protein S16P, in vermehrter Menge vorlag. Vier verändert exprimierte Gene fielen in die Kategorie *environmental information processing*, wobei auch hier nur von einem Gen, FN1944 - ein Natrium-abhängiger Tryptophan Transporter, eine größere Transkriptmenge vorlag. Andere Gene, die mit KEGG und COGs keiner Klasse zugeordnet werden konnten, waren zum Beispiel ein Permeasegen (FN2002) und ein Gen für einen Natrium-abhängigen Tyrosin Transporter (FN1989). Das für ein Zelloberflächenprotein kodierende Gen (FN1499) konnte keiner der Hauptkategorien zugeordnet, durch die Analyse mit COGs jedoch in die Gruppe *intracellular trafficking and secretion* und *extracellular structures* eingegliedert werden.

Die nachfolgende Tabelle 18 zeigt einige stark verändert exprimierte Gene von *F. nucleatum* ATCC 25586 in SG-/Pro. In der Tabelle 25 im Anhang sind alle Gene aufgeführt und entsprechenden Clustern zugeordnet, deren Transkripte in Anwesenheit von Pronase in mindestens 3-fach veränderter Menge vorlagen.

Tabelle 18: Ausgewählte Ergebnisse der Transkriptomanalyse von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Wachstum in SG-/Pro Medium versus Wachstum in SG- Medium. Gezeigt sind nur besonders stark verändert exprimierte Gene mit einem *fold change* > 5. *up* – vermehrte, *down* – verminderte Transkriptmenge.

SEQ ID	fold change	transcript abundancy	gene info
FN0475	6,435462	down	<i>MIAB protein</i>
FN0479	6,6912346	down	<i>RNA polymerase sigma-E factor</i>
FN0480	8,9662285	down	<i>unknown</i>
FN0481	6,9420395	down	<i>unknown</i>
FN0513	6,9477324	down	<i>Flavodoxin</i>
FN1079	6,5998406	down	<i>Neutrophil-activating protein A</i>
FN1084	5,3832564	down	<i>unknown</i>
FN1251	6,7867193	down	<i>High-affinity iron permease</i>
FN1423	10,945065	down	<i>Flavoprotein</i>
FN1424	8,264772	down	<i>ACYL-COA dehydrogenase, short-chain specific</i>
FN1441	9,412109	down	<i>PTS system, fructose-specific IIBC component</i>
FN1499	5,3781843	down	<i>Cell surface protein</i>
FN1852	5,302608	down	<i>unknown</i>
FN1983	8,193458	down	<i>Alkyl hydroperoxide reductase C22 protein</i>
FN1984	7,954571	down	<i>Thioredoxin reductase</i>
FN2038	5,378853	down	<i>LSU ribosomal protein L10P</i>
FN0099	6,5604715	up	<i>Inorganic pyrophosphatase</i>
FN0435	5,8205514	up	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>
FN0630	5,604096	up	<i>PTS system, IIC component</i>
FN1391	5,648809	up	<i>Acetyltransferase</i>
FN1419	5,50574	up	<i>Methionine gamma-lyase</i>
FN1420	8,269177	up	<i>NA+/H+ antiporter NHAC</i>
FN1421	7,731255	up	<i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase</i>
FN1750	9,102935	up	<i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase</i>
FN1944	6,8834214	up	<i>Sodium-dependent tryptophan transporter</i>

Bei den hier gezeigten Daten handelt es sich um Ergebnisse, die durch unabhängige biologische Replikate noch bestätigt und statistisch abgesichert werden müssen.

3.6.2 Analysen zur Interaktion von *S. salivarius* mit *Porphyromonas gingivalis*

Im Kapitel 3.4.4 wurde demonstriert, dass zwei *P. gingivalis* Stämme (*P. gingivalis* W50, W83) jeweils in Kombination mit *S. salivarius* zu einer Biofilm-Bildung befähigt wurden, beide Bakterienarten alleine dazu aber nicht in der Lage waren. Studien mit dem Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskop sowie dem Konfokalen Laser Raster Mikroskop belegten die Pionierfunktion von *S. salivarius* bei diesem Geschehen und die Integration von *P. gingivalis* in den wachsenden *S. salivarius* Biofilm (siehe Abbildung 22). Allerdings waren die *P. gingivalis* Zellen in der Lebendkeimzählung nicht mehr nachweisbar. Die Analyse des *S. salivarius* / *P. gingivalis* Mischbiofilms mittels spezifischer Antikörper oder einer spezifischen Gram-Färbung (*Live BacLight™ Bacterial Gram Stain Kit*; *ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain and Viability Kit*) gelang nicht. Gegebenenfalls waren die Antikörper und Farbstoffmoleküle des Kits zu voluminös oder zu ungünstig geladen, um die Biofilmprobe zu durchdringen. Ersatzweise konnte die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zum Nachweis von *P. gingivalis* in Ko-Kultur mit *S. salivarius* etabliert werden. Diese Methode bestätigte zusätzlich zu den rasterelektronenmikroskopischen Studien die Anwesenheit von *P. gingivalis* im Mischbiofilm (Abbildung 44).

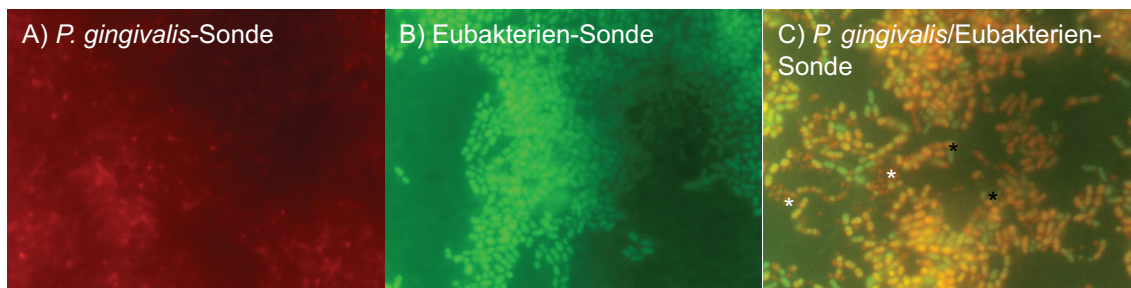


Abbildung 44: Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung des *S. salivarius* / *P. gingivalis* Mischbiofilms. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen den *S. salivarius* / *P. gingivalis* Mischbiofilm nach Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit der *P. gingivalis* Sonde Alexa Fluor 594 (A), mit der Eubakteriensonde Alexa Fluor 488 (B) und nach Hybridisierung mit beiden Sonden (C). Vergrößerung 100x, Aufnahmen Tag 1. Weiße Sternchen (*) *P. gingivalis*, Schwarze Sternchen (*) *S. salivarius*.

Allerdings zeigte sich hierbei auch, dass nach Hybridisierung mit beiden Sonden die *S. salivarius* Zellen teils grün, teils orange angefärbt waren, was auf eine unspezifische Reaktion hindeuten kann. Dabei war die Spezifität der *P. gingivalis* Sonde zuvor sowohl auf der Sequenzebene mit dem Programm „probe check“ (<http://131.130.66.200/cgi-bin/probecheck/probecheck.pl>) als auch auf praktischer Ebene an einer *S. salivarius* Monokultur getestet worden. Die Verwendung einer

spezifischen *S. salivarius* Sonde anstelle der Eubakterien-Sonde zeigte ähnliche Ergebnisse. Eine befriedigende Erklärung für diese Beobachtung konnte nicht gefunden werden.

Im Kapitel 3.5.2.2 wurde die Abhängigkeit der Biofilmbildung vom relativen Zeitpunkt der Inokulation der beiden Spezies belegt. Weiterführend wurde nun geprüft, ob die Zeitspanne des sukzessiven Animpfens eine Rolle spielt. Dazu wurden die Mischkulturen in einem Abstand von 2 oder 4 Stunden mit den beiden Ko-Inkubationspartnern beimpft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45A und B dargestellt.

Abbildung 45A)

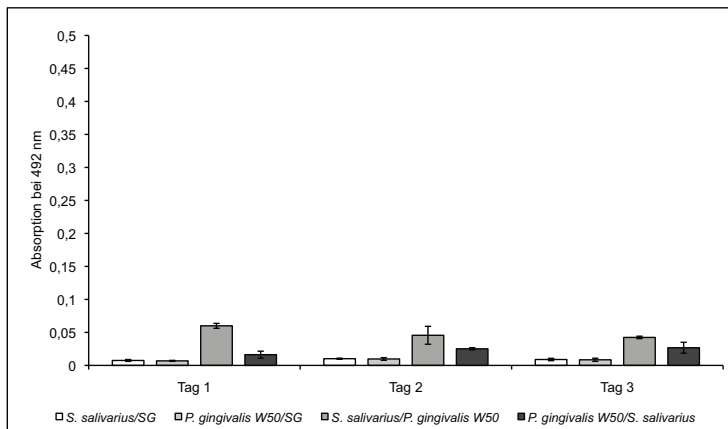


Abbildung 45B)

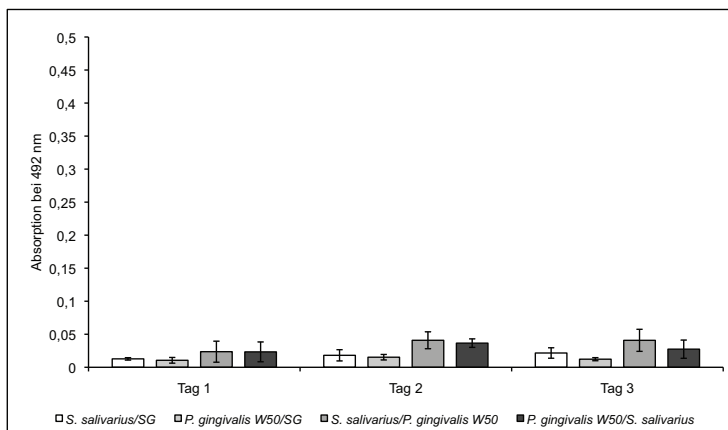


Abbildung 45: Sukzessive Inokulation von *P. gingivalis* W50 zu *S. salivarius* und vice versa in einem Zeitabstand von 2 (A) bzw. 4 Stunden (B). Dargestellt sind die Biofilm-Masse-Bestimmungen nach Safranin-Färbung am Tag 1, 2 bzw. 3 nach der um 2 Stunden (A) bzw. 4 Stunden (B) versetzten Inokulation beider Bakterienarten. Die zuerst inokulierte Bakterienart in der Zweierkombination wird jeweils als erste genannt.

Es zeigte sich, dass sowohl die Latenzperiode zwischen den zwei Inokulationen als auch die Reihenfolge der Inokulation beider Spezies eine tragende Rolle spielt. Verglichen mit der simultan angeimpften *S. salivarius* / *P. gingivalis* Kultur wurde bei einem um 2 Stunden versetzten Animpfen keine Biofilmbildung bei Inokulation von *P. gingivalis* als Erstkolonisierer und eine stark verminderte

Biofilmbildung (nur noch Bedeckung der Oberfläche) bei Verwendung von *S. salivarius* als Erstkolonisierer, beobachtet. Bei einem um 4 Stunden versetzten Animpfen beider Spezies kam, es unabhängig von der Reihenfolge der Inokulation, zu keiner Biofilmbildung in der Di-Spezies-Kultur. Die Transwell-Experimente (Kapitel 3.5.3.2) belegten, dass die Induktion des *S. salivarius* Biofilms durch *P. gingivalis* über sezernierte, diffundierende Substanzen bewirkt wurde. Eine etablierte Substanz, die Signale zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien vermitteln kann, ist der Autoinducer II der Quorum sensing Regulation der Bakterien (Xavier und Bassler, 2003; Federle, 2009). Dieser Autoinducer wird von einer Enzymserie aus S-Adenosyl-Methionin hergestellt. Zu den Syntheseenzymen gehört das LuxS Enzym. Für die aktuelle Arbeit wurde eine existierende *P. gingivalis* W50 $\Delta luxS$ Mutante von Prof. Curtis, *Blizard Institute of Cell and Molecular Science*, London, bezogen. Bei Einsatz dieser Mutante in den oben beschriebenen Experimenten zeigten sich jedoch annähernd gleiche Ergebnisse wie mit dem *P. gingivalis* W50 Wildtyp (siehe Anhang, Abbildung 59).

Als alternative Erklärung für die nur in Kombination beider Bakterienarten erfolgreiche Biofilmbildung kam der Abbau eines interferierenden Moleküls durch *P. gingivalis* in Frage. Aus den Studien mit *F. nucleatum* ATCC 25586 war Mucin als eine der Biofilmbildung entgegenwirkende Substanz bekannt, die auch auf Monospeziesbiofilme von *S. salivarius* einen supprimierenden Effekt ausübte.

Deswegen wurde die Kombination von *S. salivarius* mit *P. gingivalis* in SG- Medium inkubiert. Dies führte jedoch zu keiner weiteren Verstärkung der *S. salivarius* Biofilmbildung verglichen mit dessen Mono-Spezies Biofilmbildung in SG-. Um zu klären, ob *P. gingivalis* Mucin abbauen und damit die Biofilmbildung bewirkt haben konnte, wurde die Glykoproteinmenge des Kulturüberstandes der *S. salivarius* / *P. gingivalis* Kombination mit der in der *S. salivarius* Monokultur verglichen. Der verwendete Glykoprotein-Test (Pierce, Rockford, USA) führte jedoch zu so starken Messwertschwankungen, dass keine klaren Unterschiede zwischen den Inkubationsbedingungen erkennbar waren.

Deswegen wurde als nächstes die proteolytische Aktivität der Kulturüberstände aus der Zwei-Spezies Kombination mit denen der Mono-Spezies Kulturen verglichen. In einem orientierenden Test führte die Zugabe einer Proteaseinhibitor-Mischung zu einer Hemmung der Di-Spezies Biofilmbildung (siehe Anhang, Abbildung 60). Eine exaktere Bestimmung der proteolytischen Aktivität erfolgte aus den Kulturüberständen der Mono- und Di-Spezies Kulturen nach einer nicht-denaturierenden Proteinpräparation und anschließender Exposition gegen FITC-markiertes Casein (siehe 2.23.4). Für die Kontrolltestung wurde 500 $\mu\text{g/ml}$ Pronase eingesetzt. Der hierbei erhaltene Wert wurde gleich 100 % Proteolyseaktivität gesetzt. Der Überstand der *P. gingivalis*-Kultur hatte im Vergleich dazu eine proteolytische Aktivität von 50 %, während für den *S. salivarius* Kulturüberstand ca. 20 % dieser Aktivität ermittelt werden konnte. Für die Kombination beider Spezies wurden lediglich 15 % der proteolytischen Aktivität der Kontrolle gemessen. Dieses Resultat deutete an, dass die proteolytische

Aktivität von *P. gingivalis* in Anwesenheit von *S. salivarius* unterdrückt wurde, was gegen einen proteolytischen Abbau von Mucin bei Kombination beider Spezies sprach.

Analysen zur Bedeutung von DNase ergaben, dass weder die unmittelbare noch die spätere Zugabe dieser Substanz zu einer Induktion der Biofilmbildung oder Veränderung der Biofilm-Masse von *S. salivarius* oder *P. gingivalis* führten. Natriummetaperiodat hatte dagegen einen inhibitorischen Einfluss auf die *S. salivarius* / *P. gingivalis* Biofilmbildung.

Nun wurden die Kulturüberstände der Mono- und Di-Spezies Kulturen nach nicht-denaturierender Proteinpräparation einer 1-D Gelelektrophorese unterzogen. Die nachfolgende Abbildung 46 zeigt das Ergebnis der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

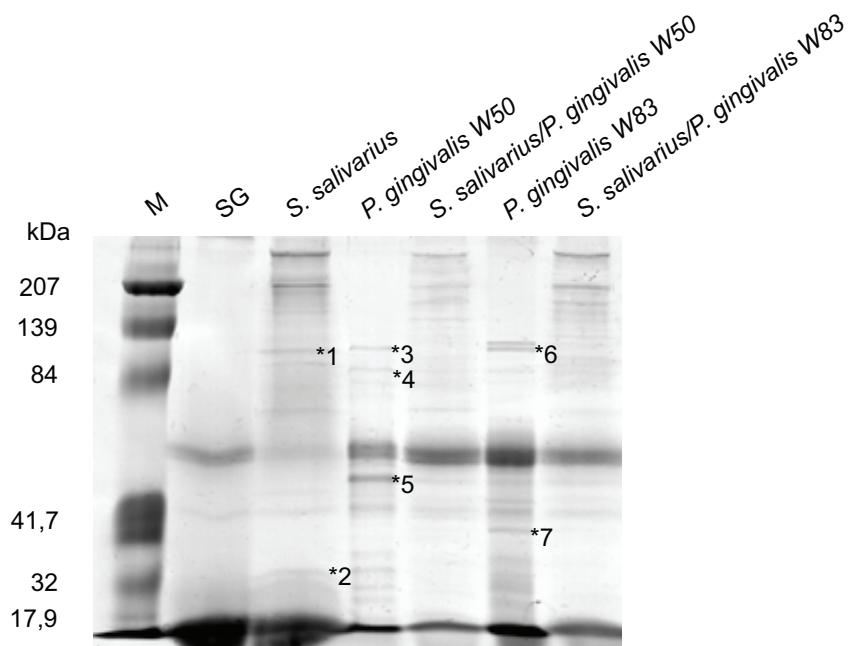


Abbildung 46: Ergebnisse einer 1-D SDS-PAGE der Kulturüberstände der *S. salivarius* und *P. gingivalis* Monokulturen sowie der *S. salivarius* / *P. gingivalis* Di-Spezies Kultur. Es wurden die Proteine der Kulturüberstände nach nicht-denaturierender Proteinpräparation aufgetragen. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Banden wurden ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Proteinkonzentration pro Spur jeweils 15 µg/ml. M – Marker, SG – künstlicher Speichel/Galaktose.

Die mit einem Stern gekennzeichneten Banden waren in der jeweiligen Zwei-Spezies Kombination nicht mehr oder nur noch sehr schwach detektierbar. Um die Proteine zu identifizieren, wurden die markierten Banden ausgeschnitten und durch Herrn Thomas Köller im Proteomzentrum Rostock einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen (siehe 2.23.7). Die Identifizierung der Proteine erfolgte in zwei unabhängigen Messungen.

In der Bande *1 fand sich die Glycosyltransferase S von *S. salivarius* (STRSA0001_2016). Aus der Bande *2 konnte die Methyltransferase (STRSA0001_1478) bzw. das Enzym der Poly-Gamma-Glutamate Biosynthese (STRSA0001_1700) dieses Bakteriums nachgewiesen werden. Bei einem

Score von 57 bzw. 58 war dieses Ergebnis jedoch als relativ unsicher einzustufen. Aus den Banden *3 und *4 konnten das Rezeptor Antigen A (*ragA*) und die Peptidylarginin Deiminase (PG_1424) von *P. gingivalis* W50 identifiziert werden. Die in dieser Spur markierte Bande *5 enthielt mehrere Proteine. Es wurden die Arginin-spezifischen Cystein-Proteineasen, Gingipain R1 (*rgpA*) bzw. R2 (*rgpB*), die Protease PrpR1 (*prpR1* jetzt *rgpA*, Curtis *et al.*, 2001) und die Cystein-Proteinase alpha-Gingivain (*cpgR*) gefunden. Gingivain ist ein Synonym zu dem heute eher gebräuchlichen Name Gingipain, und *cpgR* scheint ebenfalls für die Arginin-spezifische Cysteinprotease (RgpA) zu codieren (Tokuda *et al.*, 1998). Zudem wurde das Hemagglutinin HagE, codiert durch *hagE*, identifiziert. Aus der Bande *6 konnte wiederum das Rezeptor Antigen A (*ragA*) von *P. gingivalis* W83 bestimmt werden. Aus der Bande *7 wurde die Glycerin-Aldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH, PGN_0173) dieses Bakterienstamms identifiziert.

Die nachfolgende Tabelle 19 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 19: Ergebnisse der Massenspektrometrischen Analyse aus Überständen von *S. salivarius* und *P. gingivalis* W50 bzw. W83 Mono- bzw. Di-Spezies Kulturen. In der Analyse wurde Bandenmaterial nach einer nicht denaturierenden PAGE eingesetzt. Die untersuchten Banden kamen jeweils nur in den Monokulturen, nicht aber in den Di-Spezies-Kulturansätzen vor. Das Ergebnis der PAGE ist in Abbildung 46 dargestellt.

Ergebnisse <i>Porphyromonas gingivalis</i>						
Bande	Zugang	Gen-Name	Gen	Wert 1	Wert 2	Status
3	PAD_PORGI	Peptidylarginine deiminase	PG_1424	70	69	identifiziert
3	Q9ZA60_PORGI	Receptor antigen (RagA)	ragA	194	226	identifiziert
4	PAD_PORGI	Peptidylarginine deiminase	PG_1424	58	67	identifiziert
4	Q9ZA60_PORGI	Receptor antigen (RagA)	ragA	185	186	identifiziert
5	CPG1_PORGI	Gingipain R1	rgpA	63	70	identifiziert
5	CPG2_PORGI	Gingipain R2	rgpB	108	94	identifiziert
5	Q51818_PORGI	Cysteine proteinase alpha-gingivain	cpgR	120	118	identifiziert
5	Q51838_PORGI	Protease	prpR1	69	87	identifiziert
5	Q9R9B7_PORGI	Hemagglutinin E	hagE	60	76	identifiziert
6	Q9ZA60_PORGI	Receptor antigen (RagA)	ragA	166	242	identifiziert
7	B2RH47_PORGI	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase type I	PGN_0173	266	233	identifiziert
Ergebnisse <i>Streptococcus salivarius</i>						
Bande	Zugang	Gen-Name	Gen	Wert 1	Wert 2	Status
1	C2LQF0_STRSL	Glucosyltransferase-S	STRSA0001_2016	131	139	identifiziert
u2	C2LPW8_STRSL	Methyltransferase	STRSA0001_1478	57		unsicher
u2	C2LTK4_STRSL	Enzyme of poly-gamma-glutamate biosynthesis	STRSA0001_1700		58	unsicher

Zur Komplementation der Proteomanalyse wurde das Transkriptom von *P. gingivalis* W83 in Ko-Kultur mit *S. salivarius* K12 untersucht. Zum Vergleich diente das Transkriptom der *P. gingivalis* W83 Monokultur. Die Untersuchung des Transkriptoms erfolgte in 3 unabhängigen Versuchen (3 biologische Replikate). In Summation aller drei Analysen fand sich für 201 *P. gingivalis* Gene eine durch die Anwesenheit von *S. salivarius* bedingte mindestens dreifach gegenüber der Monokultur veränderte Expression. Dabei lagen die Transkripte von 34 Genen in verminderter und von 168 Genen in vermehrter Menge vor.

Die Annotation der Gene erfolgte mit Hilfe der KEGG-Datenbank sowie der COGs-Datenbank von NCBI. Auf dieser Basis wurden 132 Gene (10 vermindert und 122 verstärkt exprimierte) in die Kategorie für hypothetische, oder konservierte hypothetische Proteine eingeordnet. Weitere 27 Gene konnten durch beide Datenbanken nicht klassifiziert werden. Die restlichen Gene wurden den

Bereichen *cellular processes* (9), *genetic information processing* (16), *metabolism* (16) und *environmental information processing* (2) zugeordnet. Bei den vermindert exprimierten Genen fielen besonders die Gene für ribosomale Proteine (um das 6,8- bzw. 5,1-fache verminderte Transkriptmenge von *ragA* bzw. *hagE*) auf. Dies korreliert mit den Resultaten der Proteomanalyse (Tabelle 19). Unter den verstärkt exprimierten Genen fanden sich zahlreiche Transposongene. In Tabelle 20 sind einige in ihrer Expression stark veränderte Gene und in Tabelle 26 im Anhang alle mindestens 3-fach in ihrer Expression veränderten Gene aufgelistet.

Tabelle 20: Ausgewählte Ergebnisse der Transkriptomanalyse des *S. salivarius* / *P. gingivalis* W83 Mischbiofilms. Gezeigt sind nur besonders stark verändert exprimierte Gene mit einem *fold change* > 5. *up* – vermehrte, *down* – verminderte Transkriptmenge.

SEQ ID	fold change	transcript abundancy	gene Info
PG_0185	6,8568287	down	<i>ragA</i> protein
PG_0186	5,340077467	down	<i>lipoprotein RagB</i>
PG_0690	5,280439933	down	<i>4-hydroxybutyrate CoA-transferase</i>
PG_0900	6,3631274	down	<i>cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I</i>
PG_1810	5,086231833	down	<i>2-oxoglutarate oxidoreductase, beta subunit</i>
PG_1914	5,303296267	down	<i>ribosomal protein S13</i>
PG_1915	6,188045433	down	<i>ribosomal protein L36</i>
PG_1916	5,567800033	down	<i>translation initiation factor IF-1</i>
PG_1931	5,5476145	down	<i>ribosomal protein L16</i>
PG_2024	5,091026667	down	<i>hemagglutinin protein HagE</i>
PG_2102	6,408169433	down	<i>immunoreactive 61 kDa antigen PG91</i>
PG_0214	5,4759043	up	<i>RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily</i>
PG_0679	7,155510667	up	<i>outer membrane efflux protein</i>
PG_0680	5,610080667	up	<i>efflux transporter, MFP component, RND family</i>
PG_0682	5,7594317	up	<i>ABC transporter, permease protein, putative</i>
PG_0821	6,4162748	up	<i>lipoprotein, putative</i>
PG_0872	7,253474333	up	<i>mobilizable transposon, xis protein</i>
PG_0874	7,2203231	up	<i>mobilizable transposon, int protein</i>
PG_0875	6,215983067	up	<i>mobilizable transposon, tnpA protein</i>
PG_1436	6,1800668	up	<i>ATPase, putative</i>
PG_1441	7,4446808	up	<i>lysozyme-related protein</i>
PG_1467	5,679991533	up	<i>methyltransferase, UbiE/COQ5 family</i>
PG_1475	5,5466774	up	<i>conjugative transposon protein TraN</i>
PG_1476	7,465976333	up	<i>conjugative transposon protein TraM</i>
PG_1479	5,0377669	up	<i>conjugative transposon protein TraJ</i>
PG_1480	7,503812	up	<i>conjugative transposon protein TraI</i>
PG_1481	6,877498967	up	<i>conjugative transposon protein TraG</i>
PG_1482	6,2399251	up	<i>conjugative transposon protein TraF</i>
PG_1483	7,7257072	up	<i>conjugative transposon protein TraE</i>
PG_1486	7,434132333	up	<i>conjugative transposon protein TraA</i>
PG_1490	5,8571087	up	<i>TraG family protein</i>
PG_1495	7,973012133	up	<i>DNA topoisomerase III</i>
PG_1503	5,7337048	up	<i>LytB-related protein</i>
PG_1504	5,876280767	up	<i>NAD dependent protein</i>
PG_1505	5,7941441	up	<i>radical SAM domain protein</i>
PG_1509	7,893351433	up	<i>HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 1 family protein</i>
PG_1570	6,825083267	up	<i>rhodanese-like domain protein</i>
PG_2013	6,0914442	up	<i>CRISPR-associated protein Cas2</i>
PG_2038	5,8247917	up	<i>N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, putative</i>
PG_2109	6,2490799	up	<i>hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamin-phosphate pyrophosphorylase</i>

3.6.3 Untersuchungen zur Interaktion von *S. sanguinis* mit *S. mitis*

Bei Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit *S. sanguinis* DSM 20567 bzw. SK36 kam es im Vergleich zu den Monokulturen zu einer Verminderung der Biofilm-Masse (siehe Kapitel 3.3.2; Anhang Abbildung 61). Dabei wies *S. sanguinis* DSM 20567 innerhalb von 24 Stunden Ko-Inkubation eine im Vergleich zur

Monokultur unveränderte Lebendkeimzahl auf, während dieser Wert für *S. sanguinis* SK 36 um 3 Zehnerpotenzen gegenüber der Monokultur geringer ausfiel (10^8 in der Mono-Spezies Kultur, 10^5 in der Kombination mit *S. mitis*, Tag1).

S. mitis zeigte in der Monokultur keine Biofilmbildung, während die Biofilmbildung bei *S. sanguinis* DSM 20567 und SK 36 nach 5 Stunden Inkubation einsetzte. Bei Ko-Inkubation änderte sich nichts an der zeitlichen Latenz der Biofilmbildung, allerdings war die Biofilm-Masse geringer als in den Mono-Spezies Kulturen. Der pH-Wert im Kulturüberstand der Kombination war höher als für die *S. mitis* Mono-Spezies Kultur (4,94 und 4,91 vs. 4,78 nach 12 Stunden), jedoch geringer als für die beiden *S. sanguinis* Stämme (5,57 bzw. 5,4 nach 12 Stunden). In der nachfolgenden Abbildung 47 sind die Resultate der Untersuchung dargestellt.

