

Aus der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
(Direktor: Professor Dr. med. dent. Christof Dörfer)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Verwendung oraler Biofilme als Induktoren zur
Expression antimikrobieller und
immunmodulatorischer Moleküle durch
Epithelzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Kiel

vorgelegt von
ROBERT PIETSCHMANN
aus Kiel
2015

1.Berichterstatter: Professor Dr. med. dent. Christof Dörfer

2.Berichterstatter: Professor Dr. med. Alexa Karina Klettner

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 4. 2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18. 4. 2016

gez.:

(Professor Dr. med. dent. Hans-Jürgen Wenz)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	8
1.1 Biofilme in der Mundhöhle	8
1.1.1 Allgemeine Charakteristika	8
1.1.2 Entstehung und Reifung von Biofilmen	8
1.2 Reaktionen des Immunsystems in der Mundhöhle	13
1.2.1 Komponenten und Funktionen des Immunsystems	13
1.2.2 Immunreaktionen des oralen Epithelgewebes	17
1.3 Interaktion von Biofilmen und Epithelzellen im Modell	18
1.3.1 Biofilmmodelle	19
1.3.2 HaCaT-Zellen als Modell für orale Epithelzellen	22
1.3.3 Vorhergehende Studien	23
2 Fragestellung	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
3.2 Mikrobiologische Methoden	29
3.2.1 Herstellung der Einzelspezies-Biofilme	29
3.2.2 Intraorale Anzüchtung natürlicher Biofilme	31
3.2.3 Mikrobiologische Analyse	31
3.3 Zellbiologische Methoden	32
3.3.1 Kultivierung der HaCaT-Zellen	32
3.3.2 Subkultivierung der Zellen	33
3.3.3 Einfrieren und Auftauen von adhärent wachsenden Zellen	33
3.3.4 Stimulation der HaCaT-Zellen durch den Biofilm	34
3.4 Molekularbiologische Methoden	35
3.4.1 Extraktion der Gesamt-RNA	35
3.4.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA	36
3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
3.4.4 Gelelektrophorese	39
3.4.5 Auswertung der Gelelektrophorese	40
3.5 Statistische Auswertung	43
4 Ergebnisse	44
4.1 Analyse der mikrobiologischen Zusammensetzung von Speichel und Biofilmen	44
4.1.1 Zusammensetzung des Speichels	44
4.1.2 Zusammensetzung der natürlich gezüchteten Biofilme	46
4.2 Expression von antimikrobiellen Peptiden nach Stimulation mit Biofilmen	48
4.2.1 hBD-2	48
4.2.2 RNase-7	50
4.2.3 Psoriasin (PSO)	52
4.3 Expression von immunmodulatorischen Molekülen nach Biofilmstimulation	54
4.3.1 IL-8	54
4.3.2 5-Lipoxidase	56

5	Diskussion	59
5.1	Übertragung der Mikroorganismen vom Speichel auf den Biofilm.....	59
5.2	Expression immunmodulatorischer Proteine nach Biofilmstimulation	61
5.2.1	Ergebnisse im Kontext früherer Studien	61
5.2.2	Ergebnisse im Kontext der Koevolution von Mensch und Mikroorganismus	63
5.3	Verwendung oraler Biofilme als Induktoren zur Expression antimikrobieller und immunmodulatorischer Moleküle durch Epithelzellen	65
6	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis.....	68
8	Danksagung.....	82
9	Lebenslauf	84

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AMP	Antimikrobielles Peptid
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
β -ME	Beta-Mercaptoethanol
Bp	Basenpaare
C	Celsius
Ca	Calcium
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDFE	<i>Constant depth film fermenter</i>
cDNA	<i>Complimentary desoxyribonucleinacid</i>
CFU	<i>Colony forming units</i>
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> = fetales Rinderserum
FCS	<i>Fetal calf serum</i> = fetales Kälberserum
G	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HaCaT	<i>Human, adult, low calcium, high temperature</i>
hBD- 1,2,3	humanes β -Defensin 1,2,3
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
kb / kbp	Kilobasen bzw. Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton (Molekularmasse)
KfO	Kieferorthopädie
5-LO	5-Lipoxidase (synonym: 5-Lipoxygenase)
LPS	Lipopolysaccarid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LTC ₄	Leukotrien C ₄
M	molar (mol/l)
mM	Millimol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>messenger ribonucleinacid</i>
MTA	medizinische technische Assistentin
Neutrophile	neutrophile Granulozyten
Oligo-dT-Primer	<i>Oligonucleotide deoxynucleotidyl transferase primer</i>

PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PSO	Psoriasis
RNA	<i>Ribonukleinacid</i>
RNase-7	Ribonuklease-7
RT	Reverse Transkription
SFM	<i>Serum free medium</i>
Std.	Stunden
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Temp.	Temperatur
TI	Transilluminator
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
U	Unit (Enzymaktivität)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

Die Abkürzungen der Puffer RW1, RPE und RLT aus dem Extraktionskit „*RNeasy total RNA kit*“ der Firma Qiagen, Hilden, stammen vom Hersteller. Die Bedeutungen der Abkürzungen für die Puffer werden durch den Hersteller nicht bekanntgegeben.

Bakterienverzeichnis

<i>A. naeslundii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
<i>A. viscosus</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Capnocytophaga</i>	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Haemophilus spec.</i>	<i>Haemophilus species</i>
<i>Leuconostoc</i>	
<i>Neisseria spec.</i>	<i>Neisseria species</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Rothia spec.</i>	<i>Rothia species</i>
<i>S. anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>S. cristatus</i>	<i>Streptococcus cristatus</i>
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. milleri</i>	<i>Streptococcus milleri</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. pluranimalium</i>	<i>Streptococcus pluranimalium</i>
<i>S. salivatorius</i>	<i>Streptococcus salivatorius</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

1 Einleitung

1.1 *Biofilme in der Mundhöhle*

1.1.1 Allgemeine Charakteristika

Die menschliche Mundhöhle ist ein komplexes Ökosystem, das eine Vielzahl an Mikroorganismen beherbergt. In ihr finden sich mehr als 19000 verschiedene Spezies [1]. Neben parodontal pathologischen Keimen wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nehmen die säuretoleranten Bakterien, wie zum Beispiel *Streptococcus mitis* und *Streptococcus mutans*, eine Schlüsselrolle ein [2]. Vor allem letzterer gilt als hauptsächlicher Verursacher von Karies. Außer dem planktonartigen Teil der Bakterien sind die unterschiedlichen Mikroorganismen in zäh-verfilzten und strukturierten Biofilmen organisiert. In diesem als Plaque bezeichneten System finden sich neben Bakterien und ihren Stoffwechselprodukten auch Viren, Pilze, Archaeobakterien, Speichelbestandteile und Nahrungsreste. Sie stehen zusammen in enger Assoziation zu Karies und Parodontal-erkrankungen. Die physiologischen Eigenschaften der Organismen im Verbund unterscheiden sich stark von denen der planktonisch vorliegenden [3]. In Form des Biofilms sind die Mikroorganismen resistent gegenüber zahlreichen Einflüssen wie antimikrobiellen Agentien, pH-Schwankungen und Nahrungs- oder Sauerstoffmangel [4]. Die dentale Plaque begleitet den Zahn lebenslanglich. Während das orale Epithel einer reinigenden Abschilferung unterliegt, ist mit dem Durchbruch der Zähne eine ungestörte Kolonisation auf ihnen, insbesondere auf Dentin und Schmelz, möglich. Die Besiedelung der Zahnfissuren führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Kariesbildung [5].

1.1.2 Entstehung und Reifung von Biofilmen

Bei der Entstehung und Reifung eines Biofilms werden mehrere einzelne Phasen voneinander unterschieden. In der ersten Phase wird ein sogenanntes Pellicel („*acquired pellicle*“) ausgebildet. Das Pellicel bildet für die hinzukommenden Bakterien eine Art Ankerstruktur auf dem Zahn. In der nächsten Phase kommt es auf der Grundlage dieser Ankerstruktur zu einer Bakterienverdichtung. Um bei Erreichen einer bestimmten Besiedelungsdichte die Ausbildung eines Biofilms zu forcieren, kommunizieren die sich ansiedelnden Bakterien untereinander. Diese Kommunikationsform wird als *Quorum Sensing* bezeichnet („*quorum sensing*“). In dieser Phase kommt es zur Etablierung von direkten Zell-zu-Zell-Kontakten („*bridging*“) und einer Änderung in der mikrobiellen Zusammensetzung des Biofilms von

bevorzugt kommensalen zu bevorzugt pathogenen Bakterien. Diese Veränderung wird als ökologischer *Shift* („*ecologic shift*“) bezeichnet. In der letzten Phase findet eine Ausreifung des Biofilms statt. Mit der Ausreifung des Biofilms geht dann die Etablierung und Ausbildung von Tochterkolonien einher.

Ausbildung eines Pellikels

Die Ausbildung des Pellikels vollzieht sich im Wesentlichen in zwei Phasen. Die erste Phase findet innerhalb eines Zeitraums zwischen wenigen Minuten und etwa zwei Stunden statt. Der in diesem Zeitraum entstehende azelluläre Film ist rund 0,1 bis 1µm dick und besteht hauptsächlich aus Speichelproteinen [6]. Zu den Speichelproteinen gehören unter anderem Serumproteine, Glykoproteine, verschiedene Enzyme, Immunglobuline sowie saure prolinreiche Proteine. Die Ladung der Proteine ermöglicht dem Pellikel die Bindung an die Kalzium- und Phosphatgruppen des Hydroxylapatits der Zahnoberfläche. Das Pellikel selbst hat noch keine schädigende Wirkung auf den Zahn. Es bietet ihm sogar einen gewissen Schutz gegen Austrocknung durch wasserretinierende Muzine. Die im Pellikel enthaltenen Phosphoproteine dienen De- und Remineralisationsvorgängen des Zahnhartgewebes. Der Speichel verhindert durch Immunglobulin A und Speichelagglutinine in dieser Phase noch einen großen Teil der Bakterienanlagerung. Durch die genannten Moleküle wird die Anheftung blockiert, und es kommt zur Bildung von Bakterienaggregaten, die weggeschwemmt werden können. Dennoch ermöglicht das Pellikel einzelnen, frei flottierenden grampositiven Kokken und Aktinomyzeten die erste, lockere Anlagerung an die Zahnoberfläche [7]. Die Speichelverbindungen des Pellikels enthalten viele prolinreiche Proteindomänen. Sie bieten durch ein C-terminales Prolin-Glutamin-Dipeptid eine Rezeptorstruktur für orale Bakterienarten, insbesondere für Streptokokkenspezies [8]. In einer zweiten Phase exprimieren die Streptokokken an ihrer Oberfläche sogenannte Adhäsine, die aus Proteinen oder Polysacchariden bestehen und die Anheftung auf der Pellikeloberfläche ermöglichen [9, 10]. Die dann folgende Adhäsion auf dem Pellikel erfolgt in weiteren zwei Schritten. Während anfangs noch die Verbindung der bakteriellen Adhäsine zu den entsprechenden Rezeptordomänen des Pellikels in Form wenig stabiler hydrophober Wechselwirkungen zueinander steht, schließt sich unmittelbar daran in einem zweiten Schritt die Festigung der Bindung durch nichtkovalente stereochemische Verbindungen an [11, 12].

Quorum Sensing führt zur Entstehung eines Biofilms

In den folgenden 2 bis 48 Stunden siedeln nun sogenannte frühe Koloniebildner direkt auf dem Pellikel und bilden Zell-zu-Oberflächen-Kontakte aus. Der erste Zeitraum von circa sechs Stunden in der ersten Besiedlungsphase ist geprägt von vielen Einzelprozessen. Diese Prozesse erfordern ein sinnvoll aufeinander abgestimmtes genetisches Zusammenspiel [13]. Das Kommunizieren der Bakterien untereinander (*Quorum-Sensing*) dient dabei dem Informationsaustausch zwischen den koloniebildenden Bakterien [14]. Es finden Zell-zu-Zell-Signalübermittlungen statt, die zu einer koordinierten Genexpression führen [15, 16]. Die in diesem Stadium noch geringe Menge an austauschbehindernden extrazellulären Matrixmolekülen und die räumliche Nähe der Bakterien zueinander bieten optimale Bedingungen dafür [17]. Im Rahmen des *Quorum Sensings* senden Bakterien konstant niedrige Mengen von Signalmolekülen aus und nehmen sie durch entsprechende Rezeptoren wahr [18]. Durch die Rezeptoren werden keine Veränderungen des Bakterienstoffwechsels bzw. -wachstums veranlasst, solange nicht eine bestimmte Signaldichte erreicht ist, die nur ab einer gewissen Bakterienmenge entstehen kann [19, 20]. Nach Überschreiten einer Schwellenkonzentration in den Bakterien kommt es zur Transkription spezifischer Genprodukte, welche Einfluss auf die phänotypischen Funktionen des Mikroorganismus haben [21]. Zusätzlich zu den physikalischen und chemischen Signalen regulieren Bakterien diverse physiologische Prozesse in Abhängigkeit von der Zelldichte [22]. Die Signale dienen der Anpassung an die ständig wechselnden Umgebungsbedingungen. Das Abspalten von Tochterkolonien erfordert beispielsweise den Ablauf eines genetisch determinierten Programms, das die extrazelluläre Matrix gezielt um das abzulösende Zellkonglomerat trennt [23].