Abbildung 47A)

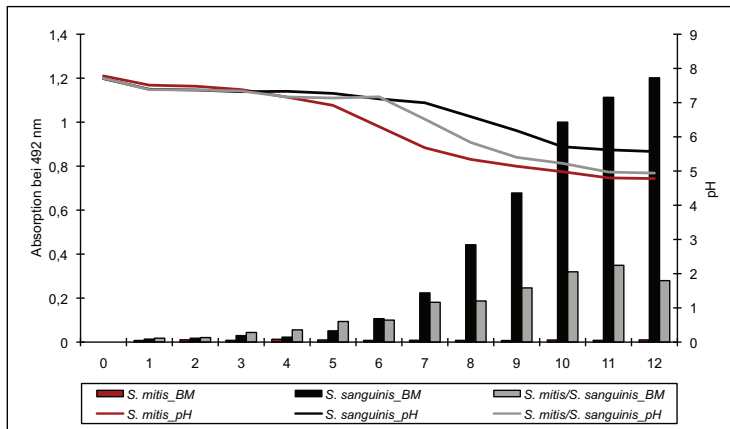


Abbildung 47B)

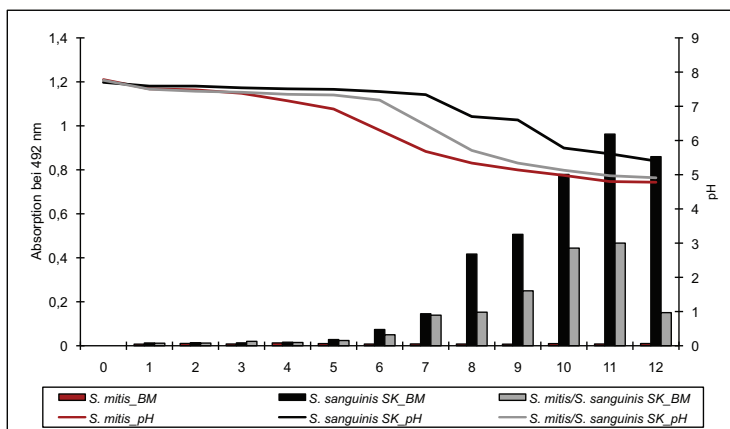


Abbildung 47: Biofilmentwicklung und Verlauf des pH-Werts im Kulturüberstand von *S. mitis*, *S. sanguinis* DSMZ 20567 bzw. SK36 Monokulturen, sowie der Kombination von je einem *S. sanguinis* Stamm mit *S. mitis*. A) Biofilmentwicklung und Verlauf des pH-Werts im Kulturüberstand von *S. mitis*, *S. sanguinis* DSM 20567 und der Kombination beider Stämme. B) Biofilmentwicklung und Verlauf des pH-Werts im Kulturüberstand von *S. mitis*, *S. sanguinis* SK36 und der Kombination beider Stämme. *S. sanguinis* –

S. sanguinis DSMZ 20567, *S. sanguinis* SK – *S. sanguinis* SK36. Das Kulturmedium war in allen Fällen CDM/Saccharose. BM – Biofilm-Masse.

In Untersuchungen zur Wachstumskinetik erreichte *S. mitis* in CDM/Saccharose die exponentielle Wachstumsphase schneller als *S. sanguinis* DSM 20567. Um zu überprüfen, ob das schnellere Wachstum die Biofilm-Masse von *S. sanguinis* beeinflusst, wurde das Wachstum beider Spezies in CDM/Saccharose ohne Arginin (CS-A) untersucht. Arginin ist für anabole und katabole (Produktion von Ammoniak) Reaktionen im Metabolismus von *S. mitis* essentiell, so dass der Mangel an Arginin im Medium das Wachstum dieser Spezies beeinflusst (Hiraoka *et al.*, 1987). Entsprechend wuchs auch in der aktuellen Arbeit *S. mitis* in CS-A nicht, aber auch beide *S. sanguinis* Stämme deutlich langsamer (siehe Anhang, Abbildung 62).

In Ko-Kulturen von *S. mitis* mit *S. sanguinis* DSM 20567 bzw. SK 36 in CDM/Saccharose ohne Arginin hatte der *S. mitis* Stamm keinen bzw. nur einen abgeschwächten inhibitorischen Effekt auf die *S. sanguinis* SK36 bzw. DSM 20567 Biofilmbildung. In Abbildung 48 sind die Ergebnisse der Biofilm-Masse-Bestimmungen nach Wachstum in CDM/Saccharose (CS) und CDM/Saccharose ohne Arginin (CS-A) und anschließender Safranin-Färbung für die Di-Spezies Kulturen *S. mitis* / *S. sanguinis* DSM 20567 bzw. SK36 aufgeführt.

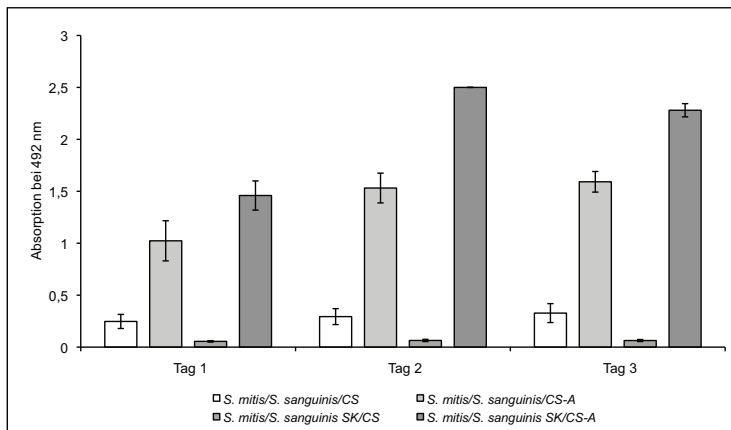


Abbildung 48: Biofilm-Masse-Bestimmungen der *S. mitis* / *S. sanguinis* DSM 20567 und *S. mitis* / *S. sanguinis* SK36 Zwei-Spezies Kombination nach Wachstum in CDM/Saccharose mit und ohne Arginin. Der Graph zeigt die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung. *S. sanguinis* – *S. sanguinis* DSM 2057, *S. sanguinis* SK – *S. sanguinis* SK36, CS – CDM/Saccharose, CS-A – CDM/Saccharose ohne Arginin.

Die Lebendkeimzahlen der Zwei-Spezies Kombinationen in CS-A unterschieden sich kaum von denen der Mono-Spezies Kulturen in CS-A. Alle drei Stämme waren über den Untersuchungszeitraum von 3 Tagen kultivierbar.

Die pH-Werte in den Kulturüberständen der *S. mitis* / *S. sanguinis* DSM 20567 Ko-Kultur war bei Wachstum in CS-A nur geringfügig höher als bei Wachstum in CS (Tabelle 21).

Tabelle 21: Lebendkeimzahlen von *S. mitis*, *S. sanguinis* DSM 20567 und SK 36 in CDM/Saccharose ohne Arginin (CS-A). Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Durch vorsichtiges Waschen am Ende der Inkubationszeit wurden die planktonischen Bakterien vor der Zählung aus dem Ansatz entfernt. Die Keimzahl ist immer für das nicht in Klammern geschriebene Bakterium angegeben.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3
<i>S. mitis</i> ATCC 11843	1,58E+05	3,15E+04	3,05E+03
<i>S. sanguinis</i> DSM 20567	1,40E+08	2,46E+07	3,00E+03
<i>S. sanguinis</i> SK 36	2,03E+08	7,22E+06	1,57E+05
<i>S. mitis</i> /(<i>S. sanguinis</i> DSM 20567)	1,50E+05	1,00E+04	5,00E+02
(<i>S. mitis</i>)/ <i>S. sanguinis</i> DSM 20567	2,78E+08	7,96E+07	1,00E+03
<i>S. mitis</i> /(<i>S. sanguinis</i> SK36)	1,43E+06	3,50E+04	3,93E+03
(<i>S. mitis</i>)/ <i>S. sanguinis</i> SK36	2,47E+08	1,44E+07	1,05E+05
pH	Tag 1	Tag 2	Tag 3
<i>S. mitis</i> / <i>S. sanguinis</i> DSM 20567 in CS	4,67	4,63	4,63
<i>S. mitis</i> / <i>S. sanguinis</i> DSM 20567 in CS-A	4,82	4,75	4,77

Das sukzessive Animpfen von Biofilm-Ko-Kulturen zuerst mit *S. mitis* und nach 24 h mit *S. sanguinis* DSM 20567 bzw. SK 36 führte zu einer geringeren Biofilm-Masse als für die *S. sanguinis* Monokulturen. Bei umgekehrter Reihenfolge der Inokulation glichen dagegen die Biofilm-Massen denen der *S. sanguinis* Monokultur (siehe Abbildung 26B und Abbildung 27B).

Weiterführend wurde geprüft, ob die Zeitspanne des sukzessiven Animpfens eine Rolle spielt. Dazu wurden die Mischkulturen in einem Abstand von 2 oder 4 Stunden mit den beiden Ko-Inkubationspartnern beimpft. Hierbei wurde eine gegenüber der *S. sanguinis*-Monokultur unterschiedlich stark verringerte Biofilmbildung für die Kombination *S. sanguinis* DSM 20567 bzw. SK 36 mit *S. mitis* sowohl bei einem um 2 Stunden als auch bei einem um 4 Stunden versetzten Animpfen beobachtet.

Die umgekehrte Reihenfolge, d. h. erst *S. mitis*, dann *S. sanguinis* DSM 20567 oder SK 36, mit einem Abstand von 2 Stunden führte im Vergleich zur *S. sanguinis* Monokultur zu einer Verminderung der Biofilm-Masse. Bei einem Abstand von 4 Stunden war dieser Effekt nur mit dem Stamm DSM 20567 zu verzeichnen (Abbildung 49A1/A2).

Abbildung 49A1)

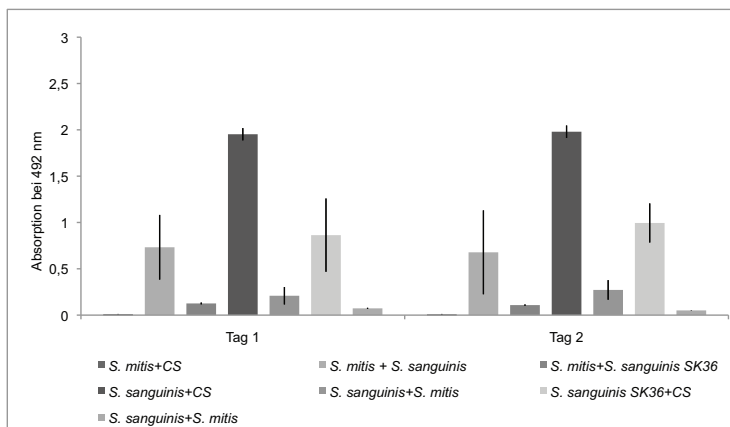


Abbildung 49A2)

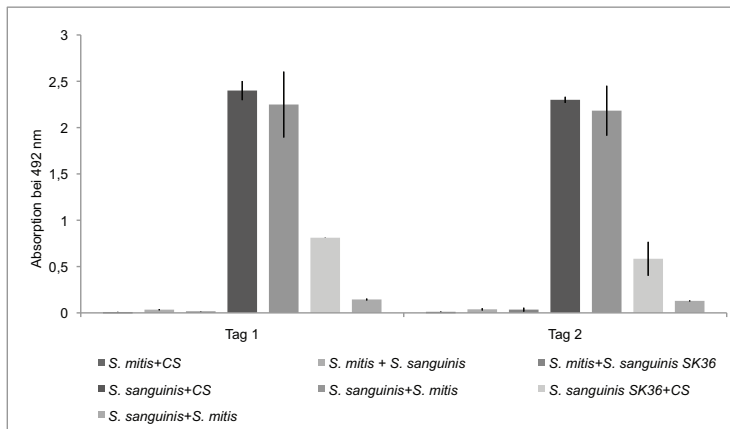


Abbildung 49B)

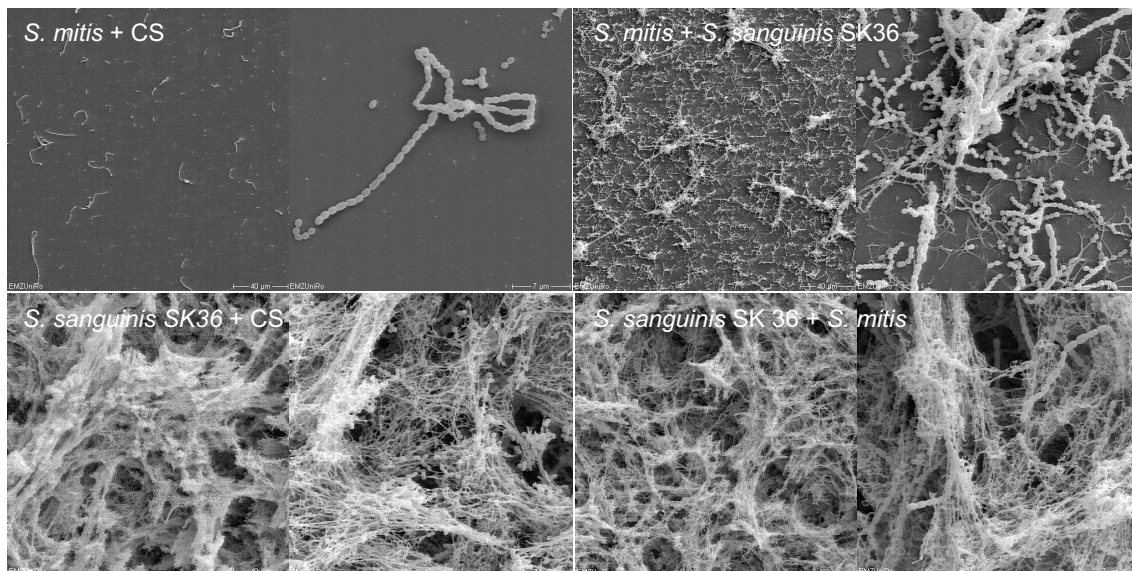


Abbildung 49: Sukzessive Inokulation von *S. mitis* zu *S. sanguinis* DSM 20567 bzw. *S. sanguinis* SK36 und *vice versa* mit 2- und 4-stündiger Latenz. Biofilm-Masse-Bestimmung mittels Safranin-Färbung 1 und 2 Tage nach dem um 2 Stunden (A1) bzw. 4 Stunden (A2) versetzten Animpfen. B) Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie exemplarisch für Tag 1 nach dem um 4 Stunden versetzten Animpfen. Der zuerst genannte Keim einer Kombination wurde zuerst ins Medium geimpft. Kulturmedium war in jedem Fall CDM/Saccharose. Vergrößerung jeweils 500x und 3000x.

Damit war gezeigt, dass *S. mitis* als Erstkolonisierer (im Gegensatz zu den entsprechenden Untersuchungen im Transwell-System) bei direktem Kontakt mit seinem Kombinationspartner zu einer Verminderung (simultanes und um 2 Stunden versetztes Animpfen) bzw. Verhinderung (4 Stunden versetztes Animpfen) der Biofilmbildung von *S. sanguinis* führte.

Die Lebendkeimzahlen für *S. sanguinis* DSM 20567 und SK36 nahmen in Gegenwart von *S. mitis* unabhängig von der Reihenfolge und den Latenzzeitspannen der Inokulation schneller ab als es für die Mono-Spezies der Fall war. Die Lebendkeimzahlen für *S. mitis* waren dagegen fast unverändert, wenn

dieser mit einem Abstand von 2 Stunden zuerst in eine Mischkultur eingimpft wurde. Die sukzessive Inokulation von *S. sanguinis* DSM 20567 bzw. *S. sanguinis* SK36 zu *S. mitis* in einem Abstand von 4 Stunden führte dagegen zu einer Zunahme der Lebendkeimzahlen von *S. mitis*.

Das nachgeschaltete Zuimpfen von *S. mitis* zu *S. sanguinis* DSM 20567 führte zu einem Anstieg der *S. mitis* Lebendkeimzahlen im Vergleich zur Monokultur, während in der Kombination mit *S. sanguinis* SK36 dieser Wert innerhalb von 2 Tagen auf 0 sank (siehe Anhang, Tabelle 27).

Für zwei *S. mitis* Stämme BA und BMS wurde von van Hoogmoed und Kollegen eine Biotensid-Produktion beschrieben (van Hoogmoed *et al.*, 2000). Mittels dieses Biotensids ließ sich die Biofilmbildung des *S. mutans* NS Stamms unterdrücken. Zur Erklärung der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurde nun geprüft, ob der in dieser Arbeit verwendete *S. mitis* Stamm Biotenside mit einer inhibitorischen Wirkung auf die Biofilmbildung von *S. sanguinis* produzierte. Die Isolierung des möglichen Biotensids erfolgte nach dem Protokoll der o. g. Autoren (siehe 2.17) aus den Überständen von 4 und 24 Stunden *S. mitis* Kulturen (Biotensid 4 – BS4 und Biotensid 24 – BS24). Die Präparate wiesen keine inhibitorische Wirkung auf die Biofilmbildung von *S. sanguinis* DSM 20567, wohl aber gegen die von *S. sanguinis* SK36 auf. Exemplarisch ist dies in Abbildung 50 für die Wirkung von BS4 dargestellt.

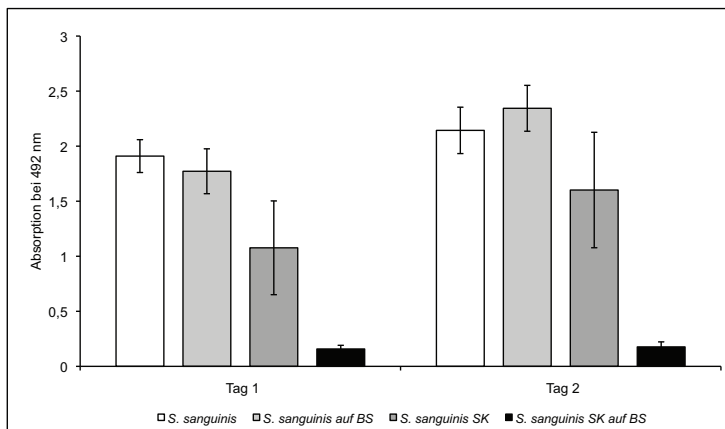


Abbildung 50: Biofilmbildung von *S. sanguinis* DSM 20567 und *S. sanguinis* SK36 nach einer Oberflächenbeschichtung mit *S. mitis* Biotensid 4 (BS4). Dargestellt ist die Biofilm-Masse-Bestimmung mittels Safranin-Färbung nach Inkubation der Bakterien auf unbeschichteter bzw. mit Biotensid-beschichteter Oberfläche. BS – Biotensid.

Um den Biofilm-supprimierenden Einfluss von *S. mitis* auf *S. sanguinis* auf molekularer Ebene zu erklären, wurden Transkriptomanalysen der Ko-Kultur von *S. sanguinis* SK36 mit *S. mitis* sowie der Mono-Spezies Kultur von *S. sanguinis* SK36 durchgeführt. Die Experimente erfolgten in zwei unabhängigen Versuchen und es wurden nur die Gene mit mindestens dreifach veränderter Transkriptmenge in die weitere Analyse aufgenommen (*fold change* $\geq 3,07$). Die Annotation der Gene und Gen-Produkte erfolgte mit Hilfe der KEGG-Datenbank bzw. der COGs-Datenbank von NCBI.

Die Ko-Kultur beider Spezies verursachte eine Änderung der Genexpression von *S. sanguinis* SK36 bei insgesamt 95 Genen, wobei für 79 geringere und für 16 größere Transkriptmengen vorlagen. 28 Gene kodierten für hypothetische Proteine. Weitere 23 Gene (7 vermehrt, 16 vermindert exprimiert) konnten dem *genetic information processing*, 23 Gene (2 vermehrt, 21 vermindert exprimiert) dem *metabolism* und 9 Gene (1 vermehrt, 8 vermindert exprimiert) dem *environmental information processing* zugeordnet werden. Bei letzterem hatten 4 Gene auch eine Funktion im *metabolism* bzw. *genetic information processing*. In den Bereich *cellular processes* konnten 7 Gene (1 vermehrt, 6 vermindert exprimiert) eingeordnet werden, wobei 3 auch der Klasse *genetic information processing* zugeordnet werden konnten. 10 Gene konnten nicht klassifiziert werden.

Unter den vermindert exprimierten Genen fanden sich vor allem für Chaperone kodierende Gene (SSA_0225, SSA_0226, SSA_2005, SSA_2007, SSA_2190). Besonders stark exprimiert wurden dagegen die für die ATPase bzw. Permease Komponenten eines ABC-Transporters für antimikrobielle Peptide kodierenden Gene SSA_2249 und SSA_2250.

Die nachfolgende Tabelle 22 zeigt einige der in der Zwei-Spezies Kombination in ihrer Expression veränderten *S. sanguinis* SK36 Gene. In der Tabelle 28 im Anhang sind alle Gene aufgeführt und entsprechenden Clustern zugeordnet, deren Transkripte in mindestens 3-fach veränderter Menge vorlagen.

Tabelle 22: Ausgewählte Ergebnisse der Transkriptomanalyse der *S. sanguinis* SK36 / *S. mitis* Ko-Kultur. Gezeigt sind nur besonders stark verändert exprimierte Gene mit einem *fold change* > 5. *up* – vermehrte, *down* – verminderte Transkriptmenge.

SEQ_ID	fold change	transcript abundance	gene info
SSA_0055	6,58117675	down	PTS system, IIC component, putative
SSA_0085	6,76776745	down	V-type sodium ATPase, subunit I, putative
SSA_0225	6,6480583	down	10 kDa chaperonin
SSA_0226	5,4908443	down	60 kDa chaperonin
SSA_0303	5,61987475	down	surface protein C
SSA_0348	5,7118487	down	CAAX amino terminal protease family, putative
SSA_0349	7,9029497	down	Transcriptional regulator, TetR/AcrR family, putative
SSA_0669	6,9676955	down	ATP dependent protease, putative
SSA_0702	9,2931825	down	Aconitase A, putative
SSA_0703	9,0687205	down	Citrate synthase, putative
SSA_0704	7,52756165	down	Isocitrate dehydrogenase [NADP], putative
SSA_0706	7,53615825	down	RNA helicase, putative
SSA_1220	9,87257175	down	DNA gyrase A subunit, putative
SSA_1298	6,44575075	down	Maltose/maltodextrin ABC transporter, sugar-binding protein MalX, putative
SSA_1482	6,3721695	down	Pullulanase, putative
SSA_1567	5,36697	down	Polar amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein, putative
SSA_1992	5,04777335	down	Fructose-bisphosphate aldolase, putative
SSA_2004	5,28964565	down	Zinc metalloprotease zmpB precursor, putative
SSA_2005	6,1767383	down	Chaperone protein dnaJ, putative
SSA_2006	7,6304809	down	4-methyl-5(B-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis enzyme, putative
SSA_2007	5,2789775	down	Chaperone protein dnaK/HSP70, putative
SSA_2096	7,048131	down	ATP-dependent protease, ATP-binding subunit, putative
SSA_2190	5,3457615	down	33 kDa chaperonin, putative
SSA_2193	7,870127	down	ADP-ribose pyrophosphatase, putative
SSA_2194	10,269199	down	Nicotinamide mononucleotide transporter, putative
SSA_2195	5,49605085	down	ATPase/kinase, putative
SSA_2227	8,095094	down	Acetyl transferase, putative
SSA_2228	8,3509398	down	Acetyltransferase (GNAT) family, putative
SSA_2249	13,8537695	down	ABC-type antimicrobial peptide transporter, ATPase component, putative
SSA_2250	12,9247475	down	ABC-type antimicrobial peptide transporter, permease component, putative
SSA_2348	6,5497527	down	Metal dependent hydrolase, putative
SSA_0201	8,04971315	up	ABC multidrug transporter (3-component subtilin immunity exporter), putative
SSA_0205	5,75590945	up	NisK (sensor-receptor histidine kinase domain), putative
SSA_0440	6,16775105	up	30S ribosomal protein S18, putative
SSA_0929	5,9693707	up	ABC-type multidrug transporter, ATPase and permease components, putative
SSA_1272	5,66281935	up	50S ribosomal protein L31 type B, putative
SSA_1520	5,92942975	up	Elongation factor Tu, putative
SSA_2350	6,02135025	up	30S ribosomal protein S4, putative
SSA_2391	6,73290755	up	30S ribosomal protein S14, putative

3.6.4 Erste Analysen zur Interaktion ausgewählter Bakterienspezies mit HEp2-Zellen

Die Ergebnisse in Kapitel 3.4.4 belegten, dass die Kultivierbarkeit von *P. gingivalis* durch das probiotische Bakterium *S. salivarius* beeinträchtigt wurde. Da *P. gingivalis* mit der Parodontitisgenese assoziiert ist, kann dies bei gleichzeitiger Gegenwart der eukaryoten Zielzellen von *P. gingivalis* von klinischer Relevanz sein. Daher wurde nun das Verhalten beider Bakterienarten in Zweier- und Dreierkombinationen mit HEp2-Zellen (Kehlkopf-Epithel-Zelllinie) geprüft. Wegen der prinzipiell bekannten Fähigkeit von *P. gingivalis* in eukaryote Zellen zu internalisieren, wurden Adhärenz- und Internalisierungsstudien mit den Mono-Spezies Kulturen *P. gingivalis* W50 und *S. salivarius* K12, sowie deren Di-Spezies Kultur mit HEp2-Zellen durchgeführt.

Dabei wurde beobachtet, dass *S. salivarius* an die Zellen adhärte bzw. in diese internalisierte. Die Menge adhärenter *P. gingivalis* Zellen war dagegen relativ gering (10^4) und es konnten keine KBE internalisierter *P. gingivalis* Zellen ermittelt werden. Für *S. salivarius* konnten dagegen hohe Zahlen adhärenter (10^8) und internalisierender (10^5) Bakterien ermittelt werden. In der Ko-Kultur

beider Spezies mit den HEp2-Zellen konnte *P. gingivalis* wie auch schon in der Kombination nur mit *S. salivarius* nicht mehr kultiviert werden. Die Lebendkeimzahl von *S. salivarius* in Gegenwart von HEp-2 Zellen war dagegen mit der einer Monokultur identisch.

Da die kurze Inkubationszeit möglicherweise nicht ausreichte, *P. gingivalis* das Eindringen in die eukaryoten Zellen zu ermöglichen, wurde sie auf 24 Stunden verlängert. Eine Lebendkeimzahlbestimmung für die *P. gingivalis* Adhärenz und Internalisierung konnte dann jedoch nicht durchgeführt werden, da sich die HEp2-Zellen in dieser Zeitspanne vollständig von der Oberfläche ablösten. Bei Inkubation von *S. salivarius* bzw. *S. salivarius* und *P. gingivalis* mit HEp2-Zellen über den gleichen langen Zeitraum wurde diese Beobachtung nicht gemacht. Fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Studien bestätigten die gegenteiligen Effekte auf die HEp2-Zellen durch Anwesenheit von *P. gingivalis* bzw. *S. salivarius* oder *S. salivarius* und *P. gingivalis* (Abbildung 51). Zudem wurde beobachtet, dass *S. salivarius* wie ein „Saum“ um und auf den HEp2-Zellen lag während *P. gingivalis* in der Dreierkombination nicht mehr zu detektieren war.

Abbildung 51A)

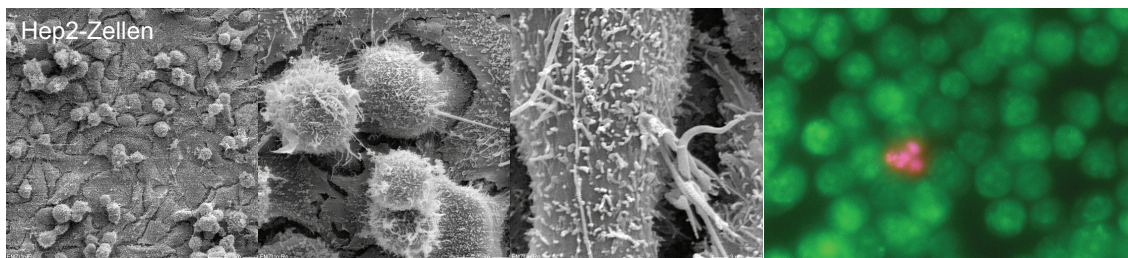


Abbildung 51B)



Abbildung 51C)



Abbildung 51D)

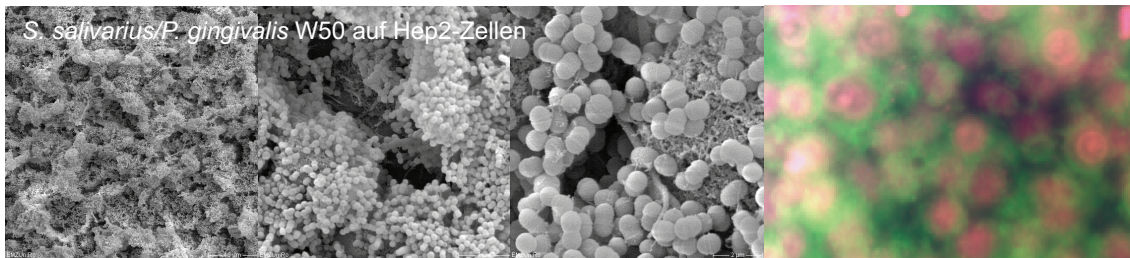


Abbildung 51: Rasterelektronen- und fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Kultur von *S. salivarius*, *P. gingivalis* W50 und *S. salivarius* / *P. gingivalis* W50 mit HEp2-Zellen. A) HEp2-Zellen, B) *P. gingivalis* W50 plus HEp2-Zellen, C) *S. salivarius* plus HEp2-Zellen, D) *S. salivarius* und *P. gingivalis* W50 plus HEp2-Zellen. Vergrößerung REM-Aufnahmen: 500x, 3000x und 10 000x. Fluoreszenzmikroskopie nach Lebend/Tot-Färbung der Bakterien (grün/rot) und DAPI-Färbung der eukaryoten Zellen (violett), Vergrößerung 400x.