Fast 90 % der Bakterienpopulation im Biofilm werden in diesem Stadium von *S. mitis* zusammen mit anderen Streptokokkenspezies wie *S. milleri* oder *S. sanguis* gestellt. Als grampositives Bakterium enthält *S. mitis* in seiner Zellwand Lipoteichonsäuren [24], bestehend aus anionischen Polysacchariden, die ihm die Anheftung an Epithelzellen ermöglicht. Die Lipoteichonsäure fungiert hier als wichtiges Antigen, das bei einer hohen Konzentration von *S. mitis* Entzündungsreaktionen des Wirtes fördert beziehungsweise unterhält [25]. Zu diesen Reaktionen gehört neben der Bildung von freien Radikalen oder Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF-alpha und -beta) auch die Sezernierung der Interleukine (IL) - 1, -6 und -8. Die frühen Koloniebildner, zu denen zu einem geringen Teil auch grampositive Stäbchen wie *Actinomyces viscosus* und *Actinomyces naeslundii* gehören, verbinden sich

schließlich zu einer Schicht, die in 10 bis 20 Zellschichten der Zahnoberfläche locker aufliegt [26]. Damit ist der Biofilm angelegt.

Bridging führt zur Reifung des Biofilms und zu einem ökologischem Shift

Nach der initialen Besiedlungsphase innerhalb der ersten 48 Stunden steht im darauffolgenden Zeitraum vom 3. bis zum 7. Tag die Vermehrung der angelagerten Spezies sowie deren Anpassung an die vorhandenen Bedingungen im Vordergrund. So formieren sich die einzelnen bakteriellen Individuen zu gut organisierten Gemeinschaften, die sich ergänzen und gegenseitig unterstützen. Unter den einzelnen Bakterien kommt es zur Koaggregation, einer indirekten Haftung, bei der sich weitere Bakterien auf der oben beschriebenen Schicht anlagern [27]. Dies erfolgt zum einen auf direktem Wege durch direkten Zell-zu-Zell-Kontakt gleicher Bakterienspezies, zum anderen durch das *Bridging*. Hierbei werden artfremde Spezies, wie zum Beispiel *Fusobacterium nucleatum* [28] oder *S. mutans* (siehe unten) zwischen die Bakterienzellen geschaltet, um die Adhäsion zu gewährleisten [29]. Die in dieser Phase hinzukommenden, indirekt haftenden Spezies werden als späte Koloniebildner bezeichnet. Dabei kommt es zur Bildung von Zell-zu-Zell-Kontakten dieser Spezies untereinander sowie zu solchen mit den frühen Koloniebildnern [3]. Zusätzlich verändern sich die Anteile der einzelnen Spezies innerhalb der Plaque. Der hohe Anteil grampositiver Kokken und Stäbchen nimmt zugunsten anaerober, gramnegativer Bakterien ab [30]. Von Bedeutung ist in diesem Stadium die Bildung der aus Polysacchariden bestehenden Extrazellulärmatrix, die hauptsächlich durch verschiedene Streptokokkenspezies erfolgt.

In diesem Zusammenhang verdienen die Eigenschaften des vielfach anzutreffenden Mikroorganismus *S. mutans* besondere Beachtung. Das grampositive, fakultativ anaerobe Bakterium überlebt auch niedrige pH-Werte, die innerhalb von Minuten durch bakterielle Fermentierung von Kohlenhydraten auftreten [31]. Es wurde ein Überleben und Wachstum von *S. mutans* im pH-Bereich von 3,0 - 3,5 nachgewiesen [32]. Neben seiner hohen Säuretoleranz ist die Fähigkeit von *S. mutans* zu bemerken, durch die Fermentierung von Zuckern ein wasserunlösliches Glykanmolekül zu bilden [33]. Das so entstandene Molekül, das nicht durch die körpereigenen Dextranasen spaltbar ist, verbindet die Plaque dauerhaft mit ihrer Unterlage [25]. Außerdem ermöglicht *S. mutans* das *Bridging* durch die vermehrte Produktion von extrazellulären Polysacchariden. Diese ermöglichen Bakterien anderer Spezies die Haftung auf der Zahnoberfläche oder die Koaggregation mit anderen Zellen des Biofilms [34]. Damit gilt *S. mutans* als grundlegendes ätiologisches Agens und Leitkeim bei

der Entstehung menschlicher dentaler Karies [35]. Die besonderen Adhäsionseigenschaften dieser Spezies prädestinierten *S. mutans* für die Versuche mit den hier zur Anwendung gekommenen Polycarbonatfolien.

Die beschriebene Änderung der bakteriellen Zusammensetzung der Plaque und eine einsetzende und/oder vermehrte Freisetzung von Virulenzfaktoren kennzeichnen einen ökologischen *Shift*, der nach der ökologischen Plaquehypothese ab einem Alter von rund drei Tagen in der Mikroflora zu verzeichnen ist [36-38]. Überdies wird durch die zunehmende Plaquemenge der Speichelfluss erschwert, und die Pufferwirkung des Speichels nimmt ab [37]. In Verbindung mit kohlenhydratreicher Nahrung führt dies zu einem Absinken des pH-Wertes [39]. Das Verhältnis der Demineralisation zur Remineralisation wird in Richtung Demineralisation verschoben [37, 39-41]. Das Absinken des pH-Wertes begünstigt außerdem die Etablierung säureproduzierender und säuretoleranter Keime wie z.B. *S. mutans* oder Laktobazillen, was zu einer weiteren Ansäuerung der Plaque führt. Die Zunahme der anfangs noch wenig vorhandenen pathologischen Keime und das Sinken des pH-Wertes wandeln die physiologische Plaque zu einer pathologischen Plaque [37, 42, 43]. Es kommt damit zu einer höheren Kariogenität der Plaque [43-48], die wiederum eine Immunreaktion des Epithelgewebes provoziert.

Ausreifung des Biofilms

Die Ausreifung des Biofilms ist nach sieben bis zehn Tagen abgeschlossen. Die so entstandene Plaque bildet einen zäh-verfilzten, rund 200 bis 300 Zelllagen dicken Belag. Dieser bietet neben den oben genannten Spezies auch anaeroben, gramnegativen Keimen gute Lebensbedingungen. Das Nährstoffangebot wird zudem durch mikrobielle Symbiosen und durch Tod und Zerfall von Mikroorganismen verbessert [30]. In der letzten Stufe der Plaquebildung erreicht der Biofilm einen im Verhältnis zur Umgebung stabilen Zustand, die so genannte mikrobielle Homöostase [49]. Die mikrobielle Homöostase ist gekennzeichnet durch ein biochemisches Zusammenspiel zwischen den einzelnen Bestandteilen der Mikroflora bei der Synthese von Glykoproteinkomplexen und Nahrungsketten. Eine weitere typische Eigenschaft des ausgereiften Biofilms ist die kontinuierliche Ablösung von Tochterkolonien [23]. Die Ablösung erfolgt teilweise in Form einzelner Zellen, aber auch in Form von Zellkonglomeraten von rund tausend Exemplaren, die sich von der Oberfläche abspalten [50].

1.2 *Reaktionen des Immunsystems in der Mundhöhle*

1.2.1 **Komponenten und Funktionen des Immunsystems**

Dem Körper stehen zur Abwehr schädigender Fremdstoffe, wie sie auch in der Mundhöhle vorkommen, verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Grundsätzlich sind dabei die spezifische und die unspezifische Abwehr zu unterscheiden, die jeweils auf zellulärer und auf humoraler Ebene agieren.

Die unspezifische Abwehr stellt eine Barriere dar, die der allgemeinen Verteidigung gegen jegliche körperfremden Stoffe dient. Zum größten Teil wird die unspezifische Abwehr auf zellulärer Ebene von den neutrophilen Granulozyten getragen, einer Untergruppe der Leukozyten. Weiterhin sind das Komplementsystem, Lysozym und Interferone an der unspezifischen Abwehr beteiligt. Die neutrophilen Granulozyten haben wie alle Abkömmlinge der Leukozyten die Fähigkeit der Emigration. Sie können demnach einer chemotaktischen Reizung folgend die Gefäßwände durchwandern und - insbesondere bereits durch Antikörper markierte - Fremdkörper phagozytieren. Aufgrund ihrer Fähigkeit, mittels anaerober Glykolyse Energie zu gewinnen, können sie auch in sauerstoffarmem Gewebe agieren. Die von den neutrophilen Granulozyten freigesetzten Stoffe wie Leukotriene, Thromboxane und Prostaglandine sind starke Schmerzinduktoren und dienen der Steuerung von Entzündungsreaktionen.