Neben der Kultur von HEp2-Zellen mit *P. gingivalis* W50 und *S. salivarius* K12 wurde auch die Ko-Kultur mit *F. nucleatum* ATCC 25586 durchgeführt, nachdem die Studien in Kapitel 3.6.1 die Biofilmbildung dieser Spezies allein bzw. zusammen mit *P. gingivalis* in SG-/Pro Medium belegten. Es stellte sich die Frage, ob *F. nucleatum* ATCC 25586 alleine Biofilme auf den eukaryoten Zellen ausbildete und ob die Kombination *F. nucleatum* ATCC 25586 / *P. gingivalis* W50/HEp2 in einer Biofilmbildung oder einer Ablösung der HEp2-Zellen resultierte. Die mikroskopische Analyse der Fusobakterien mit den eukaryoten Zellen belegte eine Biofilmbildung auf der Oberfläche. Die weitere mikroskopische Analyse der Dreierkonstellation zeigte, dass es ebenfalls zur Biofilmbildung auf der eukaryoten Zelloberfläche kam (Abbildung 52A und B).

Abbildung 52A)

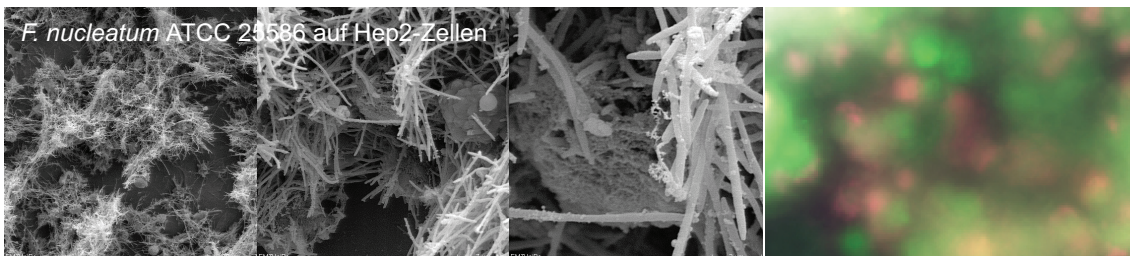


Abbildung 52B)



Abbildung 52: Nachweis von Biofilmstrukturen von *F. nucleatum* ATCC 25586 allein (A) sowie der Kombination mit *P. gingivalis* W50 (B) auf HEp2-Zellen mittels rasterelektronen- und

fluoreszenzmikroskopischer Analyse. Vergrößerung REM-Aufnahmen: 500x, 3000x und 10 000x. Fluoreszenzmikroskopie nach Lebend/Tot-Färbung der Bakterien (grün/rot) und DAPI-Färbung der eukaryoten Zellen (violett), Vergrößerung 400x.

Die Untersuchung wurde parallel mit *F. nucleatum* ATCC 23726 durchgeführt. Anders als *F. nucleatum* ATCC 25586 war dieses Bakterium nicht in der Lage Biofilmstrukturen in SG-/Pro oder einem der anderen getesteten Medien zu bilden. Die alleinige Inkubation des Bakteriums mit HEp2-Zellen zeigte HEp2-Zellstrukturen und separat davon *F. nucleatum* ATCC 23726 Zellen ohne Anzeichen von Biofilmstrukturen. Auch in Kombination mit *P. gingivalis* W50 und den HEp2-Zellen kam es zu keiner Biofilmbildung. Stattdessen wurde die Ablösung der HEp2-Zellen und sowohl nur vereinzelte *F. nucleatum* ATCC 23726 als auch nur wenige *P. gingivalis* Zellen auf der Substratoberfläche detektiert (Abbildung 53A und B).

Abbildung 53A)

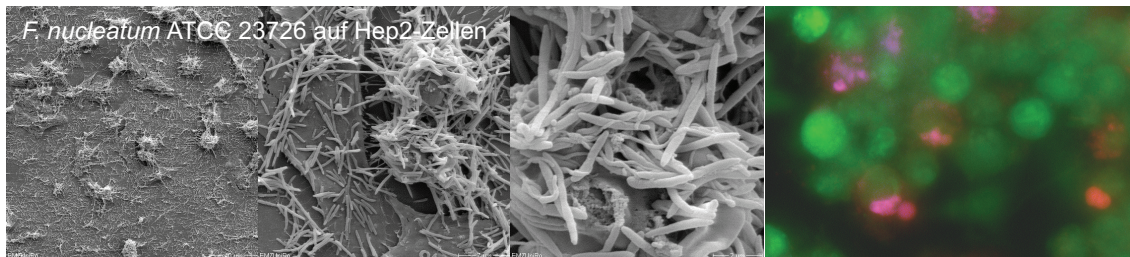


Abbildung 53B)



Abbildung 53: Mangelnde Interaktion von *F. nucleatum* ATCC 23726 alleine (A) bzw. in Kombination mit *P. gingivalis* W50 (B) mit HEp2-Zellen. Rasterelektronen- und fluoreszenzmikroskopische Analyse, Vergrößerung REM-Aufnahmen: 500x, 300 x und 10 000x. Fluoreszenzmikroskopie nach Lebend/Tot-Färbung der Bakterien (grün/rot) und DAPI-Färbung der eukaryoten Zellen (violett), Vergrößerung 400x.

Die Kombination von *S. salivarius* mit *F. nucleatum* ATCC 25586 bzw. *F. nucleatum* ATCC 23726 in der Ko-Kultur mit HEp-2 Zellen führte zu einer Verdrängung der obligat anaeroben Bakterien und einer Umlagerung der HEp-2 Zellen durch *S. salivarius* (nicht gezeigt).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten im ersten Schritt Modelle zur Untersuchung der Biofilmbildung oraler Mikroorganismen etabliert werden. Nachfolgend galt es, wechselseitige Beziehungen zwischen den Bakterienarten zu identifizieren und ausgewählte Interaktionen genauer zu charakterisieren. Die erzielten Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Etablierung einer Versuchsabfolge zur Untersuchung der Biofilmbildung oraler Mikroorganismen

Biofilme entwickeln sich durch eine Reihe von koadhesiven, nahrungsspezifischen, metabolischen und signalgebenden Interaktionen (Stoodley *et al.*, 2002). Die Basis mikrobieller Biofilme bilden die charakteristischen Eigenschaften jeder einzelnen involvierten Spezies und den daraus resultierenden Wechselwirkungen der Mikroorganismen untereinander. Für die Analyse und Charakterisierung der bakteriellen Biofilmbildung und spezies-spezifischen Interaktionen oraler Bakterien bedienen sich aktuelle wissenschaftliche Untersuchungen einer Vielzahl verschiedener Modelle, die sich je nach Fragestellung in 1) den verwendeten Spezies, 2) den Inkubationsbedingungen (statische oder Flussbedingungen, aerob oder anaerob), 3) der Dokumentation der Biofilmbildung, Biofilm-Masse und Biofilm-Reifung und 4) der Quantifizierung der einzelnen Spezies innerhalb der Biofilmstrukturen unterscheiden (Bradshaw *et al.*, 1996; Shu *et al.*, 2000; Guggenheim *et al.*, 2001a; Guggenheim *et al.*, 2001b; Sedlacek und Walker, 2007). Insbesondere durch die Vielzahl verschiedener Bedingungen und Untersuchungsmethoden ist ein Vergleich der erhaltenen Daten oftmals schwierig.

In dieser Arbeit wurden verschiedene qualitative und quantitative Messreihen zur Untersuchung der Biofilmbildung oraler Bakterien unter statischen, anaeroben Bedingungen untersucht. Das statische System ermöglicht Zwei- und Mehr-Spezies Gemeinschaften bessere Möglichkeiten metabolischer Interaktionen (Periasamy und Kolenbrander, 2009). Anaerobe Bedingungen wurden gewählt, da auch in der orthotopen Situation, dass heißt den subgingivalen Taschen, der Sauerstoff-Partialdruck sehr gering ist. Dieser reicht von mikroaerophilen Bedingungen (2,1 kPa) in den moderaten Taschen (5-6 mm Tiefe) bis hin zu nahezu anaeroben Bedingungen (1,6 kPa) in den tiefen Taschen (> 6 mm) (Loesche *et al.*, 1983).

Für die Untersuchungen der Biofilmbildung oraler Bakterien wurden in dieser Arbeit verschiedene Spezies gewählt, die in der supra- und subgingivalen Plaque vorkommen. Die Spezies *S. sanguinis*, *S. salivarius* und *S. mitis* zählen zu der physiologischen Mundflora und treten, gemeinsam mit *S. oralis*, als Erstkolonisierer der gereinigten Zahnoberflächen auf (Nyvad und Kilian, 1987).

S. mutans zählt zu den Haupt-Karies-Erregern der Mundhöhle. Über die Fermentation von Zuckern zu Laktat erfolgt eine starke Ansäuerung des umgebenden Milieus, was letztlich zur Demineralisierung

der Zähne führt. *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. micra* und *S. intermedius* gehören zu den Parodontitis-assoziierten Erregern, die in ihrer Häufigkeit im subgingivalen Plaque und der Beteiligung an den verschiedenen Verlaufsformen der Parodontitis differieren (Armitage, 1999). Dennoch werden *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* als sogenannte Markerkeime der Parodontitis bezeichnet, da sie bei vorliegender Erkrankung häufig in hohen Mengen isoliert werden (Moore und Moore, 1994). *F. nucleatum* wird in der Literatur als Brückenbakterium bezeichnet, das mit vielen verschiedenen frühen (z.B. *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*) und späten Kolonisierern (z.B. *P. gingivalis*, *P. micra*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*) der Mundhöhle interagieren kann (Kolenbrander und London, 1993). Diese Spezies ist die am häufigsten isolierte gram-negative Spezies sowohl aus der gesunden Mundhöhle als auch aus pathologisch veränderten Stellen des Parodonts (Bachrach *et al.*, 2005). *S. intermedius* und *P. micra* werden, ähnlich wie *F. nucleatum*, sowohl aus der gesunden als auch pathologisch veränderten Mundhöhle isoliert.

Mit den ausgewählten Methoden und Spezies gelang es, eine standardisierte Versuchsabfolge zu etablieren. Diese kann in anderen Laboren ohne Weiteres übernommen werden und dient der Beantwortung grundsätzlicher Fragen. Es zeigte sich aber, dass nur die Gesamtheit der ausgewählten Methoden ein nachvollziehbares und allgemeinverständliches Bild der hier untersuchten Bakterien ermöglichte.

4.2 Untersuchung der Biofilmbildung oraler Mono-Spezies Kulturen

Für die Etablierung von *in vitro* Biofilmen musste zunächst ein geeignetes Medium gefunden werden. Den natürlichen Bedingungen am nächsten wäre die Verwendung von menschlichem Speichel. Allerdings variiert die Zusammensetzung des menschlichen Speichels sowohl im Leben und im Tagesverlauf eines Individuums, als auch von Mensch zu Mensch. Damit können mit natürlichem Speichel keine konstanten Untersuchungsbedingungen gewährleistet werden. Die Herstellung einer exakten Kopie des menschlichen Speichels ist aufgrund der oben genannten Varianzen in der Zusammensetzung kaum möglich (Gal *et al.*, 2001). Zudem beobachteten Stinson und Mitarbeiter einen inhibitorischen Effekt von Speichel auf die interbakterielle Adhärenz aufgrund der Maskierung von Adhäsinen auf der Bakterienoberfläche durch Speichelkomponenten (Stinson *et al.*, 1991). Dieser natürliche Schutzmechanismus wäre für die *de novo* Biofilmbildung hinderlich.

Um konstante Bedingungen für die Untersuchungen zu gewährleisten, wurde in der vorliegenden Arbeit auf künstliche Medien zurückgegriffen. Zunächst wurde Brain heart infusion (BHI) Medium versetzt mit Humanserum (4:1) oder künstlichem Speichel (1:3) verwendet. Beide Medien unterstützten jedoch kaum die Biofilmbildung der getesteten Spezies. Dies könnte durch die Interferenz von Bestandteilen des Humanserums (Palmer *et al.*, 2001) oder von Mucin im künstlichen Speichel mit bakteriellen Adhäsinen bedingt sein. Die Daten der Arbeit lassen keine definitiven Aussagen über den funktionellen Hintergrund zu.

Die Verwendung eines chemisch definierten Mediums (CDM) mit Zusatz von Glukose oder Saccharose versetzte dagegen *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* bzw. *S. intermedius* in die Lage, Biofilme zu bilden. Für *A. actinomycetemcomitans* konnte die Bildung eines einschichtigen „Zellrasens“ beobachtet werden. Da die Komposition des chemisch definierten Mediums im Detail bekannt ist, wird eine einfache Modellierung der An- bzw. Abwesenheit und/oder Konzentration von Aminosäuren, Phosphaten oder Zuckern ermöglicht. Nachteilig ist jedoch, dass diese definierte Zusammensetzung relativ weit von der Zusammensetzung der Sulkusflüssigkeit entfernt ist. Dieser potentielle Nachteil konnte durch die Zugabe von Humanserum nicht gemindert werden, da auch wieder der negative Einfluss auf die Biofilmbildung zu beobachten war. Die Biofilm-stimulierende Wirkung von Saccharose wurde bereits beschrieben. Der Zucker ist ein wichtiges Substrat für die Produktion extrazellulärer Polysaccharide, die wiederum entscheidende Komponenten der Streptokokken-Biofilmbildung sind (Bowen, 2002; Paes Leme *et al.*, 2006).

So wuchsen *S. mutans*, *S. salivarius* und *S. sanguinis* bereits wenige Stunden nach ihrer Inokulation zu ersten Mikrokolonien und bald darauf zu mehrschichtigen Biofilmstrukturen auf der Substratoberfläche. Zudem zeigte sich bei diesen drei Spezies eine Korrelation zwischen dem Absinken des pH-Wertes und der einsetzenden Biofilmbildung. Damit zeigen offenbar Streptokokken ein Gattungsspezifisches Verhalten, da entsprechende Erkenntnisse für *Streptococcus pyogenens* kürzlich publiziert wurden (Manetti und Köller *et al.*, 2010).

S. mitis war in keinem der verwendeten Medien in der Lage, Biofilmstrukturen zu bilden. Hogg und Manning konnten zeigen, dass Polyglycerolphosphat enthaltende Lipoteichonsäure (PGP-LTA) an der Adhäsion oraler Streptokokken an die Zahnoberfläche beteiligt ist. In ihren Untersuchungen waren *S. mitis* und *S. oralis* die einzigen der untersuchten Streptokokken-Spezies, die diese Komponente nicht produzieren konnten (Hogg und Manning, 1988; Hogg *et al.*, 1997). Auch die *S. oralis* Mono-Spezies Kultur des Stammes C104 erreicht nur sehr geringe Biofilm-Massen (Loo *et al.*, 2000). Das Fehlen von PGP-LTA könnte demnach eine Ursache für die fehlende Biofilmbildung von *S. mitis* (und *S. oralis*) sein.

Eine andere mögliche Erklärung findet sich in den Untersuchungen von Cowan und Kollegen (Cowan *et al.*, 1992). Basierend auf elektronenmikroskopischen Studien konnte die Arbeitsgruppe demonstrieren, dass *S. mitis* wenige, extrem lange Fibrillen bildet. Diese Fibrillen ermöglichen dem Bakterium prinzipiell an ein Substrat zu binden (Vadillo-Rodrigues *et al.*, 2004). Offensichtlich stellt die Plastikoberfläche der 96- und 24-well Platten kein günstiges Substrat für die Adhäsion von *S. mitis* dar. Die Zelloberfläche von *S. mitis* unterscheidet sich von anderer Streptokokken hinsichtlich des Gehaltes an Stickstoff- und Sauerstoffmolekülen der Polysaccharide (Cowan *et al.*, 1992). Dies kann die gegensätzlichen Beobachtungen zur Fähigkeit der Biofilmbildung von *S. mitis* und den anderen verwendeten Streptokokken erklären.

Verschiedene Studien zeigen zudem eine Abhängigkeit der *S. mitis* Biofilmbildung von Lektinen und dem „acquired pellicle“. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass diese Spezies scheinbar keine

effektiven Kolonisierungsfaktoren für die Bindung an abiotische Oberflächen besitzt, aber in komplexen Biofilmen mit Erstkolonisierern interagieren kann (Loo *et al.*, 2000, Standar *et al.*, 2010). *A. actinomycetemcomitans* bildete unter den gewählten Bedingungen nur einen einschichtigen „Zellrasen“ aus. Verschiedene Stämme von *A. actinomycetemcomitans* wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Biofilmbildung mit unterschiedlichen Ergebnissen getestet (Inoue *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2003; Amarasinghe *et al.*, 2009). Parameter wie Oberflächenbedingungen, Wachstumsmedien und Umweltbedingungen, aber auch die Kolonie-Morphologie der einzelnen Stämme wurden als einflussnehmende Faktoren auf die *A. actinomycetemcomitans* Biofilmbildung beschrieben. So bildeten Stämme mit glatter Kolonie-Oberfläche weniger Biofilm-Masse (Haase *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit untersuchten *A. actinomycetemcomitans* Stämme hatten glatte Kolonie-Oberflächen. Die Tendenz solcher Stämme, einschichtige Zellrasen („*monolayer*“) lebender Zellen über einen längeren Zeitraum zu bilden, wurde bisher noch nicht beschrieben. *A. actinomycetemcomitans* ist jedoch für seinen Bedarf an Kalium-Ionen (Ohta *et al.*, 2001), seiner langsamen Wachstumsrate, und seinen limitierten Kohlenhydratstoffwechsel (Brown and Whiteley, 2007) bekannt. Diese Parameter können alle einen Einfluss auf das Überleben im Zellrasen bzw. die Tendenz zur Biofilmbildung haben.

Für die obligat anaeroben Bakterien *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *P. micra* konnte in keinem der verwendeten Medien eine Biofilmbildung beobachtet werden. Lediglich die Verwendung von BHI mit künstlichem Speichel und der Zugabe von Galaktose erbrachte eine erhöhte Adhärenz der Bakterien. Genomsequenzierungsprojekte von *F. nucleatum* ATCC 25586 und *P. gingivalis* W83 zeigten, dass beide Spezies Galaktose metabolisieren können (Kapatral *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2003).

Man geht davon aus, dass *P. gingivalis* für die Besiedlung parodontaler Taschen die Anwesenheit von bereits adhärenz-fähigen oralen Spezies, unter anderem Streptokokken, benötigt (Lamont *et al.*, 2002; Periasamy und Kolenbrander, 2009). Beispielsweise konnten Maeda und Arbeitsgruppe zeigen, dass *P. gingivalis* 381 über seine Fimbrien mit der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) von *S. oralis* ATCC 9811 Verbindungen eingehen kann, die zu einer Koaggregation führen (Maeda *et al.*, 2004).

Da *P. gingivalis* auch an verschiedene Zelltypen adhärenz-fähig sein kann, können auch diese als Substrat für eine erfolgreiche Kolonisierung und anschließender Biofilmbildung dienen (Duncan *et al.*, 1993; Agnani *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Hosogi und Duncan, 2005; Andrian *et al.*, 2006).

Das Brückenbakterium *F. nucleatum* scheint, ähnlich wie *P. gingivalis*, bereits adhärenz-fähige orale Spezies oder andere Substrate für die Bildung eines Biofilms zu benötigen. Zilm und Rogers gelang es aber, Biofilmstrukturen auch in *F. nucleatum* Mono-Spezies Kulturen nachzuweisen, indem sie den pH-Wert des verwendeten Mediums auf 8,2 anhoben. Ein pH-Wert von 7,8 hatte diesen Effekt bereits nicht mehr (Zilm und Rogers, 2007). Diese Ergebnisse sind eine mögliche Erklärung, dass in dieser Arbeit keine Biofilmbildung in künstlichem Speichel/Galaktose mit einem pH-Wert von 6,8 und ohne biotisches Substrat beobachtet werden konnte.

Allerdings war der in dieser Arbeit verwendete Stamm *F. nucleatum* ATCC 25586 in der Lage, Biofilmstrukturen zu bilden. Diese Fähigkeit wurde erreicht, nachdem das verwendete Medium (künstlicher Speichel/Galaktose) ohne Mucin und mit Zusatz von Pronase hergestellt wurde. Pronase könnte dabei die Freisetzung von Peptiden und Aminosäuren aus den verschiedenen Komponenten des Mediums bewirkt haben. Das asaccharolytische Bakterium *F. nucleatum* kann diese unter Anhebung des Medium-pH-Wertes als Energiequelle nutzen, was unter den gewählten Bedingungen zusätzlich die Fähigkeit zur Biofilmbildung bewirkt haben könnte. Dagegen war der in dieser Arbeit ebenfalls untersuchte *F. nucleatum* Stamm ATCC 23726 auch unter diesen Bedingungen lediglich zur Adhärenz an die Oberfläche befähigt. Eine Heterogenität in den adhesiven Möglichkeiten verschiedener *F. nucleatum* Stämmen wurde bereits erwähnt (Ozaki *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1991).

Ein höherer pH-Wert des Mediums könnte möglicherweise auch zu einer Biofilmbildung der *P. gingivalis* und *P. micra* Mono-Kulturen führen.

4.3 Analysen von Di-Spezies Kulturen identifizieren potentielle Biofilminhibitoren, aber auch Biofilmsymbionten

Die Biofilme in der Mundhöhle beinhalten ein ganzes Konsortium oraler Bakterienspezies. Je nach Gesundheitsstatus und oraler Hygiene des Individuums treffen verschiedenste Mikroorganismen aufeinander, und können zur Entstehung von Karies, Gingivitis und Parodontitis führen. Dabei sind die einzelnen Interaktionen dieser Spezies, unter anderem die Bereitstellung metabolischer Produkte, Grundpfeiler für die Entstehung oraler Multi-Spezies Biofilme (Periasamy und Kolenbrander, 2010).

Um die Auswirkungen des Aufeinandertreffens der verschiedenen Keime auf den Übergang vom gesunden zum kranken Status zu untersuchen, wurden die physiologischen Bakterien *S. mitis* und *S. salivarius* als Hauptkombinationspartner der Karies- und Parodontitis-assoziierten Erreger ausgewählt. *S. mitis* wird unter anderem aufgrund seiner *in vivo/in vitro* gezeigten inhibierenden Wirkung (Hillmann *et al.*, 2000) und Biotensid-Produktion (Van Hoogmoed *et al.*, 2000) als antagonistische Spezies angesehen. *S. salivarius* wurde bereits als probiotisches Bakterium beschrieben, welches das Auftreten von Mutans-Streptokokken unterbindet (Tanzer *et al.*, 1985; Burton *et al.*, 2006).

Die vorliegende Promotionsarbeit konnte zeigen, dass alle Di-Spezies Kulturen im Vergleich zu den korrespondierenden Mono-Spezies Kulturen eine veränderte Biofilm-Masse und Anzahl Koloniebildender Einheiten aufwiesen. Dieses Resultat kann auf verschiedene Ursachen, wie 1) eine Adaption an die neue ökologische Nische, 2) das Blockieren der Adhäsion an die Oberfläche, 3) die Konkurrenz um essentielle Nährstoffe, oder 4) die Modifizierung oder Degradierung von Virulenzfaktoren pathogener Spezies, zurückzuführen sein (Hatakka *et al.*, 2001; Socransky *et al.*, 1998).

Wachstumskinetische Untersuchungen ergaben, dass sowohl *S. mitis* als auch *S. salivarius* in CDM/Saccharose sehr schnell wachsen, wodurch sie gegenüber langsamer wachsenden Spezies wie *S. intermedius* und *S. sanguinis* in der Konkurrenz um Nährstoffe einen Wettbewerbsvorteil haben.

Die Ergebnisse der Di-Spezies Analysen nach simultaner Inokulation von *S. mitis* bzw. *S. salivarius* mit *A. actinomycetemcomitans* erlauben eine Assoziation der inhibitorischen Effekte von *S. mitis* und *S. salivarius* sowohl mit dem initialen Schritt der Adhärenz, als auch der Vermehrungsfähigkeit von *A. actinomycetemcomitans*. Diese Ergebnisse stehen mit den Resultaten von verschiedener Arbeitsgruppen in Einklang, die sowohl für *S. mitis* als auch *S. salivarius* zeigen konnten, dass sie protektive Eigenschaften besitzen, die mit der *A. actinomycetemcomitans* Kolonisierung epithelialer Zellen interferieren. Entsprechend wird beiden Stämmen eine Kontrollfunktion in der Mundhöhle zugeschrieben (van Hoogmoed *et al.*, 2000; Teughels *et al.*, 2007). *S. salivarius* ist für seine Produktion der Bakteriozine Salivaricin A und Salivaricin B bekannt, die ebenfalls eine Rolle in der veränderten Biofilmbildung bzw. Reduktion der Lebendkeimzahlen interagierender Bakterien spielen können (Ross *et al.*, 1993; Upton *et al.*, 2001; Tagg und Dierksen 2003). Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass *S. salivarius* Bakteriozin produziert und damit fast alle der in dieser Arbeit getesteten Spezies in ihrem Wachstum hemmen konnte. Burton und Kollegen haben eine hemmende Wirkung von *S. salivarius* gegenüber *P. micra* durch die Produktion von Salivaricin beschrieben (Burton *et al.*, 2006). Von *S. mitis* weiß man, dass es Biotenside produziert, die mit der Adhärenz an Oberflächen interferieren (van Hoogmoed *et al.*, 2000).

Ein anderer möglicher Mechanismus der inhibitorischen Eigenschaften von *S. mitis* und *S. salivarius* kann die pH-Wert Senkung des Mediums durch die Fermentation von Saccharose sein (Talarico und Dobrogosz, 1989; Sreenivasan *et al.*, 1993; Leriche und Carpentier, 2000). Bereits Bradshaw und Mitarbeiter bemerkten, dass davon ausgegangen werden kann, dass der pH-Wert der aus dem Kohlenhydratstoffwechsel resultiert, und nicht die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten an sich, für Änderungen in der Komposition und im Metabolismus der oralen Mikroflora verantwortlich sind (Bradshaw *et al.*, 1989). Marquis und Arbeitsgruppe beobachtete, dass beispielsweise *S. sanguinis* NCTC 10904 kaum säuretolerant ist. Dessen Wachstum und Glykolyse stoppt unterhalb eines pH-Wertes von 5,2, da der niedrige pH-Wert die Funktion des Glukose-abhängigen Phosphotransferase Systems beeinträchtigt (Marquis *et al.*, 1987). In den Di-Spezies Kulturen mit *S. mitis* und *S. salivarius* war der pH-Wert gegenüber allen getesteten Monokulturen niedriger. Entsprechend kann ein sehr niedriger pH-Wert die Ursache für eine verminderte/verhinderte Biofilmbildung sein. Obligat anaerobe Bakterien sind unter sehr niedrigen pH-Wert Bedingungen nicht mehr kultivierbar (Russel und Coulter, 1975). Der niedrige pH-Wert, welcher in Ko-Kultur der obligat anaeroben Spezies mit *S. mitis* und *S. salivarius* entstand, könnte demnach die Ursache der verminderten Anzahl adhärenter Bakterien und der auf 0 reduzierten Lebendkeimzahlen in solchen Mischkulturen gewesen sein.

Auch der pH-Wert der Ko-Kultur *S. mitis* / *S. mutans* und *S. salivarius* / *S. mutans* war im Vergleich zu den jeweiligen Mono-Kulturen geringer. Im Gegensatz zu den anderen Kombinationspartnern wurde *S. mutans* in der vorliegenden Arbeit aber weder in seiner Lebensfähigkeit noch in seinem Vermögen zur Biofilmbildung durch die Anwesenheit von *S. mitis* bzw. *S. salivarius* beeinflusst. Beide Spezies konnten in den Biofilmstrukturen von *S. mutans* detektiert werden. Vermutlich ist die

„Resistenz“ von *S. mutans* gegenüber *S. mitis* bzw. *S. salivarius* auf dessen hohe Säuretoleranz zurückzuführen (Kreth *et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu hatte *S. mutans* einen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von *S. mitis*. Ursache könnten die von *S. mutans* produzierten spezifische Bakteriozine, sogenannte Mutacine, sein. Mutacine werden als ein Hauptvirulenzfaktor von *S. mutans* angesehen und ermöglichen die Dominanz dieses Bakteriums im dentalen Plaque (Kreth *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. mutans* zur Bakteriozin-Produktion befähigt ist, wodurch das Wachstum von *S. mitis* und *S. salivarius* auf Blutagarplatten gehemmt wurde. In flüssiger Ko-Kultur spielt diese Bakteriozin-Produktion dagegen scheinbar keine Rolle. Die Anwesenheit von *S. mutans* in Ko-Kultur mit *S. salivarius* hatte, gemessen an den Lebendkeimzahlen, keinen negativen Einfluss auf dessen Lebensfähigkeit. Wang und Kuramitsu konnten zeigen, dass einige orale Streptokokken mit der Bakteriozin-Produktion von *S. mutans* interferieren. So konnte der Stamm *S. gordonii* Challis die Bakteriozin-Produktion von *S. mutans* hemmen (Wang und Kuramitsu, 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit suggerieren dass *S. salivarius* die Mutacin-Produktion von *S. mutans*, und umgekehrt *S. mutans* die Salivaricin-Produktion von *S. salivarius* hemmen kann.