Verstärkt und ergänzt wird die unspezifische zelluläre Abwehr unter anderem durch die spezifische zelluläre Abwehr. Getragen wird diese auf zellulärer Ebene durch die T-Lymphozyten und auf humoraler Ebene durch die B-Lymphozyten. Diese Zelltypen bilden das immunologische Gedächtnis. Die Bezeichnungen haben die Lymphozyten von ihren Entstehungsorten Thymus (daher: T-Zellen) und Knochenmark (Englisch: „*bone marrow*“, daher B-Zellen). Die Prägung der Lymphozyten erfolgt in den sekundären lymphatischen Organen, wo ihnen Antigene präsentiert werden. Beide Zelltypen liegen dort anfangs in fetaler Form vor und erwerben mit Ausprägung spezifischer Antigenrezeptoren die Fähigkeit, die Oberflächenstruktur bestimmter Antigene selektiv zu erkennen. Das Vorliegen der Rezeptoren kennzeichnet sie als reife Lymphozytenform. Neben unterschiedlichen Oberflächenstrukturen besitzen B- und T-Lymphozyten auch unterschiedliche Aufgaben in der spezifischen Abwehr. B-Lymphozyten tragen an ihrer Zellmembran Immunglobuline, die als Rezeptorstrukturen für Antigene dienen. Ein Teil der B-Lymphozyten wandelt sich beim ersten Antigenkontakt, der Sensibilisierung, in Plasmazellen um. Diese vervielfältigen die spezifisch gegen das Antigen gerichteten Antikörper, welche in die Umgebung abgegeben

werden (humorale Antikörper). Ein anderer Teil der B-Lymphozyten differenziert sich zu B-Gedächtniszellen. Diese behalten ihre membranständigen Immunglobuline. Mit Zunahme dieses Zelltyps steigt die "Gedächtnisleistung" des Abwehrsystems. T-Lymphozyten proliferieren bzw. differenzieren sich zu T-Gedächtnis- und T-Effektorzellen. Die T-Gedächtniszellen zirkulieren im Blut und können Antigene auch Jahre nach dem Erstkontakt wiedererkennen. Im Falle eines Zweitkontaktes proliferieren sie stärker als beim Erstkontakt. Entsprechend ihrer Oberflächendifferenzierung werden T-Effektorzellen in („*cluster of differentiation*“) CD4- und CD8-Subpopulationen unterteilt. CD4-Zellen werden als Helferzellen und CD8-Zellen als Killerzellen bezeichnet. CD4-Zellen produzieren je nach Differenzierung Zytokine, die die Abwehrreaktionen von Makrophagen (zelluläre Immunreaktion) oder B-Lymphozyten (humorale Immunreaktion) stimulieren. Die CD8-Zellen differenzieren sich zum einen zu T-Killerzellen, die der Abtötung antigentrager Zellen dienen. Zum anderen differenzieren sie sich zu T-Suppressorzellen, die die Aktivität von B- und T-Lymphozyten gegen ein bestimmtes Antigen unterdrücken und somit eine überschießende Immunreaktion verhindern.

Antimikrobielle Peptide (AMPs)

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind definiert als Proteine, die kleiner sind als 100 Aminosäuren (AS) und ein Molekulargewicht zwischen 3500 und 6500 Dalton (Da) aufweisen [51]. Trotz ihres geringen Molekulargewichtes besitzen die amphipathischen AMPs ein breitgefächertes antimikrobielles Spektrum gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie Viren und Hefen [52-56]. Für zukünftige Anwendungen in der Medizin sind die AMPs von besonderem Interesse, weil sie zwar ähnlich wirken wie Antibiotika, eine Resistenzentwicklung bisher aber noch nicht zu beobachten gewesen ist. Die Gruppe der antimikrobiellen Peptide schließt das kürzlich beschriebene Psoriasin (PSO) und die Ribonuclease 7 (RNase-7) [57-59], die Defensine und das Cathelicidin-Derivat LL-37 ein. Sie kommen in der oralen Mukosa, der Haut [60] und in vielen anderen Epithelien, zum Beispiel Harntrakt und Niere [3, 54, 61-65] vor.