Für die Kombination von *S. salivarius* mit *P. gingivalis* konnten Biofilmstrukturen beobachtet werden, obwohl beide Spezies allein in künstlichem Speichel/Galaktose dazu nicht in der Lage waren. *P. gingivalis* besitzt zwei Fimbrientypen: a) lange Fimbrien (3 µm), die hauptsächlich aus dem FimA Protein bestehen, und b) kurze Fimbrien (0.1-0.5 µm), die Mfa1 beinhalten. Periasamy und Kolenbrander haben gezeigt, dass die Ko-Adhäsion zwischen *P. gingivalis* und *S. gordonii* von dem Protein Mfa1 vermittelt wird. Diese Fimbrien-abhängige Adhäsion resultierte in der Akkumulation von *P. gingivalis* in dem heterotrophen Biofilm mit *S. gordonii* (Periasamy und Kolenbrander, 2009). Im Gegensatz dazu resultiert der Kontakt von *P. gingivalis* mit *S. cristatus* in der Aktivierung einer regulatorischen Kaskade, wodurch der Level der *fimA* Transkription abgesenkt wird. Dadurch erfolgt keine Mischbiofilmbildung zwischen *P. gingivalis* und *S. cristatus* (Xie *et al.*, 2000).

Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *P. gingivalis* Stämme W50 und W83 im Gegensatz zu *P. gingivalis* ATCC 33277 keine Fimbrien besitzen, muss die beobachtete Biofilmbildung mit *S. salivarius* auf anderen Mechanismen beruhen (Watanabe *et al.*, 1992; Nishikawa und Duncan, 2010).

Verschiedene andere Oberflächenkomponenten, wie Kohlenhydrate, Hemagglutinine, Proteinasen oder Membranproteine, aber auch die An-/Abwesenheit bestimmter Nährstoffe können Ursache dieser Beobachtungen sein. (Kinder und Holt, 1994; Nelson *et al.*, 2003)

4.4 Reihenfolge und Zeit beeinflussen die erfolgreiche Kolonisierung einer Oberfläche

Bisher sind die Behandlungen zur Entfernung parodontopathogener Keime sehr unbefriedigend, zumal sie oftmals keine langanhaltende Wirkung haben. Eine alternative Strategie zur Behandlung parodontaler Erkrankungen kann die subgingivale Applikation von antagonistischen Stämmen sein, welche die (Wieder-)Kolonisierung der parodontalen Taschen durch pathogene Bakterien inhibieren. Die Adhäsion an Wirtsoberflächen ist der erste Schritt einer Infektion. Die Möglichkeit, antagonistische Stämme zur „Kontrolle“ der Adhäsion und damit der Infektion zu verwenden wird *replacement therapy* genannt.

Untersuchungen zur Adhäsion parodontopathogener Spezies (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*) in der An- und Abwesenheit bereits adhärrierender, antagonistischer Mono-Spezies (*S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. crista*, *S. mutans*, *S. mitis*, *A. naeslundii* und *H. parainfluenzae*) wurden von Van Hoogmoed und Kollegen durchgeführt (Van Hoogmoed *et al.*, 2008). Dabei zeigte sich, dass bereits adhärente *S. mitis* und *S. salivarius* Stämme die nachfolgende Adhärenz von *P. gingivalis* signifikant inhibierten. *A. actinomycetemcomitans* war dagegen nur schwer durch die bereits adhärrierenden Stämme, am besten noch durch *S. salivarius* zu hemmen.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von van Hoogmoed und Kollegen und zeigen zudem, dass beide Stämme die nachfolgende Adhärenz auch aller anderen in der Arbeit untersuchten Bakterien inhibieren konnten. Van Hoogmoed und Mitarbeiter beschrieben in früheren Arbeiten, dass die Biotensid-Produktion von *S. mitis* eine Rolle in der Hemmung der Adhärenz von *S. mutans* spielt (van Hoogmoed *et al.*, 2000).

Die in dieser Arbeit nach van Hoogmoed durchgeführte Biotensid-Isolierung von *S. mitis* ergab, dass Biotenside des hier verwendeten Stammes nur einen leichten inhibitorischen Effekt auf die Biofilmbildung von *S. sanguinis* SK36 hatten. Möglicherweise war der verwendete *S. mitis* Stamm nicht in der Lage, ausreichend effektive Biotensid zu produzieren, wie es der Stamm von van Hoogmoed und Kollegen vermochte (van Hoogmoed *et al.*, 2000).

Die vorliegende Arbeit zeigte zudem, dass die beobachteten Wirkungen beider Stämme von der Reihenfolge der Inokulation abhängig sind. So hatte die Inokulation von *S. mitis* bzw. *S. salivarius* zu 24 Stunden alten Biofilmen von *S. sanguinis* oder *S. mutans* keinen offensichtlichen Effekt auf deren Biofilmbildung. Deswegen scheint für *S. sanguinis* die „abgeschlossene“ Biofilmbildung eine Art von Schutz gegen die inhibitorische Wirkung von *S. mitis* sowie *S. salivarius* zu bewirken. Auch auf reife *A. actinomycetemcomitans*- und *S. intermedius*- Biofilme war der supprimierende Effekt von *S. mitis* geringer als bei gleichzeitiger Inokulation. Gegebenenfalls können auch *A. actinomycetemcomitans* und *S. intermedius* oberflächenaktive oder bakteriozide Substanzen produzieren, da *S. salivarius* bei nachträglicher Inokulation geringere Biofilm-Quantitäten erreichte als bei simultaner Inokulation.

Weitergehende Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die Zeitspanne zwischen der Erst- und Zweitinokulation einen entscheidenden Faktor darstellt. Je mehr Zeit ein Erstkolonisierer für das

Wachstum, Verstoffwechslung von Nährstoffen und für die Produktion inhibitorischer Substanzen bzw. der Bildung von Biofilmstrukturen hat, desto höher ist der hemmende Effekt auf den Zweitkolonisierer bzw. umso geringer die Wirkung des Zweit-Kolonisierers auf den Erstkolonisierer. Derartige Zeit-Versuche wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Probennahmen und entsprechende Messreihen zur Produktion von Biotensiden, Toxinen und Enzymen könnten die beobachteten Effekte und die maßgeblichen Faktoren genauer aufklären.

4.5 Transwell-Untersuchungen grenzen die Ursachen antagonistischer Effekte auf die Biofilmbildung ein

Innerhalb der Mundhöhle existieren verschiedene Oberflächen für die mikrobielle Kolonisation, wobei die dort etablierten Konsortien in ihrer Komposition variieren (Marsh und Martin, 1999b). Oberflächen, mit verschiedenen ökologischen Bedingungen, sind zum Beispiel die mukosalen Oberflächen und die Zähne. Innerhalb dieser Bereiche wiederum gibt es Unterschiede in der lokalen Mikroflora, welche verschiedene Stellen dieser Oberflächen kolonisiert (Marsh, 2000; Marsh und Martin, 1999b). Entsprechend ist es sehr unwahrscheinlich, dass alle in der Mundhöhle vorkommenden Spezies zu jeder Zeit aufeinandertreffen.

Die Verwendung eines Transwell-Systems ermöglicht es, die räumliche Trennung der Bakterien nachzustellen, so dass kein direkter Kontakt zwischen den Spezies vorliegt. Die hierbei eingesetzte Membran erlaubt jedoch das Passieren von Stoffwechselprodukten, Bakteriozinen, Toxinen, Enzymen und anderen von den Bakterien produzierte Substanzen, und bedingt einen im System durchgehend gleichen pH-Wert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die räumliche Trennung meist zu vermehrten Biofilm-Massen führt. Demnach liefert die für die simultan angeimpften Di-Spezies Kulturen diskutierte Nährstoffkompetitivität und der pH-Wert Einfluss auf die Biofilmbildung der verschiedenen Spezies keine hinreichende Erklärung. Vielmehr spielt der direkte Kontakt der Spezies untereinander eine entscheidende Rolle.

Eine Hypothese ist, dass erst der direkte Kontakt der Spezies Regulationskaskaden aktiviert, die zur Produktion von Enzymen, Toxinen oder anderen Substanzen und davon abhängig zu einer verminderten Biofilmproduktion führen. Durch die Trennung der Bakterien aufgrund der Transwell-Membran würden solche Mechanismen sterisch blockiert werden. Dies erklärt möglicherweise warum *A. actinomycetemcomitans*, der das bei der Fermentation von Saccharose entstehende Laktat als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann (Brown und Whiteley, 2007), nur im indirekten Kontakt zu den Streptokokken zu einer verstärkten Biofilmbildung befähigt wurde. Diskrepanzen zwischen der Anzahl kultivierbarer Zellen und lebender Zellen laut Lebend/Tot-Färbung deuten darauf hin, dass *A. actinomycetemcomitans* relativ rasch in den VBNC (*viable but non-culturable*)- oder ähnlichen Status übergeht, was offenbar zu einer vermehrten Biofilmbildung durch weiterlaufende metabolische Aktivität führt.

Eine andere Möglichkeit der beobachteten Phänomene ist, dass von *S. mitis* oder *S. salivarius* produzierte Biotenside bzw. Bakteriozine die Transwell-Membran nicht oder kaum passieren, was zu einer verbesserten Besiedlung der Oberfläche führen würde.

Dass die Biofilm-Masse von *S. sanguinis* bei diesem Versuch unter dem Einfluss von *S. salivarius* reduziert und unter *S. mitis* erhöht war zeigt, dass die von beiden Spezies ausgehende inhibitorische Wirkung unterschiedlicher Natur sein muss.

4.6 Weiterreichende funktionale Analysen ausgewählter Di-Spezies Kombinationen

4.6.1 Arginin spielt eine Rolle für die Interaktion von *Streptococcus mitis* mit *Streptococcus sanguinis*

Eine Studie von Maestre und Arbeitsgruppe zeigte, dass *S. oralis* und *S. mitis* die vorherrschenden Spezies der subgingivalen Plaque sind (70 %), während *S. sanguinis* nur in 23 % der Fälle isoliert wurde (Maestre *et al.*, 2007). Laut einer klinischen Studie von Stingu und Kollegen ist *S. sanguinis* eher mit dem gesunden als mit dem kranken Status und eine aggressive Parodontitis mit dem Verlust von *S. sanguinis* assoziiert (Stingu *et al.*, 2008).

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass *S. mitis* in der Lage ist, die *S. sanguinis* Biofilmbildung in Ko-Kultur zu hemmen. Die durchgeführten Transwell-Untersuchungen zeigen, dass der pH-Wert allein nicht für die Hemmung verantwortlich ist.

Die Ergebnisse bei sukzessivem Animpfen der Keime suggerierten, dass die Produktion von oberflächenaktiven Substanzen durch *S. mitis* einen Einfluss auf die *S. sanguinis* Adhärenz haben. Tatsächlich konnte eine Hemmung der *S. sanguinis* Adhärenz durch isolierte Biotenside von *S. mitis* beobachtet werden. Es wurde jedoch auch offensichtlich, dass die Beeinflussung der Biofilmbildung von *S. sanguinis* durch *S. mitis* von der Reihenfolge der Inokulation sowie dem Zeitpunkt des Aufeinandertreffens beider Spezies abhängt.

Transkriptomanalysen dieser Arbeit von *S. sanguinis* in Ko-Kultur mit *S. mitis* ergaben, dass insbesondere Gene, deren Produkte die *de novo* Synthese von Nukleotiden ermöglichen, in Anwesenheit von *S. mitis* vermindert exprimiert wurden. Zudem war die Transkriptmenge vieler Gene, deren Produkte in den Kohlenstoffmetabolismus und –Transport involviert sind, vermindert. Auffällig war auch die gesteigerte Transkriptmenge für Gene ribosomaler Proteine und des *ABC multidrug transporters* SSA_0201 und 0929, was auf eine Steigerung der Proteinbiosynthese bzw. veränderte Abwehrmechanismen hinweist.

Des Weiteren ergaben die Transkriptomanalysen der vorliegenden Arbeit, dass für das *putative Collagen-binding surface protein*, SSA_0805, in Ko-Kultur geringere Transkriptmengen als in der *S. sanguinis* Mono-Kultur vorlagen. *S. sanguinis* besitzt fünf Zellwand-verankerte Proteine, die eine Kollagen-Binde-Domäne aufweisen. Diese Menge an Oberflächenproteinen scheint mit der Fähigkeit

von *S. sanguinis*, an die Zahnoberfläche zu binden und mit verschiedenen oralen Bakterien zu interagieren, zu korrelieren (Xu *et al.*, 2007). Möglicherweise ist die verminderte Expression von SSA_0805 in Anwesenheit von *S. mitis* teilweise für die verminderte *S. sanguinis* Adhärenz verantwortlich. Für das *surface protein C* lag ebenfalls eine verminderte Transkriptmenge vor. Das Genprodukt hat Homologien zu den *S. mutans non-glycosyltransferases* (GTF) *glucan-binding proteins* (GBP) - Rezeptoren der Zelloberfläche für Glukane und sekretierte Proteine (Xu *et al.*, 2007). Damit kann auch die detektierte verringerte Menge an *surface protein C* für die stark verminderte Biofilmbildung von *S. sanguinis* in Anwesenheit von *S. mitis* verantwortlich sein.

Dagegen scheinen die kurzen und langen *S. sanguinis* Fibrillen in diesem Zusammenhang keine Rolle zu spielen. Gene, die in die Bildung dieser Strukturen involviert sein sollen (SSA_0135 bis SSA_0137; SSA_1080 bis SSA_1082; SSA_1909) (Xu *et al.*, 2007), zeigten keine veränderten Transkriptmengen.

Weitere Ergebnisse der *S. mitis* / *S. sanguinis* Ko-Kultur zeigten, dass kein inhibitorischer Einfluss von *S. mitis* auf die *S. sanguinis* Biofilmbildung vorliegt, wenn das chemisch definierte Medium kein Arginin enthält.

L-Arginin ist eine proteinogene α -Aminosäure und gehört zusammen mit L-Lysin und L-Histidin in die Gruppe der basischen Aminosäuren. Im menschlichen Speichel wird Arginin in mikromolaren Konzentrationen gefunden, kommt jedoch reichlich in Speichelpeptiden und Speichelproteinen vor (van Wuyckhuysse *et al.*, 1995). Wenn Arginin aufgenommen wird, kann es primär durch das Arginin Deiminase System (ADS) zu Ornithin, Kohlendioxid und Ammoniak mit begleitender Produktion von ATP umgesetzt werden. Eine Reihe von oralen Bakterien besitzen das Arginin Deiminase System, einschließlich *S. sanguinis* (Marquis *et al.*, 1987; Rogers, 1990; Burne und Marquis, 2000). Die Ammoniakproduktion aus Arginin wurde als Mechanismus identifiziert, durch den die Bakterien 1) gegen die Abtötung durch Säure geschützt sind (Casiano-Colon und Marquis, 1988; van Wuyckhuysse *et al.*, 1995), 2) in einer relativ pH-neutralen Umgebung leben und das Aufkommen kariogener Spezies unterdrückt wird (Marquis *et al.*, 1987; van Wuyckhuysse *et al.*, 1995), und 3) bioenergetische Vorteile (ATP-Produktion) erhalten (Poolman *et al.*, 1987; van Wuyckhuysse *et al.*, 1995).

Wachstumsuntersuchungen in CDM/Saccharose ohne Arginin haben ergeben, dass *S. mitis* durch den Arginin-Mangel nicht mehr in der Lage war, substantiell zu wachsen. Es wurde bereits beschrieben, dass Arginin für anabole und katabole Reaktionen im Metabolismus von *S. mitis* essentiell ist (Hiraoka *et al.*, 1987). *S. sanguinis* hat dagegen die Möglichkeit Arginin de novo zu synthetisieren (Xu *et al.*, 2007). Wahrscheinlich konnte *S. mitis* durch das Fehlen von Arginin und das stark beeinträchtigte Wachstum keine Substanzen mehr erzeugen, die für die Hemmung der Biofilmbildung von *S. sanguinis* verantwortlich waren.

4.6.2 Probiotikum versus Pathogen – Interaktionen von *Streptococcus salivarius* mit *Porphyromonas gingivalis*

S. salivarius ist ein Erstkolonisierer oraler Oberflächen und spielt keine Rolle bei oralen Erkrankungen (Carlsson *et al.*, 1970; Kazor *et al.*, 2003). Der Stamm *S. salivarius* K12 zählt zu den probiotischen Bakterien (Reid, 2005; Burton, 2006). Probiotische Bakterien werden von der WHO als „lebende Mikroorganismen, die bei Verabreichung in adäquaten Mengen einen Gesundheitsvorteil des Wirtes bewirken“ definiert. Im Gegensatz dazu zählt *P. gingivalis* zu den Haupterregern der Parodontitis.

Die Adhärenz von *S. salivarius* an Parodontitis-assoziierte Erreger könnte für die Erhaltung eines gesunden mikrobiellen Gleichgewichts in der Mundhöhle von Bedeutung sein. Andererseits könnten diese Interaktionen auch zu einem transienten Reservoir für Pathogene führen, die nach entsprechenden zahnärztlichen Behandlungen die Zahnfleischtaschen wieder infizieren können (Lévesque *et al.*, 2003).

Untersuchungen zur Interaktion von *P. gingivalis* mit *S. salivarius* in dieser Arbeit zeigen, dass die Kombination beider Spezies zur Biofilmbildung führte, während die Mono-Spezies Kulturen in dem gewählten Medium lediglich zur Oberflächenadhärenz befähigt waren.

Analysen des Di-Spezies Biofilms nach Behandlung mit Protein- und Kohlenhydrat-degradierenden Substanzen ergaben, dass die Biofilmbildung auf Protein-Kohlenhydrat Interaktionen beruhen, da sowohl Pronase als auch Natriummetaperiodat zu einer Destabilisierung des Biofilms führten (Stinson *et al.*, 1991).

Es stellte sich die Frage, was genau die Biofilmbildung der Ko-Kultur bewirkt haben könnte. Untersuchungen mit einer *P. gingivalis luxS* Mutante in der vorliegenden Arbeit ergaben, dass diese Beobachtung nicht auf einer Quorum Sensing Regulation beruht, da die AI-2 Produktion von *P. gingivalis* durch die *luxS* Mutation aufgehoben wird (Burgess *et al.*, 2002).

Alternativ könnte der Abbau oder die Bindung des in dem künstlichen Speichel/Galaktose enthaltenen Mucins oder anderer Medienbestandteile durch *P. gingivalis* zur Biofilmbildung geführt haben.

Mucine sind Glykoproteine und bilden den strukturgebenden Bestandteil des Schleims auf den Schleimhäuten (Mucosa). *P. gingivalis* bildet 3 Gingipaine, das heißt Trypsin-ähnliche Cysteinproteasen (Arg-Gingipaine RgpA und RgpB, Lys-Gingipain Kgp), die eine Reihe von Wirtsproteinen binden und spalten können (Travis und Potempa 2000; Fitzpatrick *et al.*, 2009). Die Gingipaine liegen entweder gebunden auf der Zelloberfläche von *P. gingivalis* vor oder werden allmählich in das umgebende Medium abgegeben (Slots und Genco, 1984; Chen *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2001). Die Gingipaine von *P. gingivalis* besitzen zudem eine Funktion als Adhäsine, die direkt an extrazelluläre Matrixproteine binden können (Lantz *et al.*, 1991; Pike *et al.*, 1996). Letzteres könnte bewirken, dass Mucin von *P. gingivalis* gebunden und damit eine hemmende Wirkung des Mucin auf die *S. salivarius*-Biofilmbildung aufgehoben wird.

Die meisten oralen Streptokokken besitzen Adhäsine der Antigen-I/II-Familie, die in der Zelloberfläche verankert sind. Diese multifunktionellen Adhäsine beinhalten verschiedene

Bindungsstellen für Rezeptoren und können unter anderem an menschliche Glykoproteine im Speichel binden (Marsh, 1999). Eine Bindung von Mucin durch *S. salivarius* könnte zur Blockade der Adhärenz auf der verwendeten Oberfläche geführt haben. Damit ließe sich auch erklären, warum das nacheinander geschaltete Animpfen der Spezies in einer verminderten bzw. verhinderten Biofilmbildung resultierte. Die Erstinokulation von *S. salivarius* würde in diesem Konzept zu einer „Blockierung“ der für die Adhärenz notwendigen Bindestellen führen, die durch *P. gingivalis* nach Zweitinokulation nicht wieder aufgehoben werden kann. Umgekehrt erfolgte bei der Zweitinokulation von *S. salivarius* auch eine Erneuerung des Mediums, was wiederum zu einer Menge an Mucin führt, die von *P. gingivalis* nicht mehr gebunden werden kann.

Allerdings ergaben die Proteomanalysen in der vorliegenden Arbeit, dass die Glukosyltransferase S von *S. salivarius* in Ko-Kultur mit *P. gingivalis* nicht bzw. vermindert exprimiert wurde. Glykosyltransferasen stellen eine Gruppe bakterieller Adhäsine dar, die mit Rezeptoren im Pellikel, wie blutgruppenspezifischen Proteinen, oder mit adsorbierten Glukanen und Dextranen wechselwirken können (Marsh 1999). Möglicherweise verursachte die Repression der *S. salivarius* Glykosyltransferase und/oder anderer Adhäsine durch *P. gingivalis*, dass keine Bindung mit Mucin und damit keine Blockade der Adhärenz an die Oberfläche erfolgte.

Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität von *P. gingivalis* in der Kombination mit *S. salivarius* zeigten, dass kein Abbau von Mucin durch *P. gingivalis* aufgrund stark reduzierter proteolytischer Aktivität vorlag. Zudem zeigte *S. salivarius* in Kombination mit der *P. gingivalis luxS* Mutante eine ähnlich starke Biofilmbildung, wobei die Mutante von vornherein eine um 45 % verringerte Rgp und um 30 % verringerte Kgp Aktivität verglichen zum Wildtyp aufwies (Burgess *et al.*, 2002). Demnach wäre die proteolytische Aktivität der *P. gingivalis luxS* Mutante in Kombination mit *S. salivarius* wahrscheinlich noch weitaus geringer. Der Gehalt an Mucin im Medium nach Ko-Kultur beider Spezies konnte nicht ermittelt werden.

Die Ergebnisse zur Lebendkeimzahlbestimmung von *P. gingivalis* ergaben, dass die Präsenz von *S. salivarius* einen hemmenden Effekt auf dessen Vitalität hat. Tatsächlich demonstrierten Transkriptomanalysen der Ko-Kultur beider Spezies die verminderte Expression verschiedener Gene des Kohlenstoff- und Energiestoffwechsels. Zudem zeigten sowohl diese Transkriptom- als auch entsprechende Proteomanalysen, dass verschiedene *P. gingivalis* Virulenzfaktoren nicht (verschiedene Proteasen) oder kaum noch (HagE) gebildet wurden. Die fehlende Bildung der Peptidyl-Arginin Deiminase korreliert dabei mit der Reduktion der Arg-Gingipain Expression (Wegner *et al.*, 2010).

Letztlich können sowohl die Bindung von Mucin durch *P. gingivalis*, die verminderte Bildung der Glykosyltransferase S, als auch die Aufnahme von *P. gingivalis* Genom-Fragmenten die Biofilmbildung von *S. salivarius* in der Ko-Kultur bewirkt haben. Allerdings können dieser Beobachtung auch ganz andere Ursachen zugrunde liegen. Lévesque und Kollegen vermuten beispielsweise, dass Argininreste an der Interaktion zwischen *S. salivarius* und Parodontitis-assoziierte Stämme beteiligt sein könnten (Lévesque *et al.*, 2003). Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass HBP35,

ein 40 kDa großes äußeres Membranprotein, an der Koaggregation von *P. gingivalis* mit *Actinomyces viscosus* und *S. gordonii* beteiligt ist (Hiratsuka *et al.*, 1992; Namikoshi *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2003; Hiratsuka *et al.*, 2008).

Unklar bleibt die Rolle der beobachteten starken Expression von *P. gingivalis* konjugativen Transposon-Proteinen. Diese sollten im Hinblick darauf, dass die Interaktion mit *S. salivarius* auch ein transientes Reservoir für die Pathogenen darstellen könnte (Lévesque *et al.*, 2003), untersucht werden.

4.6.3 Das Brückenbakterium *F. nucleatum* – Stammspezifische Biofilmbildung und Adhärenz an HEp2-Zellen

Das Brückenbakterium *F. nucleatum* spielt eine wichtige Rolle für die Integration später Kolonisierer der Mundhöhle, wie beispielsweise *P. gingivalis*, in den sich entwickelnden Biofilm (Kolenbrander *et al.*, 2002).

Sowohl durch Zilm und Rogers als auch in dieser Arbeit gelang es, Biofilmstrukturen einer *F. nucleatum* Mono-Spezies Kultur (*F. nucleatum* ATCC 25586) zu beobachten (Zilm und Rogers, 2007). Während erstere Arbeit eine pH-Abhängigkeit der Biofilmbildung feststellte, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch proteolytische Enzyme eine Rolle in der *F. nucleatum* Biofilmbildung spielen. Mehr als ein Drittel der äußeren Membran von *F. nucleatum* besteht aus Proteinen (Bakken und Jensen, 1986). Analysen mit dem Transmissionselektronenmikroskop zeigten, dass Unterschiede in der Oberflächenstruktur bei *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Zugabe von Pronase verglichen mit *F. nucleatum* in Medium ohne Pronase-Zusatz vorlagen. Dass verschiedene Membranproteine durch den Pronase-Zusatz im Medium nicht mehr nachzuweisen waren, konnte durch eine SDS-PAGE demonstriert werden.

Versuche mit dem *F. nucleatum* Stamm ATCC 23726, zeigten keine Biofilmbildung nach Zugabe von Pronase. Beobachtungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop ergaben, dass die Oberflächenstruktur von *F. nucleatum* ATCC 23726 von *F. nucleatum* ATCC 25586 verschieden war. Bereits in den 90er Jahren wurde die Heterogenität in den adhäsiven Möglichkeiten verschiedener *F. nucleatum* Stämme beschrieben (Ozaki *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1991).

Transkriptomanalysen von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Pronasebehandlung demonstrierten, dass kein für ein äußeres Membranprotein kodierendes Gen (Kapatral *et al.*, 2002) differenziell transkribiert vorlag. Transkriptmengen für ribosomale Proteine lagen reduziert vor, was für eine Verminderung der Proteinbiosynthese sprach.

Dagegen lagen die Transkripte verschiedener Gene des Aminosäuremetabolismus, der Energieproduktion, sowie für Proteine des PTS-Systems in größeren Mengen vor. Das bevorzugte Substrat von *F. nucleatum* sind Aminosäuren (Bolstad *et al.*, 1996). Das Ergebnis der Transkriptomanalyse legt die Vermutung nahe, dass die Verfügbarkeit von Aminosäuren mit der Biofilmbildung von *F. nucleatum* ATCC 25586 korreliert.

In den parodontalen Taschen existiert ein symbiontisches Leben, das sich wahrscheinlich viele Spezies zunutze machen. Dies zeigt sich in der Koexistenz vieler Bakterien in Gemeinschaften oder beispielsweise in der Koaggregation von *F. nucleatum* mit *P. gingivalis*. Dadurch wird wahrscheinlich jede Spezies mit für sie essentiellen Nährstoffen versorgt (Bolstad *et al.*, 1996). Da *F. nucleatum* Peptide bzw. Aminosäuren zum Wachstum benötigt, kann der Zusatz von Pronase eine bessere Verfügbarkeit solcher aus künstlichem Speichel/Galaktose bewirken. Aus dieser Arbeit heraus wurde die Hypothese entwickelt, dass die *F. nucleatum* Biofilmbildung durch Ko-Kultur mit *P. gingivalis* und dessen proteolytischen Enzymen in künstlichem Speichel/Galaktose induziert werden kann. Bereits Saito und Mitarbeiter zeigten, dass *P. gingivalis* die Biofilmbildung von *F. nucleatum* auf Kollagen-beschichteten Mikrotiterplatten steigert (Saito *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit war dies auf unbeschichteten Plastikoberflächen in Gegenwart von künstlichem Speichel/Galaktose nicht nachzuvollziehen.