PSO und RNase-7 wurden als Mitglieder der Protein-Übergruppe S100 identifiziert und kürzlich als neue antimikrobielle Peptide beschrieben [58, 59]. Die Expression sowohl von PSO als auch von RNase-7 ist durch pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-1 beta, Interferon gamma (IFN-gamma), TNF-alpha und *Escherichia-coli*-Kultur-Abkömmlinge induzierbar [58, 59]. In unserem Labor wurde die Gen-Expression von PSO und RNase-7

2008 in gingivalen Epithelzellen festgestellt. Zusätzlich wurde dargestellt, dass die mRNA-Expression von PSO und RNase-7 durch natürlich gebildete Biofilme induzierbar ist, wobei sich jedoch interindividuelle Differenzen zeigten [57].

Als Teil der angeborenen Immunität ergänzen Defensine die antimikrobiellen Eigenschaften des Speichels, die beispielsweise durch Lysozyme oder Immunglobuline [66, 67] generiert werden. Man unterscheidet humane alpha- und beta-Defensine (hBD).

Die Gruppe der alpha-Defensine ist induzierbar. Sie werden im Falle einer Infektion oder in Karzinomen vermehrt exprimiert [68, 69]. Alpha-Defensine werden in den Paneth-Zellen des Intestinaltraktes [60, 70] und in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten gebildet [71]. Außerdem werden sie in den oralen Speicheldrüsen [72-74] produziert und mit dem Speichel [69] sezerniert. Die Konzentration der alpha-Defensine ist variabel und kann von nicht feststellbaren Mengen bis etwa 12 µl/ml Speichel betragen.

Beta-Defensine wurden im bovinen oralen Epithel und dem Epithel der Trachea entdeckt [75, 76]. Später wurden beta-Defensine in vielen anderen Epithelien, zum Beispiel Harntrakt, Niere, Haut und dem oralen Epithel [62, 64, 75, 77] und in biologischen Sekreten wie z.B. Bronchialsekret, Nasensekret, Urin, Speichel und der Sulkusflüssigkeit [64, 78-80] nachgewiesen. Beta-Defensine sind Proteine mit einer beta-Faltblattstruktur, deren Cysteine durch drei Disulfid-Brücken stabilisiert sind [62, 64, 75, 76, 81].

Im Vergleich zu den alpha-Defensinen handelt es sich bei den beta-Defensinen nicht um rein induzierbare Defensine. Das antimikrobielle Peptid hBD-1 wird in Epithelien konstitutiv exprimiert. Die hBD-2- und hBD-3-Ausschüttung in entzündetem Gewebe der Haut und anderen Epithelien [82, 83] ist durch mikrobielle Lipopolysaccharide (LPS) von *Candida albicans* oder durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 oder TNF-alpha induzierbar [67, 73, 75, 83-88].

Die beta-Defensin-Expression in der Mundhöhle nimmt im Vergleich zu den restlichen Epithelien eine Sonderstellung ein. Im nicht entzündeten oralen Epithel werden auch hBD-2 und hBD-3 konstant exprimiert. Die Expression ist hier jedoch nicht vom Auftreten anderer Indikatoren der Immunabwehr begleitet wie beispielsweise der Expression von IL-8 [86]. Dieses Expressionsmuster legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen Teil der normalen Funktion des Epithels als Barriere gegenüber der stetig hohen oralen mikrobiellen Belastung handelt [62, 86, 89].

Die in der Mundhöhle nachgewiesenen beta-Defensine hBD-1, -2 und -3, genau wie LL-37, sind in verschiedenen Schichten des oralen Epithels zu finden. Dies lässt vermuten, dass sie entsprechend ihrer Expressionsorte unterschiedliche Rollen bei der Abwehr von intraoralen Keimen spielen. Die Expressionsmuster humaner beta-Defensine (hBD) folgen dabei dem stratifizierten Aufbau des oralen Epithels [71]. In den basalen Epithelschichten fehlen die antimikrobiellen Peptide hBD-1 und hBD-2. Bei oral gesunden Individuen wurde in den basalen Schichten des Epithels das hBD-3 nachgewiesen [90]. Ab der ersten suprabasalen Schicht sind hBD-1 und hBD-2 nachweisbar. Von dort an nehmen sie mit steigender Zelldifferenzierung in der Epithelschicht zu. Studien an oral gesunden wie auch an erkrankten Individuen zeigten, dass die hBD-1- und hBD-2-Expression erwartungsgemäß am höchsten in den oberflächlichen Epithelschichten ist, wie dem *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* [91]. Alpha-Defensine und LL-37, die in großen Mengen von neutrophilen Granulozyten produziert werden, haben die Möglichkeit, durch Epithelien zu diffundieren. Das basale Epithel wird von alpha-Defensinen und LL-37 geschützt, während die höher differenzierten Schichten stärker unter dem Schutz von beta-Defensinen stehen [71].