Anders verhielt sich die Fähigkeit zur Biofilmbildung in Ko-Kultur mit HEP2-Zellen. Es zeigte sich, dass *F. nucleatum* ATCC 25586 in Ko-Kultur mit *P. gingivalis* zur Adhärenz und Biofilmbildung auf HEP2-Zellen befähigt war, während die Kombination mit *F. nucleatum* ATCC 23726 mit demselben *P. gingivalis*-Stamm das Ablösen der HEP2-Zellen bewirkte.

Die Adhärenz von Bakterien an menschliche Zelloberflächen ist eine Grundvoraussetzung für die Initiation der Parodontitis (Gibbons, 1989). Die Zelloberfläche von *F. nucleatum* ermöglicht dem Bakterium, an menschliche Erythrozyten, polymorphkernige Leukozyten, HeLa Zellen, Fibroblasten, gingivale Epithelzellen, Kollagen und andere Bakterienspezies zu binden, wobei die Art der Bindung Stamm-abhängig ist (Ozaki *et al.*, 1990; Zilm und Rogers, 2007). *P. gingivalis* kann ebenfalls an Wirtsoberflächen/-gewebe, wie gingivale Epithelzellen und HEP2 Zellen binden (Chen *et al.*, 2001; Boisvert und Duncan, 2008).

In experimentell in Mäusen ausgelösten Infektionen konnte gezeigt werden, dass eine Reinkultur von *F. nucleatum* pathogen ist. In Mischkultur mit *P. gingivalis* oder *P. intermedia* wird die *F. nucleatum* Pathogenität verstärkt (Bolstad *et al.*, 1996). Möglicherweise spielen bei diesen Interaktionen Kohlenhydrate eine Rolle. Einerseits weiß man, dass die Adhärenz einiger oraler Bakterien an menschliche Zelloberflächen durch verschiedene Zucker inhibiert wird (Kondo *et al.*, 1978; Mongiello und Falker, 1979; Yamazaki *et al.*, 1988). Andererseits ist die Ko-Aggregation von *P. gingivalis* mit *F. nucleatum* je nach *F. nucleatum*-Stamm Galaktose-abhängig (Kolenbrander und Andersen, 1989; Kinder und Holt, 1993; Kinder und Holt, 1994; Bachrach *et al.*, 2005). Zudem hat der Zelltyp einen signifikanten Einfluss auf die Anheftungsmöglichkeiten von *F. nucleatum* (Ozaki *et al.*, 1990). Aus diesen Ergebnissen wäre abzuleiten, dass es je nach Vorliegen eines bestimmten *F. nucleatum* Stamms zu einer akuten oder chronischen Verlaufsform der Parodontitis kommen kann.

Die Ko-Kultur von *P. gingivalis* mit *S. salivarius* auf HEP2-Zellen zeigte, dass *S. salivarius* seine probiotische und antagonistische Wirkung unter den hier gewählten Bedingungen beibehält und zu einer Verdrängung der Parodontitis-assoziierten Spezies führt. Diese Wirkung von *S. salivarius* konnte

bereits für die *A. actinomycetemcomitans* Kolonisierung epithelialer Zellen beschrieben werden (Teughels *et al.*, 2007).

Möglicherweise spielt die durch *S. salivarius* induzierte Verminderung der Transkription verschiedener *P. gingivalis* Virulenzfaktoren (Proteasen, Hemagglutinin E) eine Rolle. Hämagglutinine und Proteasen sind unter anderem an der Gewebekolonisierung beteiligt (Lantz *et al.*, 1991; Pike *et al.*, 1996; Scragg *et al.*, 1999), was in der *P. gingivalis* / *S. salivarius* Kombination offenbar verhindert wurde.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In den vergangenen Jahren hat die Untersuchung der bakteriellen Interaktion im Rahmen parodontaler Erkrankungen stark an Bedeutung gewonnen. Die Kenntnis und das Verständnis der Wirkungsweisen untereinander tragen dazu bei, die komplexen Vorgänge parodontaler Erkrankungen zu verstehen. Sie kann in letzter Konsequenz die Behandlungserfolge in der Zahnmedizin verbessern.

Die vorliegende Arbeit diente dazu, reproduzierbare Modelle mit breitem Bakterienspezies-Spektrum zur Untersuchung von Mono- und Di-Spezies Biofilmen zu etablieren, einige bakterielle Interaktionen auf funktionaler und molekularer Ebene zu identifizieren und damit einen Ausgangspunkt für weiterreichende Analysen hinsichtlich parodontaler Erkrankungen zu schaffen.

- Die Verwendung eines chemisch definierten Mediums mit Saccharose oder künstlichen Speichel mit Galaktose eignete sich für die *in vitro* Biofilmbildung bzw. ermöglichte zumindest die Adhärenz der Bakterien auf den verwendeten unbeschichteten Plastikoberflächen. Mit Hilfe der Safranin-Färbung konnte die Bildung von Biofilmen einfach und schnell quantifiziert und durch fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen genauer analysiert werden. Die Ermittlung der Lebendkeimzahl diente als ergänzende Methode zur Bestimmung der Lebensfähigkeit und Kultivierbarkeit der Keime. Alle drei Untersuchungen erwiesen sich als für eine vergleichbare Aussagekraft essentielle „minimale Untersuchungseinheit“ zur Biofilmbildung, Biofilmstruktur und Vitalität der Biofilmbakterien.
- Untersuchungen von simultan inokulierten Di-Spezies Kombinationen wiesen auf Hemmungen oder Förderung der Biofilmbildung, der Vitalität und Änderungen der Struktur hin. Zudem zeigten sie, dass das Verhalten der Bakterien bzw. deren Interaktion die Biofilmbildung zum einen erst ermöglichen, zum anderen aber auch verhindern kann.
- Analysen des sukzessiven Animpfens zeigten, dass die Biofilmbildung vom Zeitpunkt des Aufeinandertreffens verschiedener Spezies auf einer Oberfläche, aber auch von der Reihenfolge der Besiedlung abhängig ist. Einige in die Interaktionen involvierte Substanzen konnten diskutiert werden. Die genaue Natur solcher sekretierten Substanzen und Wechselwirkungen sollte in weiteren Untersuchungen analysiert werden.
- Transwell-System Untersuchungen ergaben, dass die Biofilmbildung von der Nähe bzw. Entfernung der verschiedenen Bakterienspezies zueinander beeinflusst wird. Die direkte Interaktion von *S. mitis* mit *S. sanguinis* führte beispielsweise zu einer Hemmung der *S. sanguinis* Biofilmbildung, während der indirekte Kontakt beider Spezies zu einem Anstieg der Biofilm-Masse führte. Die Experimente haben auch einen Bezug zur therapeutischen Verwendung von probiotischen

Stämmen wie der hier eingesetzte Stamm *S. salivarius* K12, da deren Wirkung durch den Abstand zu den Zielorganismen entscheidend beeinflusst werden könnte.

- Die Untersuchungen zur Biofilmzusammensetzung durch Verwendung von Protein-, DNA- bzw. Zucker-abbauenden Substanzen ergaben erste Anhaltspunkte für Komponenten, die für den Zusammenhalt der Gemeinschaft der Biofilm-bewohnenden Organismen notwendig sind. Solche Strukturen sollten Ansatzpunkte für die Therapie parodontaler Erkrankungen werden, da durch die Destabilisierung bzw. Auflösung der verursachenden Biofilme ein leichteres bzw. gezielteres Einbringen von Medikamenten/Antibiotika möglich sein wird.

- Die Interaktionsstudien der Bakterienkombination *S. salivarius* mit *P. gingivalis* zeigten, dass der probiotische Keim in der Lage ist, den Parodontitiserreger zu verdrängen. Es bleibt jedoch die Frage, inwiefern *S. salivarius* bis zu diesem Keim in einem bereits ausgereiften Biofilm vordringen kann, und ob die im Transwell-System beobachtete Wirkung über eine gewisse Distanz in der natürlichen Umgebung erfolgen kann. Zudem muss wegen einer verstärkten Biofilmbildung in der direkten Kombination geklärt werden, ob *S. salivarius* unter bestimmten Umständen nicht auch zur Persistenz des Erregers beitragen kann.

- Für die beiden Pionierkeime *S. mitis* und *S. sanguinis* konnte eine inhibitorische Wirkung der Bakterien aufeinander festgestellt werden. Erste mögliche Faktoren für die antagonistische Wirkung von *S. mitis* wurden benannt. Möglicherweise hat die Verdrängung von *S. sanguinis* eine Bedeutung für die Initiation parodontaler Erkrankungen. Es zeigte sich, dass ein Überschuss an Arginin, wie er in parodontalen Taschen von Parodontitispatienten gefunden werden kann, eine Rolle spielt.

- Experimente mit dem Enzymcocktail Pronase zeigten, dass *F. nucleatum* ATCC 25586 in der Lage war, Biofilmstrukturen zu bilden, wenn zugleich das Mucin des in der Arbeit verwendeten künstlichen Speichels weggelassen wurde. Zudem wurde beobachtet, dass ein anderer *F. nucleatum* Stamm, *F. nucleatum* ATCC 23726, nicht in der Lage war, solche Biofilmstrukturen unter äquivalenten Bedingung zu bilden. Hierin könnte es einen Zusammenhang zum Auftreten von *F. nucleatum* gleichermaßen in parodontal gesunden und kranken Patienten geben. Die durch die Transkriptomanalysen mit dem ersten *F. nucleatum* Stamm erhaltenen Daten weisen auf einige Gene hin, die an der Biofilmbildung beteiligt sein könnten. Als direkte Konsequenz ist das Transkriptom von *F. nucleatum* ATCC 23726 unter den getesteten Bedingungen zu prüfen.

- Durch die Inkubation von *F. nucleatum* ATCC 25586, ATCC 23726 sowie *P. gingivalis* und *S. salivarius* mit HEp2-Zellen wurden erste Eindrücke aus der Kombination mehrerer Bakterienarten mit einer Zellart gesammelt. Die Experimente zeigten, dass *S. salivarius* in den Dreierkonstellationen

seine probiotische Wirkung behält. Zudem ergab sich aus den Versuchen die Vermutung, dass es einen Zusammenhang zwischen vorhandenem *F. nucleatum* Stamm und einer akut bzw. chronisch verlaufenden parodontalen Erkrankung gibt.

- Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen Ansatzpunkte für die Aufschlüsselung bakterieller Interaktionen. Ein Modell hinsichtlich der bakteriellen Interaktionen von *S. mitis* bzw. *S. salivarius* auf die anderen in dieser Studie getesteten Keime in simultan angeimpften Ko-Kulturen zeigt Abbildung 54. Um sich der *in situ* Situation weiter zu nähern, muss die Anzahl der verwendeten Keimarten entsprechend der Situation in der gesunden und erkrankten Mundhöhle gesteigert werden. Zudem sollte untersucht werden, was eine gezielte Änderung des pH-Werts, der Nährstoffzusammensetzung, sowie der Atmosphäre auf die Entwicklung der Biofilme und der darin enthaltenen Keime (sowie deren Anzahl und Vitalität) bewirkt.

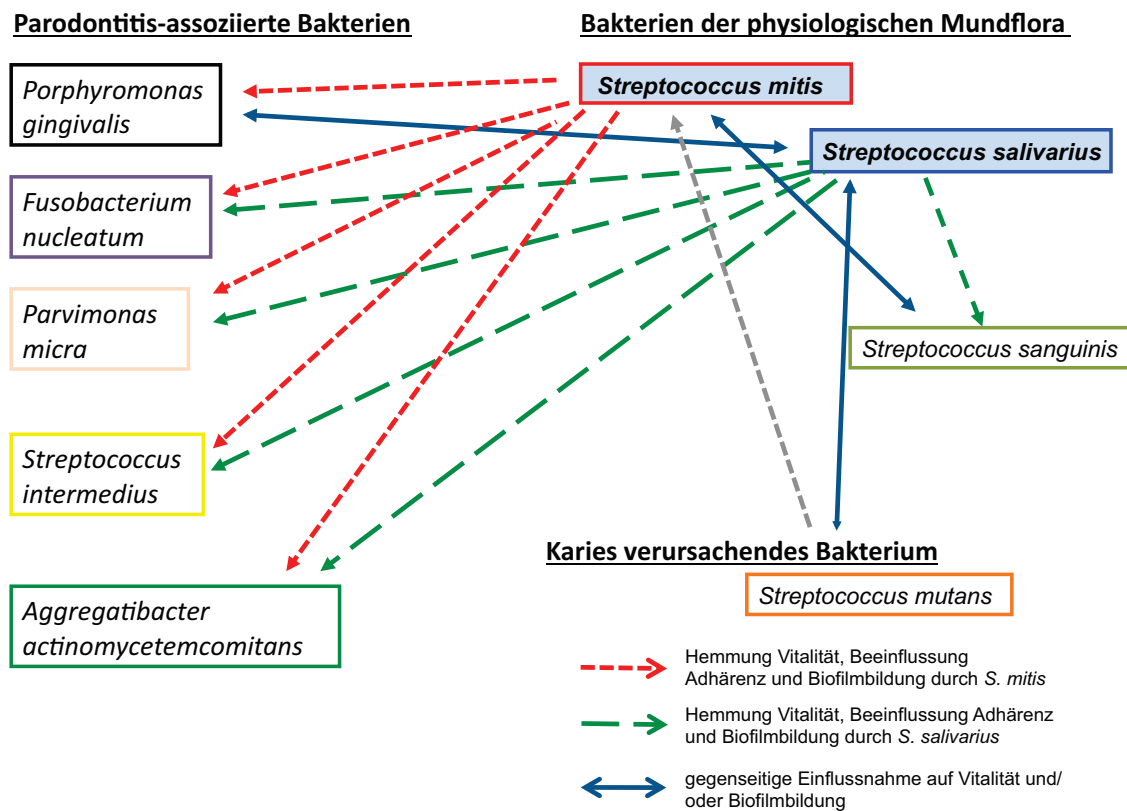


Abbildung 54: Modell der bakteriellen Interaktionen von *S. mitis* bzw. *S. salivarius* mit den getesteten obligat anaeroben und fakultativ aeroben Mikroorganismen in simultan angeimpften Ko-Kulturen.

6 Literaturverzeichnis

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43(11):5721-5732.
- Abbott JD, Shannon R. 1958. A method for typing *Shigella sonnei*, using colicine production as a marker. *J Clin Pathol* 11(1):71-77.
- Agnani G, Tricot-Doleux S, Du L, Bonnaure-Mallet M. 2000. Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to gingival epithelial cells: modulation of bacterial protein expression. *Oral Microbiol Immunol* 15(1):48-52.
- Alaluusua S, Asikainen S, Lai CH. 1991. Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 62(3):207-210.
- Albandar JM, Rams TE. 2002. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol* 2000 29:7-10.
- Ali RW, Bakken V, Nilsen R, Skaug N. 1994. Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. *J Periodontol* 65(11):1046-1052.
- Amarasinghe JJ, Scannapieco FA, Haase EM. 2009. Transcriptional and translational analysis of biofilm determinants of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in response to environmental perturbation. *Infect Immun* 77(7):2896-2907.
- Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. 2006. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *J Dent Res* 85(5):392-403.
- Anwar H, Dasgupta MK, Costerton JW. 1990. Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 34(11):2043-2046.
- Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4(1):1-6.
- Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A. 2001. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 46(5):471-476.
- Bachrach G, Ianculovici C, Naor R, Weiss EI. 2005. Fluorescence based measurements of *Fusobacterium nucleatum* coaggregation and of fusobacterial attachment to mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett* 248(2):235-240.
- Bakken V, Jensen HB. 1986. Outer membrane proteins of *Fusobacterium nucleatum* Fev1. *J Gen Microbiol* 132(4):1069-1078.
- Bantscheff M, Glocker MO. 2001. MALDI-Massenspektrometrie in der Proteomforschung. *BIOspektrum* 7:250-252.
- Boisvert H, Duncan MJ. 2008. Clathrin-dependent entry of a gingipain adhesin peptide and *Porphyromonas gingivalis* into host cells. *Cell Microbiol* 10(12):2538-2552.

- Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. 1996. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 9(1):55-71.
- Bowden GH. 1990. Microbiology of root surface caries in humans. *J Dent Res* 69(5):1205-1210.
- Bowen WH. 2002. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med* 13(2):126-131.
- Bradford MM. 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72(1-2):248-254.
- Bradshaw DJ, Marsh PD. 1998. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res* 32(6):456-462.
- Bradshaw DJ, Marsh PD, Schilling KM, Cummins D. 1996. A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms. *J Appl Bacteriol* 80(2):124-130.
- Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. 1989. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro. *J Dent Res* 68(9):1298-1302.
- Brown MR, Gilbert P. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol* 74 Suppl:87S-97S.
- Brown SA, Whiteley M. 2007. A novel exclusion mechanism for carbon resource partitioning in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Bacteriol* 189(17):6407-6414.
- Burgess NA, Kirke DF, Williams P, Winzer K, Hardie KR, Meyers NL, Aduse-Opoku J, Curtis MA, Camara M. 2002. LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiology* 148(Pt 3):763-772.
- Burne RA, Marquis RE. 2000. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett* 193(1):1-6.
- Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR. 2006. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *J Appl Microbiol* 100(4):754-764.
- Busscher HJ, Free RH, Van Weissenbruch R, Albers FW, Van Der Mei HC. 2000. Preliminary observations on influence of dairy products on biofilm removal from silicone rubber voice prostheses in vitro. *J Dairy Sci* 83(4):641-647.
- Busscher HJ, van der Mei HC. 1997. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res* 11(1):24-32.
- Carlsson J, Grahnen H, Jonsson G, Wikner S. 1970. Early establishment of *Streptococcus salivarius* in the mouth of infants. *J Dent Res* 49(2):415-418.
- Casiano-Colon A, Marquis RE. 1988. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl Environ Microbiol* 54(6):1318-1324.

- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Moreck D, Buret A. 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37(6):1771-1776.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 183(18):5385-5394.
- Chen T, Nakayama K, Belliveau L, Duncan MJ. 2001. *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* 69(5):3048-3056.
- Clerehugh V, Seymour GJ, Bird PS, Cullinan M, Drucker DB, Worthington HV. 1997. The detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* using an ELISA in an adolescent population with early periodontitis. *J Clin Periodontol* 24(1):57-64.
- Costerton JW. 1995. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15(3):137-140.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41:435-464.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. 1978. How bacteria stick. *Sci Am* 238(1):86-95.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
- Cowan MM, van der Mei HC, Rouxhet PG, Busscher HJ. 1992. Physico-chemical and structural properties of the surfaces of *Peptostreptococcus micros* and *Streptococcus mitis* as compared to those of mutans streptococci, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus salivarius*. *J Gen Microbiol* 138(12):2707-2714.
- Curtis MA, Aduse-Opoku J, Rangarajan M. 2001. Cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Crit Rev Oral Biol Med* 12(3):192-216.
- Dahlen G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O. 1992. Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor oral hygiene. *J Clin Periodontol* 19(1):35-42.
- Darveau RP, Tanner A, Page RC. 1997. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 14:12-32.
- Davey ME, O'Toole G A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4):847-867.
- Davies RM. 2007. The clinical efficacy of triclosan/copolymer and other common therapeutic approaches to periodontal health. *Clin Microbiol Infect* 13 Suppl 4:25-29.
- de Lillo A, Booth V, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG. 2004. Culture-independent identification of periodontitis-associated *Porphyromonas* and *Tannerella* populations by targeted molecular analysis. *J Clin Microbiol* 42(12):5523-5527.
- Dibdin G, Wimpenny J. 1999. Steady-state biofilm: practical and theoretical models. *Methods Enzymol* 310:296-322.

- Doern CD, Burnham CA. 2010. It's Not Easy Being Green: The Viridans Group Streptococci with a Focus on Pediatric Clinical Manifestations. *J Clin Microbiol*.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8(9):881-890.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 28(3):350-356.
- Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. 1993. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun* 61(5):2260-2265.
- Dunne WM, Jr. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15(2):155-166.
- Facklam R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15(4):613-630.
- Federle MJ. 2009. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. *Contrib Microbiol* 16:18-32.
- Federle MJ, Bassler BL. 2003. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* 112(9):1291-1299.
- Fitzgerald RJ, Jordan HV, Stanley HR. 1960. Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. *J Dent Res* 39:923-935.
- Fitzpatrick RE, Wijeyewickrema LC, Pike RN. 2009. The gingipains: scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Future Microbiol* 4(4):471-487.
- Flemming H-CaW, J. . 2001. Biofilme — die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biologie in unserer Zeit* 31:169-180.
- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. 2007. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 189(22):7945-7947.
- Flemming HC, Wingender J. 2001a. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* 43(6):1-8.
- Flemming HC, Wingender J. 2001b. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects. *Water Sci Technol* 43(6):9-16.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176(2):269-275.
- Gal JY, Fovet Y, Adib-Yadzi M. 2001. About a synthetic saliva for in vitro studies. *Talanta* 53(6):1103-1115.
- Genco RJ. 1996. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 67(10 Suppl):1041-1049.
- Gibbons RJ. 1989. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 68(5):750-760.

- Gibbons RJ, Hay DI, Cisar JO, Clark WB. 1988. Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infect Immun* 56(11):2990-2993.
- Gibbons RJ, Hay DI, Schlesinger DH. 1991. Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect Immun* 59(9):2948-2954.
- Gilbert P, McBain A, Sreenivasan P. 2007. Common therapeutic approaches for the control of oral biofilms: microbiological safety and efficacy. *Clin Microbiol Infect* 13 Suppl 4:17-24.
- Givskov M, Rasmussen, T.B., Ren, D., Balaban, N. 2008. Bacterial Cell-to-cell Communication (Quorum Sensing). In: Balaban N, editor. *Control of Biofilm Infections by Signal Manipulation Springer Series on Biofilms*. p 13-38.
- Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. 1995. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 66(1):23-29.
- Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. 1994. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 65(3):260-267.
- Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S. 2001a. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 80(1):363-370.
- Guggenheim B, Guggenheim M, Gmur R, Giertsen E, Thurnheer T. 2004. Application of the Zurich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res* 38(3):212-222.
- Guggenheim M, Shapiro S, Gmur R, Guggenheim B. 2001b. Spatial arrangements and associative behavior of species in an in vitro oral biofilm model. *Appl Environ Microbiol* 67(3):1343-1350.
- Haase EM, Bonstein T, Palmer RJ, Jr., Scannapieco FA. 2006. Environmental influences on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. *Arch Oral Biol* 51(4):299-314.
- Hamada S, Ooshima T. 1975. Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 54(1):140-145.
- Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T, Nase L, Saxelin M, Korpela R. 2001. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ* 322(7298):1327.
- Hillman JD, Brooks TA, Michalek SM, Harmon CC, Snoep JL, van Der Weijden CC. 2000. Construction and characterization of an effector strain of *Streptococcus mutans* for replacement therapy of dental caries. *Infect Immun* 68(2):543-549.
- Hiraoka BY, Fukasawa K, Harada M. 1987. Metal ion inactivation and chelator stimulation of *Streptococcus mitis* arginine aminopeptidase. *Mol Cell Biochem* 73(2):111-115.

- Hiratsuka K, Abiko Y, Hayakawa M, Ito T, Sasahara H, Takiguchi H. 1992. Role of Porphyromonas gingivalis 40-kDa outer membrane protein in the aggregation of P. gingivalis vesicles and Actinomyces viscosus. Arch Oral Biol 37(9):717-724.
- Hiratsuka K, Hayakawa M, Kiyama-Kishikawa M, Sasaki Y, Hirai T, Abiko Y. 2008. Role of the hemin-binding protein 35 (HBP35) of Porphyromonas gingivalis in coaggregation. Microb Pathog 44(4):320-328.
- Hogg SD, Manning JE. 1988. Inhibition of adhesion of viridans streptococci to fibronectin-coated hydroxyapatite beads by lipoteichoic acid. J Appl Bacteriol 65(6):483-489.
- Hogg SD, Whiley RA, De Soet JJ. 1997. Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. Int J Syst Bacteriol 47(1):62-66.
- Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. 1999. Virulence factors of Porphyromonas gingivalis. Periodontol 2000 20:168-238.
- Hope CK, Wilson M. 2006. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. J Microbiol Methods 66(3):390-398.
- Hosogi Y, Duncan MJ. 2005. Gene expression in Porphyromonas gingivalis after contact with human epithelial cells. Infect Immun 73(4):2327-2335.
- Inoue T, Shingaki R, Sogawa N, Sogawa CA, Asaumi J, Koikeguchi S, Fukui K. 2003. Biofilm formation by a fimbriae-deficient mutant of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Microbiol Immunol 47(11):877-881.
- Islam B, Khan SN, Khan AU. 2007. Dental caries: from infection to prevention. Med Sci Monit 13(11):RA196-203.
- Iwatani S, Zendo, T., Yoneyama, F., Nakayama, J., Sonomoto, K., . 2007. Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, Lacticin Z, produced by Lactococcus lactis QU14. . Biosc Biotechnol Biochem 71:1984-1992.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. 1997. Streptococcal adhesion and colonization. Crit Rev Oral Biol Med 8(2):175-200.
- Joerger RD. 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poult Sci 82(4):640-647.
- Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, Reznik G, Los T, Lykidis A, Bhattacharyya A, Bartman A, Gardner W, Grechkin G, Zhu L, Vasieva O, Chu L, Kogan Y, Chaga O, Goltsman E, Bernal A, Larsen N, D'Souza M, Walunas T, Pusch G, Haselkorn R, Fonstein M, Kyrpides N, Overbeek R. 2002. Genome sequence and analysis of the oral bacterium Fusobacterium nucleatum strain ATCC 25586. J Bacteriol 184(7):2005-2018.
- Kaplan CW, Lux R, Haake SK, Shi W. 2009. The Fusobacterium nucleatum outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm. Mol Microbiol 71(1):35-47.

- Kaplan JB, Meyenhofer MF, Fine DH. 2003. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Bacteriol* 185(4):1399-1404.
- Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. 2003. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* 41(2):558-563.
- Kinane DF. 2001. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 25:8-20.
- Kinder SA, Holt SC. 1993. Localization of the *Fusobacterium nucleatum* T18 adhesin activity mediating coaggregation with *Porphyromonas gingivalis* T22. *J Bacteriol* 175(3):840-850.
- Kinder SA, Holt SC. 1994. Coaggregation between bacterial species. *Methods Enzymol* 236:254-270.
- Kleinberg I. 2002. 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* 13(2):108-125.
- Kolenbrander PE. 1989. Surface recognition among oral bacteria: multigeneric coaggregations and their mediators. *Crit Rev Microbiol* 17(2):137-159.
- Kolenbrander PE. 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 54:413-437.
- Kolenbrander PE, Andersen RN. 1989. Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by lactose and related sugars. *Infect Immun* 57(10):3204-3209.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3):486-505, table of contents.
- Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV. 1993. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J* 7(5):406-413.
- Kolenbrander PE, London J. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 175(11):3247-3252.
- Kondo W, Sato, M., Sato, N., . 1978. Properties of the human salivary aggregating factor for *Leptotrichia buccalis* cells. *Archs Oral Biol* 23:453-458.
- Kononen E, Asikainen S, Saarela M, Karjalainen J, Jousimies-Somer H. 1994. The oral gram-negative anaerobic microflora in young children: longitudinal changes from edentulous to dentate mouth. *Oral Microbiol Immunol* 9(3):136-141.
- Kreth J, Merritt J, Bordador C, Shi W, Qi F. 2004. Transcriptional analysis of mutacin I (*mutA*) gene expression in planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans* using fluorescent protein and glucuronidase reporters. *Oral Microbiol Immunol* 19(4):252-256.
- Kulik EM, Sandmeier H, Hinni K, Meyer J. 2001. Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis. *FEMS Microbiol Lett* 196(2):129-133.
- Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. 2003. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 82(5):338-344.

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lamont RJ, and Jenkinson, H.F. 2000. Adhesion as an ecological determinant in the oral cavity. Wymondham.
- Lamont RJ, El-Sabaeny A, Park Y, Cook GS, Costerton JW, Demuth DR. 2002. Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. *Microbiology* 148(Pt 6):1627-1636.
- Lantz MS, Allen RD, Duck LW, Blume JL, Switalski LM, Hook M. 1991. Identification of *Porphyromonas gingivalis* components that mediate its interactions with fibronectin. *J Bacteriol* 173(14):4263-4270.
- Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. 2000. Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res* 14:22-28.
- Lerliche V, Carpentier B. 2000. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J Appl Microbiol* 88(4):594-605.
- Levesque C, Pelletier LG. 2003. On the investigation of primed and chronic autonomous and heteronomous motivational orientations. *Pers Soc Psychol Bull* 29(12):1570-1584.
- Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45(4):999-1007.
- Liljemark WF, Fenner LJ, Bloomquist CG. 1986. In vivo colonization of salivary pellicle by *Haemophilus*, *Actinomyces* and *Streptococcus* species. *Caries Res* 20(6):481-497.
- Loe H. 1993. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 16(1):329-334.
- Loesche WJ. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50(4):353-380.
- Loesche WJ, Gusberti F, Mettraux G, Higgins T, Syed S. 1983. Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infect Immun* 42(2):659-667.
- Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. 2000. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J Bacteriol* 182(5):1374-1382.
- Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, Grossi S, Ho A, Davis G, Chandler J, Zambon J, Genco RJ. 1999. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol* 26(6):374-380.
- Macpherson LMD, Macfarlane, T.W., Stephen, K.W. 1991. An in situ microbiological study of the early colonization of human enamel surfaces. *Microb Ecol Health Dis* 4:39-46.
- Madigan MT, Martinko, J.M., Parker, J. . 2000. *Brock Biology of Microorganisms* Göbel, editor. Berlin: Spektrum Akad. Verl.

- Maeda K, Nagata H, Nonaka A, Kataoka K, Tanaka M, Shizukuishi S. 2004. Oral streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mediates interaction with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Microbes Infect* 6(13):1163-1170.
- Maestre JR, Bascones A, Sanchez P, Matesanz P, Aguilar L, Gimenez MJ, Perez-Balcabao I, Granizo JJ, Prieto J. 2007. Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. *Rev Esp Quimioter* 20(1):61-67.
- Manetti AGO, Koeller, T., Becherelli, M., Buccato, S., Kreikemeyer, B., Podbielski, A., Grandi, G., Margarit, I. 2010. Environmental acidification drives *Streptococcus pyogenes* pilus expression and epithelial colonization in a FCT-dependent manner. *Plos One* accepted.
- Marquis RE, Bender GR, Murray DR, Wong A. 1987. Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Appl Environ Microbiol* 53(1):198-200.
- Marsh PD. 1989. Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. *J Dent Res* 68:1567-1575.
- Marsh PD. 1991. The significance of maintaining the stability of the natural microflora of the mouth. *Br Dent J* 171(6):174-177.
- Marsh PD. 1994. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 8(2):263-271.
- Marsh PD. 1999a. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 43(4):599-614, v-vi.
- Marsh PD. 2000. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity. In: Ellen HKRP, editor. *Oral Bacterial Ecology: the Molecular Basis*. Wymondham: Horizon Scientific Press. p 11-65.
- Marsh PD. 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149(Pt 2):279-294.
- Marsh PD, Martin, M.V. 1999b. *Oral microbiology*. Oxford: Wright.
- Matz C, Bergfeld T, Rice SA, Kjelleberg S. 2004. Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environ Microbiol* 6(3):218-226.
- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA. 2000. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 71(11):1699-1707.
- Miller WD. 1973. *The micro-organisms of the human mouth*. Karger S, editor. New York: Karger, S.
- Molin S, Tolker-Nielsen T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* 14(3):255-261.
- Molinari G, Talay SR, Valentin-Weigand P, Rohde M, Chhatwal GS. 1997. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun* 65(4):1357-1363.

- Mongiello JR, Falker Jr, W.A. 1979. Sugar inhibition of oral *Fusobacterium nucleatum* hemagglutination and cell binding. *Archs Oral Biol* 24:539-549.
- Monroe D. 2007. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol* 5(11):e307.
- Moore LV, Moore WE, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Best AM, Ranney RR. 1987. Bacteriology of human gingivitis. *J Dent Res* 66(5):989-995.
- Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, Good IJ, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. 1982. Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect Immun* 38(2):651-667.
- Moore WE, Moore LV. 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5:66-77.
- Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. 2004. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 42(7):3023-3029.
- Namikoshi J, Otake S, Maeba S, Hayakawa M, Abiko Y, Yamamoto M. 2003. Specific antibodies induced by nasally administered 40-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* inhibits coaggregation activity of *P. gingivalis*. *Vaccine* 22(2):250-256.
- Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Kolonay JF, Nelson WC, Mason T, Tallon L, Gray J, Granger D, Tettelin H, Dong H, Galvin JL, Duncan MJ, Dewhirst FE, Fraser CM. 2003. Complete genome sequence of the oral pathogenic *Bacterium porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol* 185(18):5591-5601.
- Nishikawa K, Duncan MJ. 2010. Histidine kinase-mediated production and autoassembly of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Bacteriol* 192(7):1975-1987.
- Noiri Y, Ebisu S. 2000. Identification of periodontal disease-associated bacteria in the "plaque-free zone". *J Periodontol* 71(8):1319-1326.
- Noiri Y, Li L, Ebisu S. 2001. The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *J Dent Res* 80(10):1930-1934.
- Noiri Y, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T, Ebisu S. 1997. An immunohistochemical study on the localization of *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* and *Actinomyces viscosus* in human periodontal pockets. *J Periodontal Res* 32(7):598-607.
- Nyvad B, Kilian M. 1987. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95(5):369-380.
- Nyvad B, Kilian M. 1990. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res* 24(4):267-272.
- O'Toole GA, Gibbs KA, Hager PW, Phibbs PV, Jr., Kolter R. 2000. The global carbon metabolism regulator *Crc* is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182(2):425-431.
- Ohta H, Inoue T, Fukui K. 2001. Energy metabolism of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during anaerobic and microaerobic growth in low- and high-potassium continuous culture. *Microbiology* 147(Pt 9):2461-2468.

- Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, Gordon HA, Wagner M. 1955. Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc* 50(3):259-272.
- Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD. 1954. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res* 33(2):147-174.
- Owens CD, Stoessel K. 2008. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *J Hosp Infect* 70 Suppl 2:3-10.
- Ozaki M, Miyake Y, Shirakawa M, Takemoto T, Okamoto H, Suginaka H. 1990. Binding specificity of *Fusobacterium nucleatum* to human erythrocytes, polymorphonuclear leukocytes, fibroblasts, and HeLa cells. *J Periodontal Res* 25(3):129-134.
- Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. 2006. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res* 85(10):878-887.
- Page RC. 1991. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 26(3 Pt 2):230-242.
- Page RC, Beck JD. 1997. Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J* 47(2):61-87.
- Palmer RJ, Jr., Kazmerzak K, Hansen MC, Kolenbrander PE. 2001. Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. *Infect Immun* 69(9):5794-5804.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183(12):3770-3783.
- Periasamy S, Kolenbrander PE. 2009. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 191(22):6804-6811.
- Periasamy S, Kolenbrander PE. 2010. Central role of the early colonizer *Veillonella* sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 192(12):2965-2972.
- Pike RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer TH, Travis J. 1996. Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 178(10):2876-2882.
- Podbielski A, Kreikemeyer B. 2004. Cell density--dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J Infect Dis* 8(2):81-95.
- Poolman B, Driessen AJ, Konings WN. 1987. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol* 169(12):5597-5604.
- Pratten J, Smith AW, Wilson M. 1998. Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother* 42(4):453-459.
- Reeves P. 1965. The Bacteriocins. *Bacteriological Reviews* 29:24-45.

- Reid G. 2005. The importance of guidelines in the development and application of probiotics. *Curr Pharm Des* 11(1):11-16.
- Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC. 1994. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res* 8(2):312-319.
- Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E, Kay SL, Zhu X, DeRouen TA, Adams DF. 1996. Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *J Periodontol* 67(2):109-115.
- Roeselers G, Loosdrecht MC, Muyzer G. 2008. Phototrophic biofilms and their potential applications. *J Appl Phycol* 20(3):227-235.
- Rogers AH. 1990. Utilization of nitrogenous compounds by oral bacteria. *Aust Dent J* 35(5):468-471.
- Rosan B, Lamont RJ. 2000. Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2(13):1599-1607.
- Ross KF, Ronson CW, Tagg JR. 1993. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl Environ Microbiol* 59(7):2014-2021.
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. 2001. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun* 69(4):2700-2707.
- Ruhl S, Sandberg AL, Cisar JO. 2004. Salivary receptors for the proline-rich protein-binding and lectin-like adhesins of oral actinomyces and streptococci. *J Dent Res* 83(6):505-510.
- Russell C, Coulter WA. 1975. Continuous monitoring of pH and Eh in bacterial plaque grown on a tooth in an artificial mouth. *Appl Microbiol* 29(2):141-144.
- Saarela M, von Troil-Linden B, Torkko H, Stucki AM, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, Asikainen S. 1993. Transmission of oral bacterial species between spouses. *Oral Microbiol Immunol* 8(6):349-354.
- Saito Y, Fujii R, Nakagawa KI, Kuramitsu HK, Okuda K, Ishihara K. 2008. Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 23(1):1-6.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463-5467.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184(4):1140-1154.
- Savitt ED, Socransky SS. 1984. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. *J Periodontal Res* 19(2):111-123.
- Scheie AA. 1994. Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 8(2):246-253.

- Scragg MA, Cannon SJ, Rangarajan M, Williams DM, Curtis MA. 1999. Targeted disruption of fibronectin-integrin interactions in human gingival fibroblasts by the RI protease of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Infect Immun* 67(4):1837-1843.
- Sedlacek MJ, Walker C. 2007. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol* 22(5):333-339.
- Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. 2007. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect* 13 Suppl 4:3-10.
- Sheiham A, Netuveli GS. 2002. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol* 2000 29:104-121.
- Shibata Y, Hiratsuka K, Hayakawa M, Shiroza T, Takiguchi H, Nagatsuka Y, Abiko Y. 2003. A 35-kDa co-aggregation factor is a hemin binding protein in *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 300(2):351-356.
- Shu M, Wong L, Miller JH, Sissons CH. 2000. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Arch Oral Biol* 45(1):27-40.
- Slots J. 1977. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand J Dent Res* 85(4):247-254.
- Slots J, Genco RJ. 1984. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res* 63(3):412-421.
- Slots J, Ting M. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000 20:82-121.
- Socransky SS, Haffajee AD. 2005. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 38:135-187.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25(2):134-144.
- Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD. 1988. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol Immunol* 3(1):1-7.
- Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM. 1993. Factors influencing the growth and viability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* 8(6):361-369.
- Standar K, Kreikemeyer B, Redanz S, Münter WL, Laue M, Podbielski A. 2010. Setup of an In Vitro Test System for Basic Studies on Biofilm Behavior of Mixed-Species Cultures with Dental and Periodontal Pathogens. *PLoS ONE* accepted.
- Standar K, Mehner D, Osadnik H, Berthelmann F, Hause G, Lunsdorf H, Bruser T. 2008. PspA can form large scaffolds in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 582(25-26):3585-3589.
- Statistisches-Bundesamt. 2006. Generationen-Sterbetaefeln für Deutschland. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt.
- Steindler L, Venturi V. 2007. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett* 266(1):1-9.
- Stewart PS, Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358(9276):135-138.

- Stingu CS, Eschrich K, Rodloff AC, Schaumann R, Jentsch H. 2008. Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. *J Med Microbiol* 57(Pt 4):495-499.
- Stinson MW, Safulko K, Levine MJ. 1991. Adherence of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* to *Streptococcus sanguis* in vitro. *Infect Immun* 59(1):102-108.
- Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle JD, Lappin-Scott HM. 1998. Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnol Bioeng* 57(5):536-544.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187-209.
- Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM, Costerton JW. 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* 67(12):5608-5613.
- Sutherland I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147(Pt 1):3-9.
- Syed SA, Loesche WJ. 1978. Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque age. *Infect Immun* 21(3):821-829.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews* 40(3):722-756.
- Tagg JR, Dierksen KP. 2003. Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention. *Trends Biotechnol* 21(5):217-223.
- Talarico TL, Dobrogosz WJ. 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother* 33(5):674-679.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2(8):151-153.
- Tanner A. 1991. Microbial succession in the development of periodontal disease. In: Hamada S, Holt, S.C., McGhee, J.R., editor. *Periodontal disease: pathogens and host immune response*. Tokyo: Quintessence Publishing Co., Ltd. p 13-25.
- Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL, Jr. 1998. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 25(2):85-98.
- Tanner AC, Kent R, Jr., Van Dyke T, Sonis ST, Murray LA. 2005. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. *J Periodontol* 76(4):573-581.
- Tanner AC, Paster BJ, Lu SC, Kanasi E, Kent R, Jr., Van Dyke T, Sonis ST. 2006. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. *J Dent Res* 85(4):318-323.
- Tannock G. 1995. *Normal Microflora: an Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body*. London: Chapman and Hall.

- Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J. 1985. Competitive displacement of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* TOVE-R. *Infect Immun* 48(1):44-50.
- Teughels W, Kinder Haake S, Sliepen I, Pauwels M, Van Eldere J, Cassiman JJ, Quirynen M. 2007. Bacteria interfere with *A. actinomycetemcomitans* colonization. *J Dent Res* 86(7):611-617.
- Timmerman MF, van der Weijden GA. 2006. Risk factors for periodontitis. *Int J Dent Hyg* 4(1):2-7.
- Tokuda M, Karunakaran T, Duncan M, Hamada N, Kuramitsu H. 1998. Role of Arg-gingipain A in virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 66(3):1159-1166.
- Tomar SL, Asma S. 2000. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol* 71(5):743-751.
- Travis J, Banbula A, Potempa J. 2000. The role of bacterial and host proteinases in periodontal disease. *Adv Exp Med Biol* 477:455-465.
- Twining SS. 1984. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal Biochem* 143(1):30-34.
- Upton M, Tagg JR, Wescombe P, Jenkinson HF. 2001. Intra- and interspecies signaling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* mediated by SalA and SalA1 lantibiotic peptides. *J Bacteriol* 183(13):3931-3938.
- Vadillo-Rodriguez V, Busscher HJ, Norde W, de Vries J, van der Mei HC. 2004. Relations between macroscopic and microscopic adhesion of *Streptococcus mitis* strains to surfaces. *Microbiology* 150(Pt 4):1015-1022.
- van de Rijn I, Kessler RE. 1980. Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infect Immun* 27(2):444-448.
- Van Hoogmoed CG, Geertsema-Doornbusch GI, Teughels W, Quirynen M, Busscher HJ, Van der Mei HC. 2008. Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. *Oral Microbiol Immunol* 23(1):43-48.
- van Hoogmoed CG, van Der Kuijl-Booij M, van Der Mei HC, Busscher HJ. 2000. Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without a salivary conditioning film by biosurfactant-releasing *Streptococcus mitis* strains. *Appl Environ Microbiol* 66(2):659-663.
- van Loosdrecht MC, Norde W, Zehnder AJ. 1990. Physical chemical description of bacterial adhesion. *J Biomater Appl* 5(2):91-106.
- van Steenberg TJ, Petit MD, Scholte LH, van der Velden U, de Graaff J. 1993. Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. *J Clin Periodontol* 20(5):340-345.
- van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. 2002. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 29(11):1023-1028.
- Van Wuyckhuysse BC, Perinpanayagam HE, Bevacqua D, Raubertas RF, Billings RJ, Bowen WH, Tabak LA. 1995. Association of free arginine and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. *J Dent Res* 74(2):686-690.

- Vickerman MM, Clewell DB, Jones GW. 1991. Sucrose-promoted accumulation of growing glucosyltransferase variants of *Streptococcus gordonii* on hydroxyapatite surfaces. *Infect Immun* 59(10):3523-3530.
- Vickerman MM, Jones GW. 1995. Sucrose-dependent accumulation of oral streptococci and their adhesion-defective mutants on saliva-coated hydroxyapatite. *Oral Microbiol Immunol* 10(3):175-182.
- Wang BY, Kuramitsu HK. 2005. Interactions between oral bacteria: inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*. *Appl Environ Microbiol* 71(1):354-362.
- Watanabe K, Yamaji Y, Umemoto T. 1992. Correlation between cell-adherent activity and surface structure in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 7(6):357-363.
- Watnick PI, Kolter R. 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* 34(3):586-595.
- Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. 2010. Peptidylarginine deiminase from *porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*.
- Williams P, Winzer K, Chan WC, Camara M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362(1483):1119-1134.
- Wimpenny JWT, Colasanti R. 1997. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *Fems Microbiol Ecol* 22(1):1-16.
- Withers H, Swift S, Williams P. 2001. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4(2):186-193.
- Wolcott RD. 2008. Clinical Wound Healing Using Signal Inhibitors. In: Balaban N, editor. *Control of Biofilm Infections by Signal Manipulation: Springer Series on Biofilms*. p 157-170.
- Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. 2000. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 79(1):21-27.
- Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF. 2003. Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* 47(11):3407-3414.
- Wu T, Trevisan M, Genco RJ, Dorn JP, Falkner KL, Sempos CT. 2000. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first national health and nutrition examination survey and its follow-up study. *Arch Intern Med* 160(18):2749-2755.
- Xavier KB, Bassler BL. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 6(2):191-197.
- Xie H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ. 2000. Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol* 182(24):7067-7069.

-
- Xie H, Gibbons RJ, Hay DI. 1991. Adhesive properties of strains of *Fusobacterium nucleatum* of the subspecies *nucleatum*, *vincentii* and *polymorphum*. *Oral Microbiol Immunol* 6(5):257-263.
- Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* 146 (Pt 3):547-549.
- Xu P, Alves JM, Kitten T, Brown A, Chen Z, Ozaki LS, Manque P, Ge X, Serrano MG, Puiu D, Hendricks S, Wang Y, Chaplin MD, Akan D, Paik S, Peterson DL, Macrina FL, Buck GA. 2007. Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *J Bacteriol* 189(8):3166-3175.
- Yamazaki Y, Ebisu S, Okada H. 1988. Partial purification of a bacterial lectinlike substance from *Eikenella corrodens*. *Infect Immun* 56(1):191-196.
- Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. 2001. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 80(5):1436-1440.
- Zilm PS, Rogers AH. 2007. Co-adhesion and biofilm formation by *Fusobacterium nucleatum* in response to growth pH. *Anaerobe* 13(3-4):146-152.

7 Anhang

7.1 Zusammensetzung des chemisch definierten Mediums (CDM)

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Medium CDM / Saccharose wurde wie folgt zusammengesetzt:

Na_2HPO_4	7,35 g
NaH_2PO_4	3,2 g
$\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})$	4,5 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	ad 200 ml

Nach Lösen der Substanzen wurden die in Tabelle 23 aufgeführten Stammlösungen wie folgt zugesetzt:

1	Phosphatpuffer	10 ml
2	Asparagin	20 ml
3	Aminosäure-Mix	20 ml
4	L-Leucin	20 ml
5	L-Glutamat	3,4 ml
6	D/L-Alanin	5 ml
7	L-Isoleucin	10 ml
8	L-Methionin	10 ml
9	L-Threonin	10 ml
10	L-Argenin HCl	5 ml
11	L-Histidin HCl	5 ml
12	L-Thryptophan	5 ml
13	L-Valin	5 ml
14	L-Lysin	5 ml
15	Riboflavin	25 ml
16	Vitamin Mix	25 ml
17	Biotin	20 ml
18	Folsäure	40 ml
19	Pyridoxamin 2HCl	6,25 ml
20	L-Glutamin	10 ml
25	L-Cystin	5 ml

26	L-Tyrosin	10 ml
27	AGU Mix	44 ml
28	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5 ml
29	Salze	5 ml

Pyridoxal HCL	1 mg
NADH	2,5 mg
H ₂ O _{reinst}	ad 1000 ml

Der pH Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Nach dem Sterilfiltrieren wurde das CDM für maximal 14 Tage bei 4 °C gelagert.

Erst kurz vor Gebrauch des Mediums wurde Saccharose zugesetzt (50 mM Endkonzentration) und die Komponenten 30 und 31 (siehe Tabelle 23) hergestellt. Diese wurden sterilfiltriert und wie folgt verwendet:

30	Natrium-Bicarbonate	200 µl
31	L-Cystein	100 µl
CDM		ad 10 ml

Tabelle 23: Stammlösungen zur Herstellung von CDM (chemisch definiertes Medium). Die hier aufgeführten Stammlösungen wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Nr.	Name	Komponente 1	Menge in g	Komponente 2	Komponente 3	Endvol. in ml	Besonderheiten
1	Phosphatpuffer	KH ₂ PO ₄	2		H ₂ O	100	
		K ₂ HPO ₄	10				
2	Asparagin		1		H ₂ O	200	
3	Aminosäure-Mix	L-Aspartat	2	6,4 ml 2,5 N NaOH	H ₂ O	400	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
		L-Phenylalanin	2				
		L-Serin	2				
		L-Prolin	4				
		L-Hydroxyprolin	4				
	Glycin	4					
4	L-Leucin		1		H ₂ O	100	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
5	L-Glutamat		6	19,2 ml 2,5 N NaOH	H ₂ O	200	
6	D/L-Alanin		4		H ₂ O	200	
7	L-Isoleucin		2		H ₂ O	200	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
8	L-Methionin		2		H ₂ O	200	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
9	L-Threonin		2		H ₂ O	100	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
10	L-Argenin HCl		4,84		H ₂ O	200	
11	L-Histidin HCl		5,4		H ₂ O	200	
	H ₂ O						
12	L-Thryptophan		4	20 ml 2N HCl	H ₂ O	200	
13	L-Valin		2		H ₂ O	100	
14	L-Lysin H ₂ O		2,76		H ₂ O	100	
15	Riboflavin		0,008	0,1 ml conc. Acetic Acid	H ₂ O	100	
16	Vitamin Mix	Nicotinamid	0,1		H ₂ O	250	
		Thiamin HCl	0,02				
		Aminobenzoessäure	0,004				
		Ca Pantothersäure	0,02				
17	Biotin		0,005	5 mg in 1 ml 95% EtOH + 49 ml 0,01N HCl	20 ml des gelösten Biotins in 180 ml 0,01 N HCl	200	Dunkel lagern
18	Folsäure		0,005	0,1 ml 2,5 N NaOH	H ₂ O	250	
19	Pyridoxamin 2HCl		0,023		H ₂ O	100	
20	L-Glutamin		4		H ₂ O	200	
25	L-Cystin		4	80 ml 2 N HCl	H ₂ O	400	
26	L-Tyrosin		4	16 ml 2,5 N NaOH	H ₂ O	400	
27	AGU Mix	Adeninsulfat	0,435	50 ml 2 N HCl	H ₂ O	500	
		Guanin HCl H ₂ O	0,310				
		Uracil	0,25				
28	MgSO ₄ x 7 H ₂ O		7	1 ml 2 N HCl	H ₂ O	50	
29	Salze	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1	1,2 ml 2 N HCL	H ₂ O	100	
		CaCl ₂	0,20				
		MnSO ₄ x H ₂ O	0,1				
		Fe(NO ₃) ₃ x 9 H ₂ O	0,020				
30	Natrium-Bicarbonate		1,25		H ₂ O	10	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
31	L-Cystein		0,250		H ₂ O	5	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C

7.2 Abbildungen

Abbildung 55A)

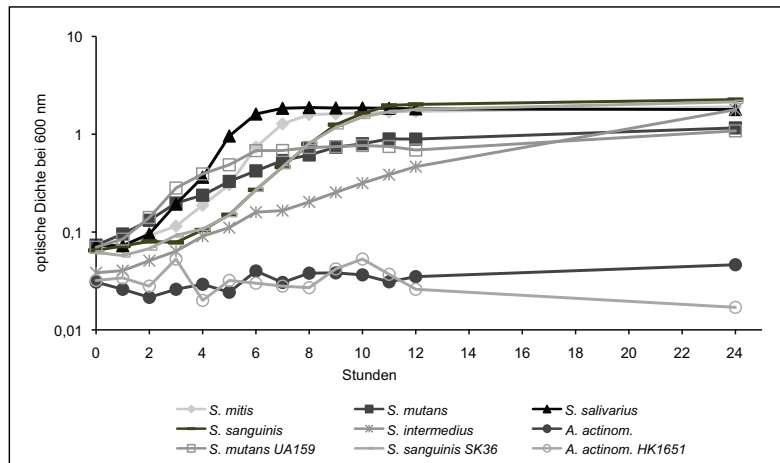


Abbildung 55B)

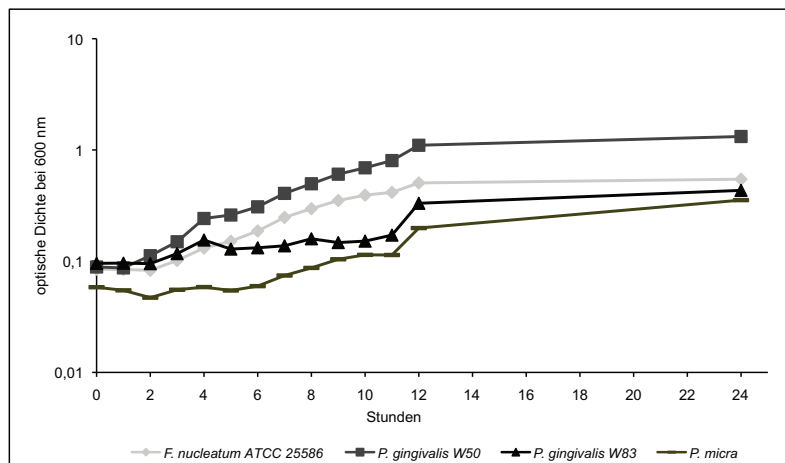


Abbildung 55: Wachstumskinetik der verschiedenen Bakterienspezies. A) Wachstum der fakultativ aeroben Spezies in CDM/Saccharose. B) Wachstum der obligat anaeroben Spezies in künstlichem Speichel/Galaktose. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Stündlich wurde eine Probe entnommen und deren optische Dichte bei 600 nm mit dem Photometer bestimmt.

Abbildung 56A)

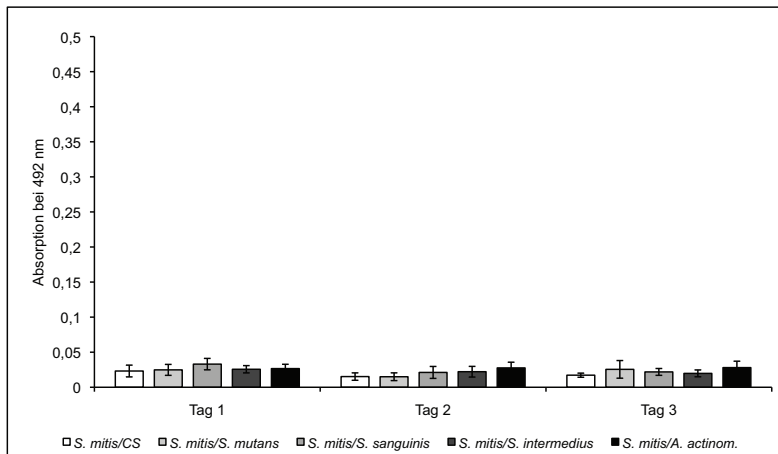


Abbildung 56B)

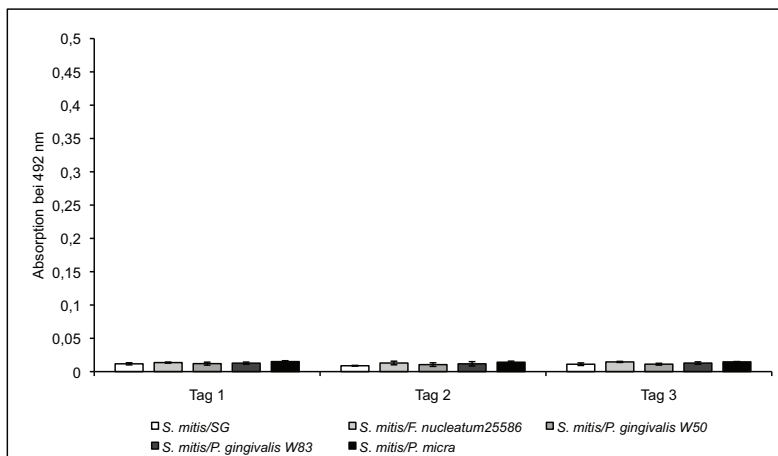


Abbildung 56: Ergebnisse der Transwell-Experimente mit *S. mitis* im unteren Kompartiment des Transwell-Systems. Bestimmung der Biofilm-Masse im unteren Kompartiment mittels Safranin-Färbung. A) *S. mitis* unter dem Einfluss der verschiedenen fakultativ aeroben Bakterienpezies, B) *S. mitis* unter dem Einfluss der verschiedenen obligat anaeroben Bakterienpezies. CS – CDM/Saccharose, SG – künstlicher Speichel/Galaktose.

Abbildung 57A)

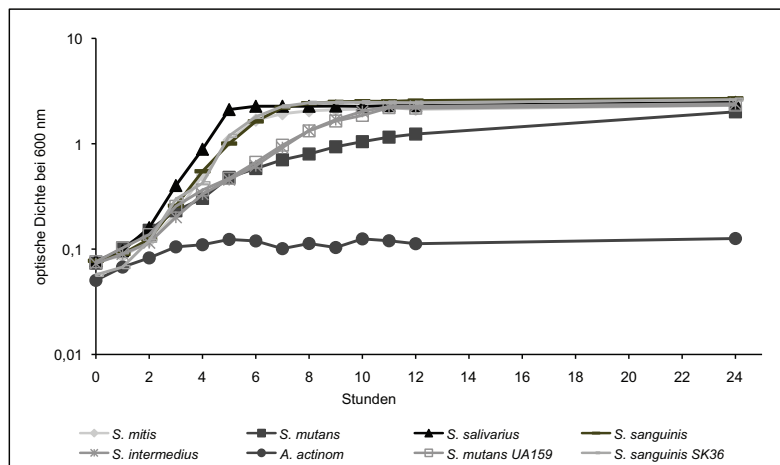


Abbildung 57B)

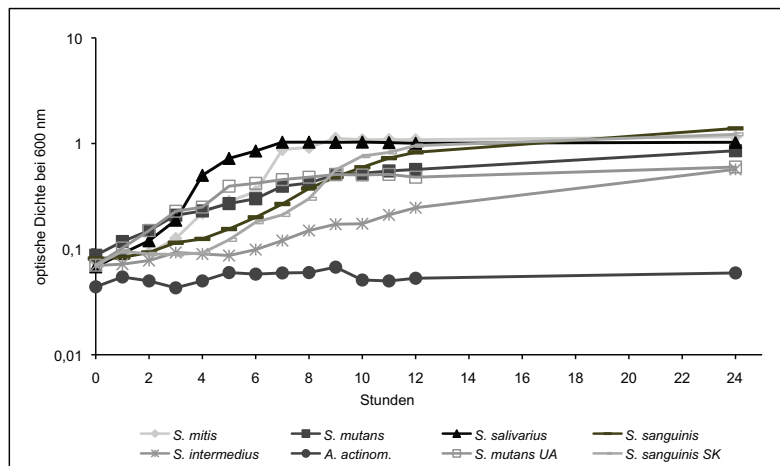


Abbildung 57C)

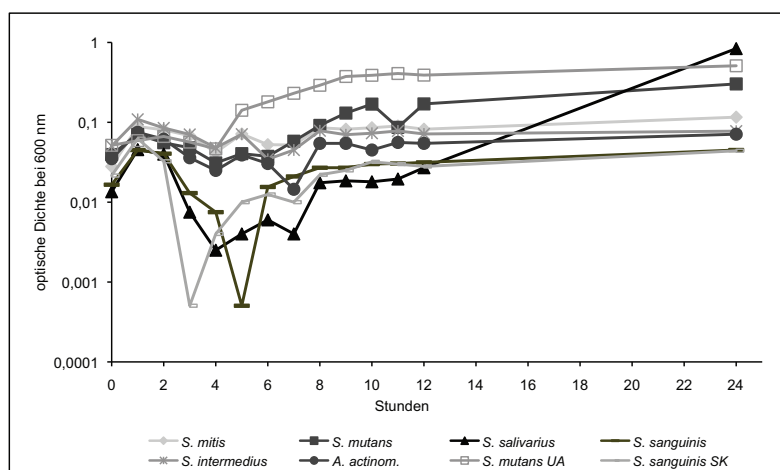


Abbildung 57D)

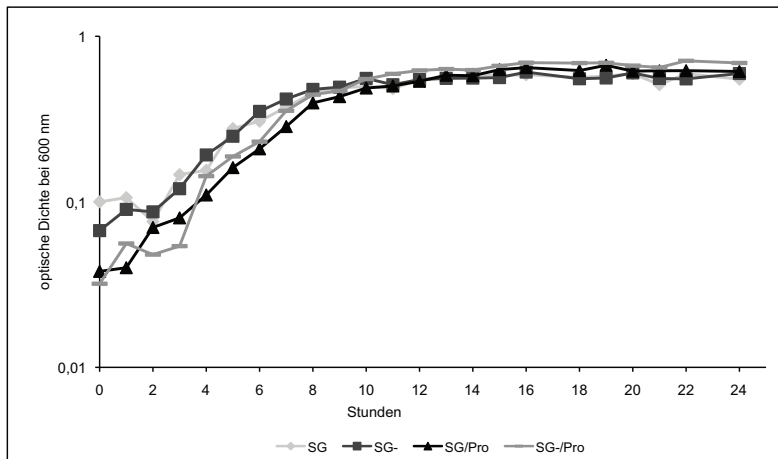


Abbildung 57: Wachstumskinetik der verschiedenen Spezies nach Zusatz von Pronase, DNase bzw. Natriummetaperiodat (NMP). Wachstum der fakultativ aeroben Spezies in CDM/Saccharose mit A) 500 µg/ml Pronase, B) 90 Units/ml DNase bzw. C) 10 mM NMP. D) Wachstum von *F. nucleatum* ATCC 25586 in künstlichem Speichel/Galaktose (SG), in SG mit sterilfiltrierter Pronase (500 µg/ml) (SG/Pro), und in sterilfiltriertem SG ohne (SG-) bzw. mit (SG-/Pro) sterilfiltrierter Pronase. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Stündlich wurde eine Probe entnommen und deren optische Dichte bei 600 nm mit dem Photometer bestimmt.

Abbildung 58A)

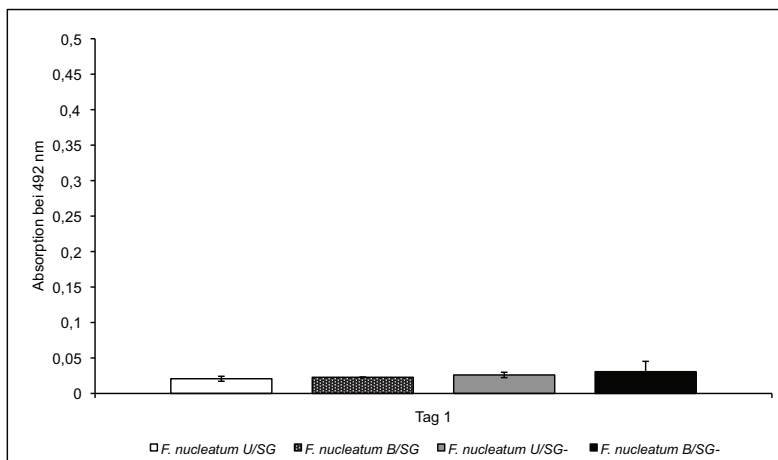


Abbildung 58B)

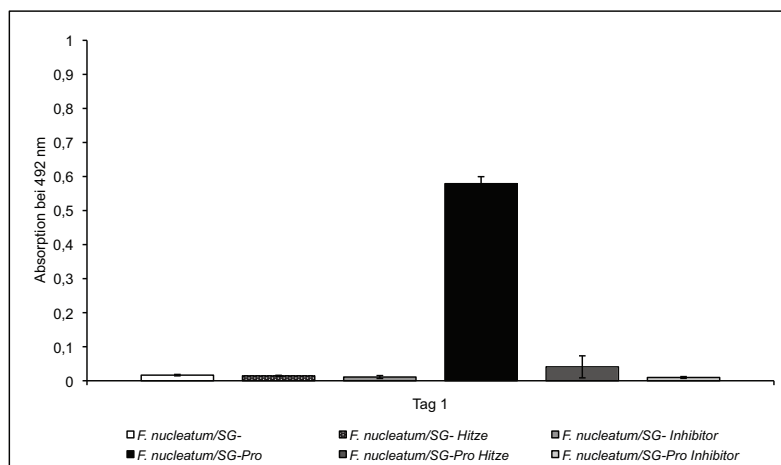


Abbildung 58C)

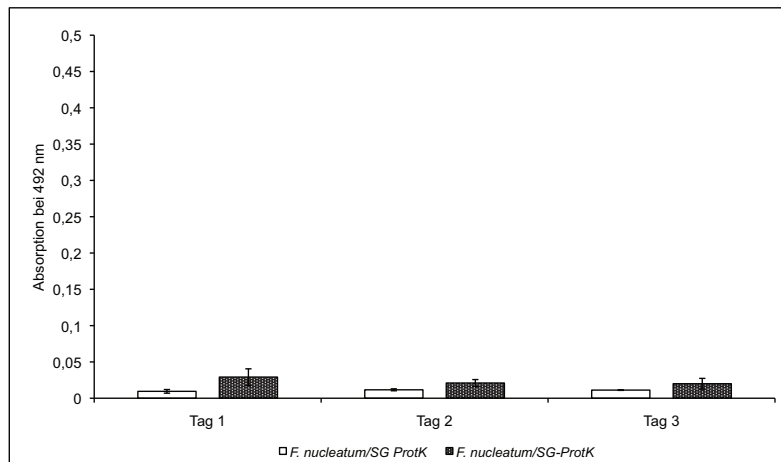


Abbildung 58: Biofilmbildung von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Behandlung der Zellen bzw. des Mediums mit Pronase. Die Quantifizierung der Biofilmbildung erfolgte mittels Safranin-Färbung. A) Behandlung der Zellen mit Pronase, anschließendes Waschen der Zellen und Inokulation in künstlichen Speichel/Galaktose ohne Mucin und ohne Pronase (SG-), Biofilmquantifizierung nach 24 Stunden anaerober Inkubation. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (U – unbehandelt, B – behandelt). B) Behandlung des Mediums SG- mit Pronase und anschließendes Inaktivierung der Pronase durch Hitze (10 min 85°C) bzw. durch einen Pronaseinhibitor (Complete Mini, Roche,). 24 Stunden nach Inokulation von *F. nucleatum* ATCC 25586 erfolgte die Biofilmquantifizierung. C) Biofilmquantifizierung von *F. nucleatum* ATCC 25586 in SG mit Proteinase K (ProtK) über einen Zeitraum von 3 Tagen.

Abbildung 59)

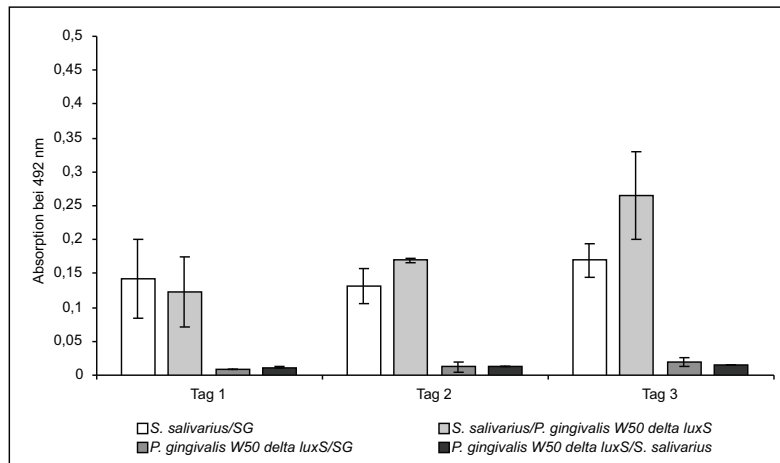


Abbildung 59: Ergebnisse der Transwell-Experimente mit *S. salivarius* und *P. gingivalis* $\Delta luxS$. Die Bestimmung der Biofilm-Masse erfolgte mittels Safranin-Färbung für *S. salivarius* unter dem Einfluss von *P. gingivalis* W50 $\Delta luxS$ bzw. für *P. gingivalis* $\Delta luxS$ unter dem Einfluss von *S. salivarius*.

Abbildung 60A)

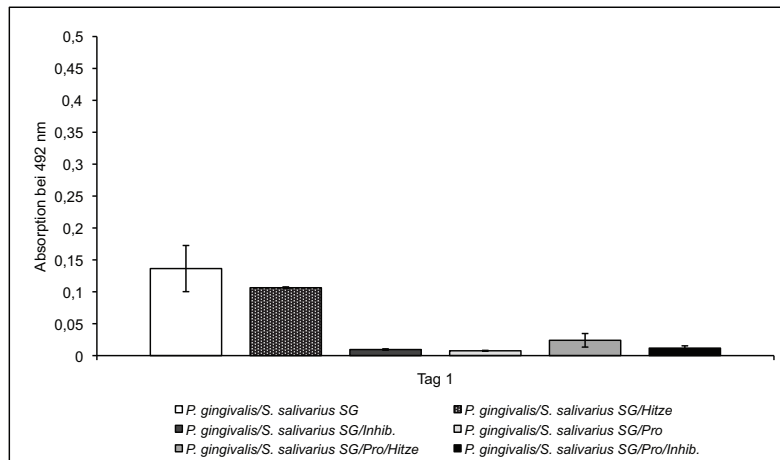


Abbildung 60B)

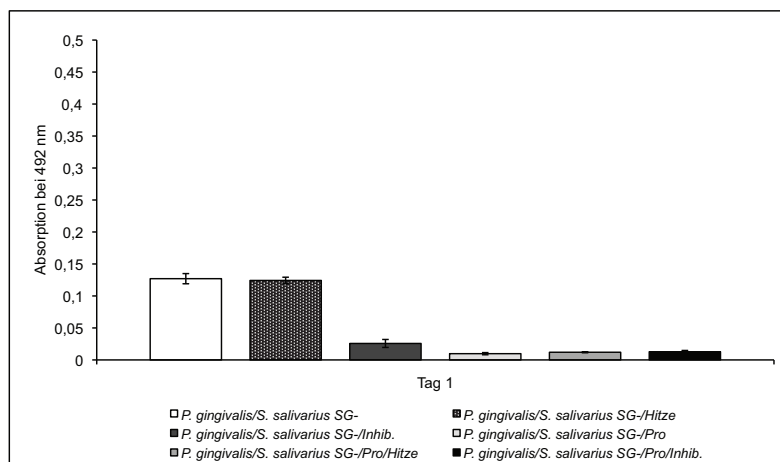


Abbildung 60: Ko-Kultivierung von *S. salivarius* mit *P. gingivalis* W50 unter verschiedenen Bedingungen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung. Die Untersuchung erfolgte nach Inkubation der Ko-Kultur in A) künstlichem Speichel/Galaktose (SG) bzw. B) künstlichem Speichel/Galaktose ohne Mucin (SG-) ohne bzw. in Anwesenheit von Pronase (SG, SG/Pro, SG-, SG-/Pro), einem Pronaseinhibitor (SG/Inhib., SG-/Inhib.), nach Hitzebehandlung (SG/Hitze, SG-/Hitze), und nach Inaktivierung der Pronase im Medium durch einen Pronaseinhibitor (SG/Pro/Inhib, SG-/Pro/Inhib.) bzw. Hitze (SG/Pro/Hitze, SG-/Pro/Hitze) (10 min 85°C).

Abbildung 61)

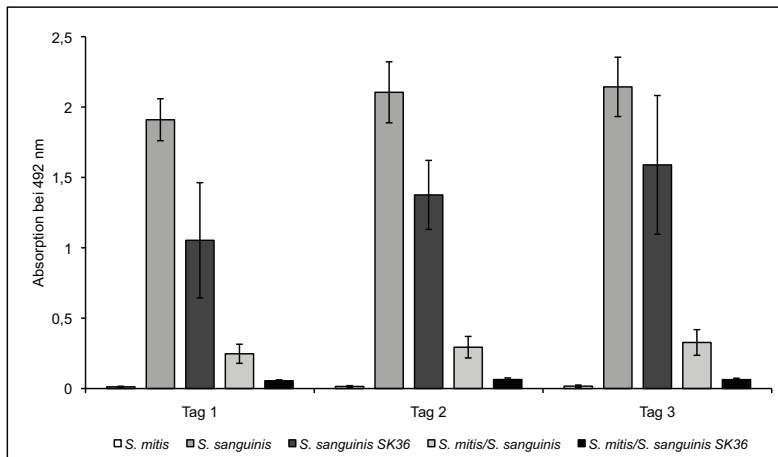


Abbildung 61: Ko-Kultivierung von *S. mitis* mit *S. sanguinis* DSM 20567 und *S. sanguinis* SK36. Ergebnisse der Biofilmquantifizierung mittels Safranin-Färbung für die Mono- und Di-Spezies Kulturen in CDM/Saccharose.

Abbildung 62)

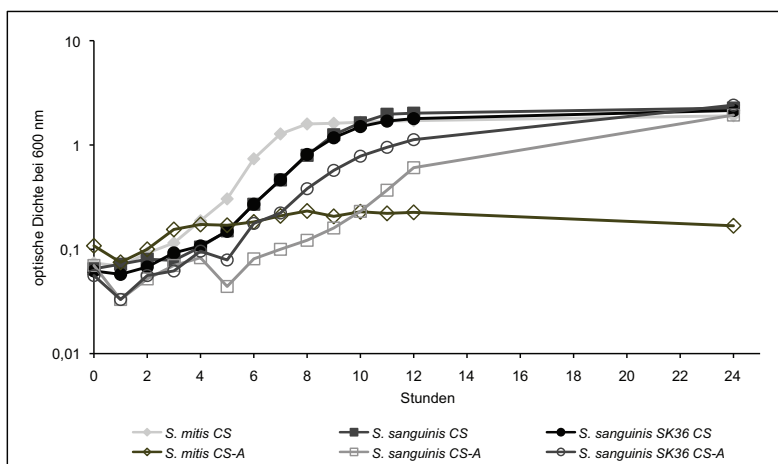


Abbildung 62: Wachstumskinetik von *S. mitis*, *S. sanguinis* DSM 20567 und *S. sanguinis* SK36 in CDM/Saccharose mit (CS) und ohne Arginin (CS-A). Die Wachstumsuntersuchungen erfolgten unter anaeroben Bedingungen. Bis Stunde 12 wurde stündlich eine Probe entnommen und deren optische Dichte bei 600 nm mit dem Photometer bestimmt. Nach 24 Stunden Inkubation wurde eine Endmessung durchgeführt.

7.3 Tabellen

Tabelle 24: Lebendkeimzahlen für *S. salivarius* und *P. gingivalis* W50 24 Stunden nach dem sukzessiven Inokulieren der Spezies zueinander. Das erste Bakterium der linken Spalte ist die zuerst inokulierte Spezies. Die Lebendkeimzahlen sind für das nicht in Klammern stehende Bakterium angegeben.

KBE/ml	Tag 1	Tag 2
<i>S. salivarius</i> /SG	1,35E+06	5,50E+03
<i>S. salivarius</i> /(<i>P. gingivalis</i>)	7,60E+05	1,25E+03
(<i>S. salivarius</i>)/ <i>P. gingivalis</i>	0,00E+00	0,00E+00
<i>P. gingivalis</i> /SG	3,30E+06	0,00E+00
<i>P. gingivalis</i> /(<i>S. salivarius</i>)	0,00E+00	0,00E+00
(<i>P. gingivalis</i>)/ <i>S. salivarius</i>	1,65E+05	5,05E+03

Tabelle 25: Ergebnisse der Transkriptomanalysen von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Kultivierung in SG-/Pro im Vergleich zu SG-. Die Tabelle enthält alle Gene, deren Transkriptmenge nach Inkubation in künstlichem Speichel ohne Mucin mit Pronase (SG-/Pronase) verglichen zu künstlichem Speichel ohne Mucin und ohne Pronase (SG-) vermindert bzw. erhöht war.

Herunterregulierte Gene				
Stoffwechselweg (nach KEGG bzw. COGs)	SEQ_ID	Geninfo	Fold change([SG-Pro] vs [SG-I])	Regulation ([SG-Pro] vs [SG-I])
1. Metabolismus				
1.1 Kohlenstoff-Metabolismus				
1.1.1 Butanoat Metabolismus	FN0200	Biotin carboxyl carrier protein of glutaconyl-COA decarboxylase	3,67	down
	FN1424	ACYL-COA dehydrogenase, short-chain specific*	8,26	down
1.1.2 Pyruvat Metabolismus	FN1162	Hydroxyacylglutathione hydrolase	3,63	down
1.1.3 Glycolyse/Gluconeogenese	FN1164	Glucokinase*	3,31	down
1.1.4 Galaktose Metabolismus	FN1164	Glucokinase*	3,31	down
1.1.5 Stärke und Saccharose Metabolismus	FN1164	Glucokinase*	3,31	down
1.1.6 Amino- und Nucleotidzucker-Metabolismus	FN1164	Glucokinase*	3,31	down
1.1.7 Fruktose and Mannose Metabolismus	FN1440	1-phosphofruktokinase	3,91	down
	FN1441	PTS system, fructose-specific II/ABC component*	9,41	down
1.2 Energie Metabolismus				
1.2.1 Stickstoff Metabolismus	FN0059	NifU protein	3,67	down
1.3 Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen				
1.3.1 Thiamin Metabolismus	FN0058	Cysteine desulphydrase	4,24	down
1.3.2 Vitamin B6 Metabolismus	FN1463	pyridoxine biosynthesis protein	3,16	down
1.4 Lipid Metabolismus				
1.4.1 Fettsäurebiosynthese	FN0151	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	3,36	down
1.4.2 Fettsäuremetabolismus	FN1424	ACYL-COA dehydrogenase, short-chain specific*	8,26	down
1.5 Nucleotid Metabolismus				

1.5.1 Pyrimidin Metabolismus	FN1163	Thioredoxin reductase	3,24	down
	FN1984	Thioredoxin reductase	7,95	down
1.6 Biosynthese sekundärer Metabolite				
1.6.1 Streptomycin Biosynthese	FN1164	Glucokinase*	3,31	down
1.7 Aminosäure-Metabolismus				
1.7.1 Valin, Leucin und Isoleucin Degradation	FN1424	ACYL-COA dehydrogenase, short-chain specific*	8,26	down
1.8 Energieproduktion und Konversion				
	FN0513	Flavodoxin	6,95	down
	FN0820	Mercuric reductase	3,13	down
	FN1375	Citrate-sodium symport	3,46	down
	FN1423	Flavoprotein	10,95	down
	FN2067	Thiol:disulfide interchange protein tipA	4,17	down
1.9. Kohlenstofftransport und Metabolismus				
	FN0554	D-serine permease	3,63	down
1.10 Coenzym Metabolismus				
	FN0725	Molybdopterin biosynthesis MoeB protein	3,33	down
2. Genetic Information Processing				
2.1 Translation				
2.1.1 Ribosomen				
	FN0329	LSU ribosomal protein L13P	4,38	down
	FN0330	SSU ribosomal protein S9P	4,18	down
	FN1364	LSU ribosomal protein L32P	3,79	down
	FN1620	SSU ribosomal protein S2P	3,16	down
	FN1625	LSU ribosomal protein L15P	4,35	down
	FN1626	LSU ribosomal protein L30P	3,73	down
	FN1627	SSU ribosomal protein S5P	3,15	down
	FN1628	LSU ribosomal protein L18P	3,78	down
	FN1630	SSU ribosomal protein S8P	3,23	down
	FN1632	LSU ribosomal protein L5P	3,27	down
	FN1637	LSU ribosomal protein L29P	3,07	down
	FN1657	SSU ribosomal protein S6P	3,21	down
	FN2037	LSU ribosomal protein L12P (L7/L12)	4,01	down
	FN2038	LSU ribosomal protein L10P	5,38	down
	FN2039	LSU ribosomal protein L1P	3,54	down

	FN2040	LSU ribosomal protein L11P	3,56	down
2.1.2 Andere Translationsproteine	FN0475	MIAB protein	6,44	down
2.1.3 Translationsfaktoren	FN0327	Bacterial Protein Translation Initiation Factor 3 (IF-3)	4,19	down
2.2 Faltung, Sortierung, Degradation				
2.2.1 RNA Degradation	FN0476	Transcription termination factor rho	3,88	down
2.2.2 Proteinfaltung und -prozessierung	FN0803	Cytochrome C-TYPE biogenesis protein ccdA	3,22	down
	FN1983	Alkyl hydroperoxide reductase C22 protein	8,19	down
2.3 Transkription				
2.3.1 RNA Polymerase	FN0479	RNA polymerase sigma-E factor	6,69	down
2.3.2 Andere transkriptionsbezogene Proteine	FN2041	Transcription antitermination protein nusG	3,73	down
2.4 DNA Replikation, Rekombination und Reparatur	FN0633	Replication protein	3,24	down
3. Environmental Information Processing				
3.1 Membran Transport				
3.1.1 Elektronen Transfer Carrier	FN0804	Cytochrome C-type biogenesis protein ccdA	4,29	down
3.1.2 Andere Transporter	FN1251	High-affinity iron permease	6,79	down
3.1.3 Phosphotransferase System (PTS)	FN1441	PTS system, fructose-specific IIBC component*	9,41	down
3.1.4 Bakteriellies Sekretionssystem	FN1624	Protein translocase subunit secY*	3,97	down
3.1.5 Protein Export	FN1624	Protein translocase subunit secY*	3,97	down
4. Cellular processes				
4.1 Zellteilung und Chromosomenaufteilung	FN0868	ATPases of the PP superfamily	3,32	down
4.2. Anorganischer Ionentransport und Metabolismus	FN1079	Neutrophil-activating protein A	6,60	down
	FN2045	Ferric uptake regulation protein	4,13	down

5. Intracellular trafficking and secretion					
	FN1499	Cell surface protein		5,38	down
6. Hypothetische Proteine, kaum charakterisierte Proteine, Proteine unbekannter Funktion					
	FN0480	unknown		8,97	down
	FN0481	unknown		6,94	down
	FN0893	Hypothetical protein		3,17	down
	FN0996	Hypothetical membrane-spanning protein		3,37	down
	FN1084	unknown		5,38	down
	FN1085	4-methyl-5-(B-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis enzyme		3,94	down
	FN1089	ATP-binding protein (contains P-loop)		3,15	down
	FN1092	Hypothetical protein		4,24	down
	FN1093	Hypothetical protein		4,41	down
	FN1118	unknown		3,10	down
	FN1138	Hypothetical cytosolic protein		3,74	down
	FN1227	Hypothetical protein		3,58	down
	FN1253	unknown		4,77	down
	FN1309	Hypothetical protein		4,68	down
	FN1852	unknown		5,30	down
	FN1884	unknown		3,87	down
	FN1957	Hypothetical protein		4,26	down
	FN2002	Permease		3,17	down
	FN2075	Hypothetical protein		3,30	down
Heraufregulierte Gene					
Stoffwechselweg (nach KEGG bzw. COGs)					
1. Metabolismus					
1.1 Kohlenstoff-Metabolismus					
	FN0629	PTS system, IID component*		3,83	up
	FN0630	PTS system, IIC component*		5,60	up
Fold change([SG-Pro] vs [SG-I])					
Regulation ([SG-Pro] vs [SG-I])					

1.1.2 Fruktose and Mannose Metabolismus	FN0629	PTS system, IID component*	3,83	up
	FN0630	PTS system, IIC component*	5,60	up
1.2 Energie Metabolismus				
1.2.1 Stickstoff Metabolismus	FN1943	Tryptophanase*	4,19	up
	FN1988	Tyrosine phenol-lyase*	4,66	up
1.2.2 Oxidative Phosphorylierung	FN0099	Inorganic pyrophosphatase	6,56	up
1.2.3 Pyruvat/Oxoglutarat Oxidoreductasen	FN1421	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	7,73	up
1.3 Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen				
1.3.1 Thiamin Metabolismus	FN1757	Thiamine biosynthesis protein thiC	3,74	up
	FN1758	Thiamin-phosphate pyrophosphorylase	3,77	up
1.3.2 Nicotinat und Nicotinamid Metabolismus	FN0436	regulator of kinase autophosphorylation inhibitor	3,99	up
1.4 Lipid Metabolismus				
1.4.1 Glycerophospholipid Metabolismus	FN1391	Acetyltransferase*	5,65	up
1.5 Nucleotid Metabolismus				
1.5.1 Pyrimidin Metabolismus	FN0421	Carbamoyl-phosphate synthase small chain*	3,50	up
	FN0436	regulator of kinase autophosphorylation inhibitor	3,99	up
1.5.2 Purin Metabolismus	FN0435	Purine nucleoside phosphorylase	5,82	up
	FN0436	regulator of kinase autophosphorylation inhibitor	3,99	up
1.6 Biosynthese sekundärer Metabolite				
1.6.1 Terpenoid backbone Biosynthese	FN1541	Heptaprenyl diphosphate synthase component II	3,27	up
1.7 Aminosäure-Metabolismus				
1.7.1 Alanin, Aspartat und Glutamat Metabolismus	FN0421	Carbamoyl-phosphate synthase small chain*	3,50	up
1.7.2 Tyrosin Metabolismus	FN1391	Acetyltransferase*	5,65	up
	FN1988	Tyrosine phenol-lyase*	4,66	up
1.7.3 Phenylalanin Metabolismus	FN1391	Acetyltransferase*	5,65	up

1.7.4 Cystein und Methionin Metabolismus	FN1419	Methionine gamma-lyase*	5,51	up
1.7.5 Tryptophan Metabolismus	FN1943	Tryptophanase*	4,19	up
1.8 Metabolismus anderer Aminosäuren				
1.8.1 Selenoaminosäure-Metabolismus	FN1419	Methionine gamma-lyase*	5,51	up
1.9 Energieproduktion und Konversion				
	FN1420	NA+/H+ antiporter NHAC	8,27	up
	FN1748	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	3,35	up
	FN1750	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	9,10	up
	FN1751	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	3,59	up
2. Genetic Information Processing				
2.1 Translation				
2.1.1 Ribosomen	FN1392	SSU ribosomal protein S16P	3,35	up
3. Environmental Information Processing				
3.1 Membran Transport				
3.1.3 Phosphotransferase System (PTS)	FN0629	PTS system, IID component*	3,83	up
	FN0630	PTS system, IIC component*	5,60	up
3.1.4 Andere ionen-gekoppelte Transporter	FN1944	Sodium-dependent tryptophan transporter	6,88	up
4. Hypothetische Proteine, kaum charakterisierte Proteine, Proteine unbekannter Funktion				
	FN0094	unknown	4,51	up
	FN0649	Exoenzymes regulatory protein aepA precursor	3,80	up
	FN1387	Metal dependent hydrolase	4,54	up
	FN1583	Hypothetical protein	3,26	up
	FN1989	Sodium-dependent tyrosine transporter	3,51	up

Tabelle 26: Ergebnisse der Transkriptomanalysen der Ko-Kultur *S. salivarius* K12/ *P. gingivalis* W83. Die Tabelle beinhaltet alle Gene von *P. gingivalis* W83, deren Transkriptmenge nach Ko-Kultur mit *S. salivarius* im Vergleich zur *P. gingivalis* W83 Mono-Spezies Kultur vermindert bzw. erhöht war.

Herunterregulierte Gene					
Stoffwechselweg (nach KEGG bzw. COGs)	SEQ_ID	Geninfo	Fold change ([Pg/Sal] vs Sal) vs [Pg]	Regulation ([Pg/Sal] vs [Pg])	
1. Metabolismus					
1.1 Kohlenstoff-Metabolismus					
1.1.1 Pyruvat Metabolismus	PG_1676	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)*	3,41	down	
1.1.2 Glycolyse/Gluconeogenese	PG_1676	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)*	3,41	down	
1.1.3 Citratzyklus	PG_1676	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)*	3,41	down	
	PG_1810	2-oxoglutarate oxidoreductase, beta subunit*	5,09	down	
1.2 Energie Metabolismus					
1.2.1 Oxidative Phosphorylierung]	PG_0899	cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II	4,25	down	
	PG_0900	cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I	6,36	down	
1.2.2 Pyruvat/Oxoglutarat Oxidoreductasen	PG_0675	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase, alpha subunit	4,08	down	
	PG_1810	2-oxoglutarate oxidoreductase, beta subunit*	5,09	down	
1.2.3 Energieproduktion und Conversion	PG_0690	4-hydroxybutyrate CoA-transferase	5,28	down	
1.3 Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen					
1.3.1 Porphyrin Metabolismus	PG_0703	cobalamin (5'-phosphate) synthase, putative	3,40	down	
1.4 Nucleotid Metabolismus					
1.4.1 Pyrimidin Metabolismus	PG_1260	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase, putative*	3,72	down	
	PG_1911	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit*	4,89	down	
1.4.2 Purin Metabolismus	PG_1260	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase, putative*	3,72	down	
	PG_1911	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit*	4,89	down	
1.5 Glycanbiosynthese und Metabolismus					
1.5.1 Peptidoglycansynthese	PG_1538	undecaprenol kinase, putative	3,34	down	

2. Genetic Information Processing			
2.1 Translation			
2.1.1 Ribosomen	PG_0376	ribosomal protein S9	4,71 down
	PG_0595	ribosomal protein S6	4,93 down
	PG_1914	ribosomal protein S13	5,30 down
	PG_1915	ribosomal protein L36	6,19 down
	PG_1931	ribosomal protein L16	5,55 down
2.1.2 Andere Translationsproteine	PG_1916	translation initiation factor IF-1	5,57 down
2.2 Faltung, Sortierung, Abbau			
2.2.2 Proteinfaltung und -prozessierung	PG_1259	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein	4,34 down
2.3 Transkription			
2.3.1 RNA Polymerase	PG_1911	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit*	4,89 down
3. Environmental Information Processing			
3.1 Membran Transport			
3.1.1 Bacterielles Sekretionssystem	PG_1115	signal recognition particle protein*	4,00 down
3.1.2 Protein Export	PG_1115	signal recognition particle protein*	4,00 down
3.1.3 Andere Ionen-gekoppelte Transporter	PG_2082	POT family protein	3,72 down
4. Cellular processes			
4.1 Anorganischer Ionentransport und Metabolismus	PG_0185	ragA protein	6,86 down
5. Hypothetische Proteine, kaum charakterisierte Proteine, Proteine unbekannter Funktion			
	PG_0186	lipoprotein RagB	5,34 down
	PG_0490	membrane protein, putative	3,32 down
	PG_2024	hemagglutinin protein HagE	5,09 down
	PG_2102	immunoreactive 61 kDa antigen PG91	6,41 down

Heraufregulierte Gene				
Stoffwechselweg (nach KEGG bzw. COGs)	SEQ_ID	Geninfo	Fold change([Pg/Sal] vs [Pg])	Regulation ([Pg/Sal] vs [Pg])
1. Metabolismus				
1.1 Kohlenstoff-Metabolismus				
1.1.1 Galaktose Metabolismus	PG_0665	beta-galactosidase*	3,43	up
1.2 Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen				
1.2.1 Thiamin Metabolismus	PG_2109	hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamin-phosphate pyrophosphorylase	6,25	up
1.2.2 Riboflavin Metabolismus	PG_0957	riboflavin biosynthesis protein RibF	4,58	up
1.3 Lipid Metabolismus				
1.3.1 Sphingolipidmetabolismus	PG_0665	beta-galactosidase*	3,43	up
1.4 Glycanbiosynthese und Metabolismus				
1.4.1 Glykandegradation	PG_0665	beta-galactosidase*	3,43	up
1.5 Coenzym Metabolismus				
	PG_1467	methyltransferase, UbiE/COQ5 family	5,68	up
1.6 Energieproduktion und Conversion				
	PG_1505	radical SAM domain protein	5,79	up
1.7 Kohlenhydrattransport und Metabolismus				
	PG_1515	ribulose biphosphate carboxylase-related protein	4,54	up
2. Genetic Information Processing				
2.1 Transkription				
2.1.1 RNA Polymerase				
	PG_0214	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	5,48	up
	PG_1660	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	4,83	up
2.1.2 Andere transkriptionsbezogene Proteine				
	PG_1203	transcriptional regulator, putative	4,47	up
2.2 DNA Replikation				
2.2.1 Rekombination und Reparatur				
	PG_0875	mobilizable transposon, tnpA protein	6,22	up

	PG_1735	MutT/nudix family protein	4,48 up
	PG_2013	CRISPR-associated protein Cas2	6,09 up
2.3 Replikation und Reparatur			
2.3.1 <i>Mismatch Reparatur</i>	PG_1433	hydrolase	4,13 up
2.4 DNA Replikationsproteine	PG_1495	DNA topoisomerase III	7,97 up
3. Cellular processes			
3.1 Zellwandbiogenese			
3.1.1 Äußere Membran	PG_0679	outer membrane efflux protein	7,16 up
	PG_0680	efflux transporter, MFP component, RND family	5,61 up
	PG_1503	LytB-related protein	5,73 up
	PG_1504	NAD dependent protein	5,88 up
	PG_2131	60 kDa protein	4,58 up
3.2 Zellteilung und Chromosomenteilung	PG_1486	conjugative transposon protein TraA	7,43 up
3.3 Signalling			
3.2.1 Transporter	PG_0685	ABC transporter, ATP-binding protein	4,37 up
3.4 anorganischer Ionentransport und Metabolismus	PG_1570	rhodanese-like domain protein	6,83 up
4. Hypothetische Proteine, kaum charakterisierte Proteine, Proteine unbekannter Funktion			
	PG_0181	immunoreactive 32 kDa antigen PG49	3,79 up
	PG_0459	ISPg5, transposase Orf1	4,88 up
	PG_0682	ABC transporter, permease protein, putative	5,76 up
	PG_0821	lipoprotein, putative	6,42 up
	PG_0869	mobilization protein	4,64 up
	PG_0872	mobilizable transposon, xis protein	7,25 up
	PG_0873	mobilizable transposon, tnpC protein	3,56 up
	PG_0874	mobilizable transposon, int protein	7,22 up
	PG_1436	ATPase, putative	6,18 up
	PG_1441	lysozyme-related protein	7,44 up
	PG_1475	conjugative transposon protein TraN	5,55 up

Tabelle 27: Lebendkeimzahlen von *S. mitis*, *S. sanguinis* DSMZ 20567 und *S. sanguinis* SK36 bei einem um 2 (A) bzw. 4 Stunden (B) versetzten Animpfen der Spezies zueinander. Das erste Bakterium der linken Spalte ist die zuerst inokulierte Spezies. Die Lebendkeimzahlen sind für das nicht in Klammern stehende Bakterium angegeben.

A)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 2
<i>S. mitis</i> /CS	2,00E+04	0,00E+00	0,00E+00
<i>S. mitis</i> /(<i>S. sanguinis</i> DSM 20567)	9,50E+05	0,00E+00	0,00E+00
(<i>S. mitis</i>)/ <i>S. sanguinis</i> DSM 20567	6,35E+07	1,00E+02	0,00E+00
<i>S. mitis</i> /(<i>S. sanguinis</i> SK36)	4,00E+04	4,00E+02	0,00E+00
(<i>S. mitis</i>)/ <i>S. sanguinis</i> SK36	4,16E+07	1,84E+06	3,90E+05
<i>S. sanguinis</i> DSM 20567/CS	4,31E+07	9,40E+05	3,00E+03
<i>S. sanguinis</i> DSM 20567/(<i>S. mitis</i>)	6,00E+07	4,00E+02	0,00E+00
(<i>S. sanguinis</i> DSM 20567)/ <i>S. mitis</i>	2,30E+06	1,00E+03	0,00E+00
<i>S. sanguinis</i> SK36/CS	4,28E+08	2,00E+07	8,80E+05
<i>S. sanguinis</i> SK36/(<i>S. mitis</i>)	8,20E+06	4,04E+05	7,65E+04
(<i>S. sanguinis</i> SK36)/ <i>S. mitis</i>	1,20E+06	1,00E+03	2,00E+02

B)

KBE/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 2
<i>S. mitis</i> /CS	1,00E+04	4,00E+03	0,00E+00
<i>S. mitis</i> /(<i>S. sanguinis</i> DSM 20567)	2,15E+06	1,50E+05	0,00E+00
(<i>S. mitis</i>)/ <i>S. sanguinis</i> DSM 20567	8,40E+07	9,50E+03	1,25E+03
<i>S. mitis</i> /(<i>S. sanguinis</i> SK36)	2,70E+06	1,30E+04	1,00E+02
(<i>S. mitis</i>)/ <i>S. sanguinis</i> SK36	7,85E+07	1,60E+06	2,38E+04
<i>S. sanguinis</i> DSM 20567/CS	1,93E+08	2,60E+05	2,00E+03
<i>S. sanguinis</i> DSM 20567/(<i>S. mitis</i>)	5,00E+07	3,60E+04	0,00E+00
(<i>S. sanguinis</i> DSM 20567)/ <i>S. mitis</i>	1,95E+06	3,05E+04	0,00E+00
<i>S. sanguinis</i> SK36/CS	9,05E+07	7,60E+06	2,06E+06
<i>S. sanguinis</i> SK36/(<i>S. mitis</i>)	4,73E+06	1,10E+05	3,20E+04
(<i>S. sanguinis</i> SK36)/ <i>S. mitis</i>	1,10E+05	0,00E+00	0,00E+00

Tabelle 28: Transkriptomanalysen der Ko-Kultur *S. sanguinis* SK36 / *S. mitis*. Die Tabelle beinhaltet alle Gene von *S. sanguinis* SK36, deren Transkriptmenge nach Ko-Kultur mit *S. mitis* im Vergleich zur *S. sanguinis* Sk36 Mono-Spezies Kultur vermindert bzw. erhöht war.

Herunterregulierte Gene				
Stoffwechselweg (nach KEGG bzw. COGs)	SEQ_ID	Geninfo	Fold change([Mi/SK] vs [SK])	Regulation ([Mi/SK] vs [SK])
1. Metabolismus				
1.1 Kohlenstoff-Metabolismus				
1.1.1 Butanoat Metabolismus	SSA_0068	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase, putative*	4,33	down
1.1.2 Pyruvat Metabolismus	SSA_0068	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase, putative*	4,33	down
1.1.3 Glycolyse/Gluconeogenese	SSA_0068	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase, putative*	4,33	down
	SSA_1992	Fructose-bisphosphate aldolase, putative*	5,05	down
1.1.4 Galaktose Metabolismus	SSA_1698	Galactose-6-phosphate isomerase, LacB subunit, putative	4,82	down
1.1.5 Amino- und Nucleotidzucker-Metabolismus	SSA_0055	PTS system, IIC component, putative*	6,58	down
	SSA_0056	Phosphotransferase system sugar-specific EIID component, putative*	3,82	down
1.1.6 Fruktose and Mannose Metabolismus	SSA_0055	PTS system, IIC component, putative*	6,58	down
	SSA_0056	Phosphotransferase system sugar-specific EIID component, putative*	3,82	down
	SSA_1992	Fructose-bisphosphate aldolase, putative*	5,05	down
1.1.7 Citratzyklus	SSA_0702	Aconitase A, putative*	9,29	down
	SSA_0704	Isocitrate dehydrogenase [NADP] _i , putative*	7,53	down
1.1.8 Glyoxylat und Dicarboxylat-Metabolismus	SSA_0702	Aconitase A, putative*	9,29	down
1.1.9 Propanoat Metabolismus	SSA_0703	Citrate synthase, putative	9,07	down
1.1.10 Pentosephosphatweg	SSA_1992	Fructose-bisphosphate aldolase, putative*	5,05	down
1.2 Energie Metabolismus				
1.2.1 Oxidative Phosphorylierung	SSA_0085	V-type sodium ATPase, subunit I, putative	6,77	down

1.3 Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen					
1.3.1 Nicotinat und Nicotinamid Metabolismus	SSA_1234	5'-nucleotidase, putative*		4,81	down
	SSA_1316	Nicotinamide mononucleotide transporter, putative		3,85	down
	SSA_2194	Nicotinamide mononucleotide transporter, putative		10,27	down
	SSA_2195	ATPase/kinase, putative		5,50	down
1.4 Lipid Metabolismus					
1.4.1 Fettsäuremetabolismus	SSA_0068	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase, putative*		4,33	down
1.5 Nucleotid Metabolismus					
1.5.1 Pyrimidin Metabolismus	SSA_1234	5'-nucleotidase, putative*		4,81	down
	SSA_2230	Ribonucleotide reductase, class III, anaerobic, putative*		3,91	down
	SSA_2193	ADP-ribose pyrophosphatase, putative*		7,87	down
1.5.2 Purin Metabolismus					
	SSA_1234	5'-nucleotidase, putative*		4,81	down
	SSA_2230	Ribonucleotide reductase, class III, anaerobic, putative*		3,91	down
	SSA_2193	ADP-ribose pyrophosphatase, putative*		7,87	down
1.6 Aminosäure-Metabolismus					
1.6.1 Tyrosin Metabolismus	SSA_0068	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase, putative*		4,33	down
1.6.2 Arginin und Prolin Metabolismus	SSA_0759	Acetylglutamate kinase, putative		4,01	down
1.7 Metabolismus anderer Aminosäuren					
1.7.1 Glutathion Metabolismus	SSA_0704	Isocitrate dehydrogenase [NADP], putative*		7,53	down
	SSA_2186	Glutathione biosynthesis bifunctional protein gshAB (Gamma-GCS-GS) (GCS-GS), putative		4,69	down
1.8 Aminosäuretransporter und -Metabolismus					
	SSA_0356	Dipeptidase, putative		3,18	down
	SSA_1049	ABC transporter membrane-spanning permease-spermidine/putrescine transport, putative*		3,35	down
	SSA_1066	ABC-type oligopeptide transport system, putative		4,71	down
1.9 Kohlenhydrattransport und Metabolismus					
	SSA_1482	Pullulanase, putative		6,37	down
	SSA_1699	Conserved hypothetical protein		3,47	down
1.10 Enzymfamilien					
1.10.1 Peptidasen	SSA_2004	Zinc metalloprotease zmpB precursor, putative		5,29	down

2. Genetic Information Processing			
2.1 Translation			
2.1.1 Translationsfaktoren	SSA_1896	Translation initiation factor IF-2, putative	3,77 down
2.2 Faltung, Sortierung, Abbau			
2.2.1 RNA Abbau	SSA_0706	RNA helicase, putative	7,54 down
	SSA_2007	Chaperone protein dnaK/HSP70, putative*	5,28 down
2.2.3. Chaperone und Faltungshelfer	SSA_0225	10 kDa chaperonin - GroES	6,65 down
	SSA_0226	60 kDa chaperonin - GroEL	5,49 down
	SSA_0669	ATP dependent protease, putative	6,97 down
	SSA_2005	Chaperone protein dnaJ, putative	6,18 down
	SSA_2007	Chaperone protein dnaK/HSP70, putative*	5,28 down
	SSA_2096	ATP-dependent protease, ATP-binding subunit, putative	7,05 down
	SSA_2190	33 kDa chaperonin, putative	5,35 down
2.3 Transkription			
2.3.1 Transkriptionsfaktoren	SSA_0016	ComX1, transcriptional regulator of competence-specific genes, putative*	3,34 down
	SSA_2009	Heat shock transcription repressor HrcA, putative	3,70 down
	SSA_2261	Transcriptional repressor (arginine synthesis), putative	3,41 down
2.3.2 Andere transkriptionsbezogene Proteine	SSA_0349	Transcriptional regulator, TetR/AcrR family, putative	7,90 down
	SSA_2387	Arsenical resistance operon transcription repressor, putative	3,99 down
2.4 Replikation und Reparatur			
2.4.1 DNA Replikationsproteine	SSA_1220	DNA gyrase A subunit, putative*	9,87 down
2.4.2 DNA Reparatur und Rekombinationsproteine	SSA_1220	DNA gyrase A subunit, putative*	9,87 down
	SSA_2240	Holliday junction resolvase, putative	3,89 down
3. Environmental Information Processing			
3.1 Membran Transport			
3.1.1 Sekretionssystem	SSA_0016	ComX1, transcriptional regulator of competence-specific genes, putative*	3,34 down
3.1.2 Transporter	SSA_0055	PTS system, IIC component, putative*	6,58 down

	SSA_0056	Phosphotransferase system sugar-specific EIID component, putative*	3,82	down
	SSA_1049	ABC transporter membrane-spanning permease-spermidine/putrescine transport, putative*	3,35	down
	SSA_1298	Maltose/maltodextrin ABC transporter, sugar-binding protein MalX, putative*	6,45	down
	SSA_1567	Polar amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein, putative*	5,37	down
	SSA_2249	ABC-type antimicrobial peptide transporter, ATPase component, putative	13,85	down
	SSA_2250	ABC-type antimicrobial peptide transporter, permease component, putative	12,92	down
3.1.3 Phosphotransferase System (PTS)	SSA_0055	PTS system, IIC component, putative*	6,58	down
	SSA_0056	Phosphotransferase system sugar-specific EIID component, putative*	3,82	down
3.1.4 ABC-Transporter	SSA_1049	ABC transporter membrane-spanning permease-spermidine/putrescine transport, putative*	3,35	down
	SSA_1298	Maltose/maltodextrin ABC transporter, sugar-binding protein MalX, putative*	6,45	down
	SSA_1567	Polar amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein, putative*	5,37	down
3.2 Signaltransduktion				
3.2.1 Zwei-Komponenten System	SSA_0016	ComX1, transcriptional regulator of competence-specific genes, putative*	3,34	down
3.3 Signalmoleküle und Interaktion				
3.3.1 Zelluläre Antigene	SSA_1234	5'-nucleotidase, putative*	4,81	down
4. Cellular processes				
4.1 Zellwandbiogenese				
4.1.1 Äußere Membran	SSA_0805	Collagen-binding surface protein, putative	3,15	down

4.2 Zellmotilität					
4.2.1 Bakterielle Chemotaxis	SSA_1298	Maltose/maltodextrin ABC transporter, sugar-binding protein MalX, putative*		6,45	down
4.3 Anorganischer Ionentransport und Metabolismus					
	SSA_2026	Cadmium resistance transporter, putative		3,26	down
	SSA_2288	Cadmium resistance transporter, putative		4,48	down
5. Hypothetische Proteine, kaum charakterisierte Proteine, Proteine unbekannter Funktion					
	SSA_0021	Hypothetical protein		8,70	down
	SSA_0162	Hypothetical protein		4,49	down
	SSA_0164	Conserved hypothetical protein		8,36	down
	SSA_0165	Conserved hypothetical protein		4,89	down
	SSA_0166	Hypothetical protein		6,65	down
	SSA_0208	Conserved uncharacterized protein		4,26	down
	SSA_0230	Conserved hypothetical protein		3,71	down
	SSA_0303	surface protein C		5,62	down
	SSA_0345	Hypothetical protein		4,44	down
	SSA_0346	Conserved hypothetical protein		4,63	down
	SSA_0348	CAAX amino terminal protease family, putative		5,71	down
	SSA_0646	Conserved hypothetical protein		3,47	down
	SSA_0647	Conserved hypothetical protein		6,83	down
	SSA_0718	Conserved uncharacterized protein		4,20	down
	SSA_1803	GTP-binding protein, putative		3,39	down
	SSA_1807	Conserved hypothetical protein		3,52	down
	SSA_1997	Membrane spanning protein, putative		3,62	down
	SSA_2006	4-methyl-5(B-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis enzyme, putative		7,63	down
	SSA_2018	Conserved hypothetical protein		3,32	down
	SSA_2036	Conserved hypothetical cytosolic protein		3,78	down
	SSA_2148	Alkaline shock stress response protein, putative		3,29	down
	SSA_2181	Conserved uncharacterized protein		3,37	down
	SSA_2182	Uncharacterized protein		3,66	down
	SSA_2189	Conserved hypothetical protein		3,65	down
	SSA_2192	Conserved uncharacterized protein		3,73	down
	SSA_2207	Hypothetical protein		3,95	down

	SSA_2227	Acetyl transferase, putative		8,10	down
	SSA_2228	Acetyltransferase (GNAT) family, putative		8,35	down
	SSA_2229	Conserved hypothetical protein		5,97	down
	SSA_2248	Conserved hypothetical protein		3,67	down
	SSA_2337	Conserved hypothetical protein		4,79	down
	SSA_2338	Conserved uncharacterized protein		5,35	down
	SSA_2348	Metal dependent hydrolase, putative		6,55	down
<u>Heraufregulierte Gene</u>					
Stoffwechselweg (nach KEGG bzw. COGs)	SEQ_ID	Geninfo	Fold change([Mi/SK] vs [SK])	Regulation ([Mi/SK] vs [SK])	
1. Metabolismus					
1.1 Kohlenstoff-Metabolismus					
1.1.1 Pyruvat Metabolismus	SSA_0391	Pyruvate oxidase, putative		3,98	up
1.1.2 Glycolyse/Gluconeogenese	SSA_2108	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative		3,93	up
2. Genetic Information Processing					
2.1 Translation					
2.1.1 Ribosom	SSA_0440	30S ribosomal protein S18, putative		6,17	up
	SSA_0820	Ribosomal protein S21, putative		4,96	up
	SSA_1272	50S ribosomal protein L31 type B, putative		5,66	up
	SSA_2350	30S ribosomal protein S4, putative		6,02	up
	SSA_2391	30S ribosomal protein S14, putative		6,73	up
2.1.2 Translationsfaktoren	SSA_1520	Elongation factor Tu, putative		5,93	up
	SSA_2202	Elongation factor Ts, putative		3,51	up
3. Environmental Information Processing					
3.1 Membran Transport					
3.1.1 Transporter	SSA_1988	ABC-type transport system (uncharacterized), permease component, putative		4,04	up

7.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Rostock durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn **Prof. Dr. Dr. Andreas Podbielski** für die Überlassung des Themas, die Betreuung und das große Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie die Möglichkeit zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten.

Ein großer Dank gebührt Herrn **Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer** für die ständige Diskussionsbereitschaft, sowie für logistische und organisatorische Hilfestellungen jeglicher Art.

Weiterhin möchte ich mich auch sehr bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der **Abteilung für Medizinische Mikrobiologie der Universität Rostock** bedanken. Insbesondere bei **Tomas Fiedler** und **Nadja Patenge** für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die zahlreichen, konstruktiven Diskussionen. Ebenso möchte ich mich bei meinem Mitstreiter **Sylvio Redanz** ganz herzlich für die vielen Ratschläge bei allen Fragen und wissenschaftlichen Problemen sowie der ständigen Diskussionsbereitschaft bedanken. Großer Dank geht auch an **Jana Normann** und **Yvonne Humboldt**, sowie an **Cordula Lembke**, **Sonja Öhmke**, **Regina Arlt** und **Nikolai Siemens** für die Hilfestellungen jedlicher Art, die vielen guten wissenschaftlichen Gespräche, die konstruktive Kritik und nicht zuletzt für die gute Stimmung im Laboralltag.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der EMZ der Universität Rostock, insbesondere **Wolfgang Labs**, **Gerhard Fulda** und **Ute Schulz** für die Hilfestellungen bei den Präparationen der raster- und elektronenmikroskopischen Proben und der Mikroskopie an sich bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Dr. Rhena Schumann** von der Abt. Angewandte Ökologie, für die Hilfen bei der Fluoreszenzmikroskopie,

Meiner besten Freundin **Manuela Stein** möchte ich für Ihr Verständnis, dass mal wieder „keine Zeit für Nichts“ ist, bedanken. Ebenso Danke ich **Juliane Völkel** ganz herzlich für Ihr großes Interesse am Fortschreiten der Arbeit, für die konstruktive Kritik zu meinen neuesten Ideen und ihre aufbauenden Worte wenn die Mikroorganismenwelt mal wieder nicht so wollte wie ich.

Ein ganz großer Dank geht auch an meine Familie:

Meinem Freund und Kollegen **Thomas Köller** danke ich ganz besonders für seine ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art, für die Proteomanalysen, für das Korrekturlesen dieser Arbeit und insbesondere für das große Verständnis diverser Nachtschichten im Rahmen dieser Arbeit. Meinen Eltern **Karin** und **Gerhard Standar** sowie meiner Schwester **Kathrin Standar** und meinem Schwager **Steffen Sauermann Standar** danke ich ganz herzlich für ihr reges Interesse an meiner Arbeit, für ihre moralische Unterstützung und das geduldige Zuhören, wenn mal wieder „etwas nicht so klappte“.

Danke.

7.5 Publikationsliste

7.5.1 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

- **Standar, K**, Kreikemeyer B, Redanz S, Münter WL, Laue M, Podbielski A. 2010. Setup of an In Vitro Test System for Basic Studies on Biofilm Behavior of Mixed-Species Cultures with Dental and Periodontal Pathogens. PLoS ONE, in press.
- Fiedler T, Kreikemeyer B, Sugareva V, Redanz S, Arlt R, **Standar K**, Podbielski A. 2010. Impact of the Streptococcus pyogenes Mga regulator on human matrix protein binding and interaction with eukaryotic cells. Int J Med Microbiol 300(4):248-258.
- **Standar K**, Mehner D, Osadnik H, Berthelmann F, Hause G, Lunsdorf H, Bruser T. 2008. PspA can form large scaffolds in Escherichia coli. FEBS Lett 582(25-26):3585-3589.
- Kreikemeyer B, Nakata M, Koller T, Hildisch H, Kourakos V, **Standar K**, Kawabata S, Glocker MO, Podbielski A. 2007. The Streptococcus pyogenes serotype M49 Nra-Ralp3 transcriptional regulatory network and its control of virulence factor expression from the novel eno ralp3 epf sagA pathogenicity region. Infect Immun 75(12):5698-5710.
- Riani C, **Standar K**, Srimuang S, Lembke C, Kreikemeyer B, Podbielski A. 2007. Transcriptome analyses extend understanding of Streptococcus pyogenes regulatory mechanisms and behavior toward immunomodulatory substances. Int J Med Microbiol 297(7-8):513-523.
- Behrendt J, **Standar K**, Lindenstrauss U, Bruser T. 2004. Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. FEMS Microbiol Lett 234(2):303-308.

7.5.2 Tagungsbeiträge (Vorträge/Poster)

- 06/08 **Standar, K.**, Podbielski, A., Kreikemeyer, B., 2008. *In vitro* modeling of periodontal biofilms. Summer School Münster. (Vortrag)
- 11/08 **Standar, K.**, Redanz, S., Kreikemeyer, B., Podbielski, A., 2008. Entwicklung von *in vitro* Testsystemen mit parodontalen Mikroorganismen. Clustertreffen im Rahmen des PathoGenoMikPlus Projektes am Universitätsklinikum Rostock. (Vortrag)

-
- 03/06 **Standar, K.**, Kreikemeyer, B., Podbielski, A., 2006. Establishing an *in vitro* test system to study the molecular pathogenesis and potential therapeutic manipulations of multispecies biofilms associated with periodontitis and endodontitis. *Biofilms* Leipzig. (Poster)
- 09/07 **Standar, K.**, Münter, W., Redanz, R., Kreikemeyer, B., Podbielski, A., 2007. Establishment and optimization of mixed biofilm test systems with periodontal pathogens. Jahrestagung DGHM Göttingen. (Poster)
- 10/08 **Standar, K.**, Münter, W., Redanz, S., Kreikemeyer, B., Podbielski, A., 2008. *In vitro* modelling of periodontal biofilms. *Biofilms* München. (Poster)
- 09/09 Redanz, S., **Standar, K.**, Kreikemeyer, B., Podbielski, A., 2009. Development of tools to investigate oral multi-species biofilms. Jahrestagung DGHM Göttingen. (Poster)

7.6 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Kerstin Standar

Rostock, den 27.09.2010