Durch gingivale oder parodontale Entzündungen ändert sich die Defensin-Expression. Es zeigten sich aber in vorangegangenen Studien große interindividuelle Unterschiede bezüglich der Gen- und Proteinexpression von AMPs [90-93]. Bei einer Gingivitis wurden geringere Genexpressionen von hBD-1 (66 %) und hBD-2 (86 %) mittels RT-PCR festgestellt als im nicht entzündeten oralen Epithel. Im Gegensatz dazu wurde hBD-3 in 100 % der untersuchten Epithelien mit vorliegender Gingivitis nachgewiesen [93]. Im Falle einer Parodontitis wurden nochmals geringere Prozentzahlen der mRNAs der beta-Defensine nachgewiesen. Die mRNA-Expression von hBD-1 war in 60 % der Proben von Parodontitiserkrankten nachweisbar, während sich die mRNA-Expression von hBD-2 und -3 jeweils bei unter 40 % befand [93]. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Bissell *et al.* [94]. Die Ergebnisse beider Studien lassen ein Sinken der mRNA-Expression von hBD-2 und hBD-3 im Falle einer Gingivitis und einer Parodontitis vermuten. Weitere Studien [92] kamen zu dem Ergebnis, dass die Expression von hBD-2 und hBD-3 bei einer Gingivitis und einer Parodontitis im Vergleich zur nicht entzündeten Gingiva ansteigt. Die Expressionswerte ergaben für hBD-3 keinen Unterschied zwischen Gingivitis und der nicht entzündeten Gingiva, jedoch einen Anstieg bei der Parodontitis. Die widersprüchlichen Ergebnisse der bisherigen Studien lassen keine eindeutige Schlussfolgerung zu. Sie belegen lediglich, dass die beta-Defensine in einen komplexen Abwehrvorgang eingebunden sind.

Die Wirkungsweise der Defensine ist noch nicht gänzlich erforscht, liegt aber wahrscheinlich in ihrer kationischen Ladung begründet. Diese interagiert mit den anionischen Ladungen der mikrobiellen Zellwand [95]. Durch Oligomerisierung und Einlagerung der Moleküle kommt es zur Porenbildung oder Unterbrechung der mikrobiellen Membran. Neuere Forschungen lassen jedoch zusätzliche zytoplasmatische Interaktionen vermuten [95].

Immunmodulatorische Moleküle

Einzelne Komponenten des Immunsystems kommunizieren miteinander oder auch mit Gewebezellen mittels immunmodulatorischer Moleküle, z.B. Entzündungsmediatoren, die aus dem Komplementsystem oder direkt aus den Abwehrzellen freigesetzt werden. Sie werden unter dem Begriff Zytokine zusammengefasst. Zu den wichtigsten Zytokinen im Zuge einer Inflammation des oralen Epithels gehören unter anderem die Interleukine IL-1, -4, -6, -8. In der vorliegenden Studie wurde IL-8 als Indikator für Entzündungsreaktionen der Epithelzellen verwendet. IL-8 weist ein breites Spektrum biologischer Effekte auf. Die entscheidende Eigenschaft ist die Anregung der Chemotaxis und die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten in mit parodontopathologischen Keimen infizierten Geweben.

Leukotriene gehören ebenfalls zur Gruppe der interzellulären Botenstoffe und sind bekannt für ihre proinflammatorischen Wirkungen. So stellt z.B. das Leukotrien C₄ (LTC₄) einen starken Bronchokonstriktor dar, während es gleichzeitig die Kapillarpermeabilität steigert. LTB₄ wiederum wirkt chemotaktisch auf Leukozyten. Als eine entscheidende Komponente im Syntheseweg der Leukotriene gilt die 5-Lipoxidase (5-LO, synonym: 5-Lipoxygenase) [96]. Bis vor einigen Jahren war die 5-LO-Expression nur in Leukozyten bekannt, mittlerweile konnte sie aber auch in Epithelzellen aus den Bronchien [97, 98] und der Haut [99] nachgewiesen werden.

1.2.2 Immunreaktionen des oralen Epithelgewebes

Das Epithelgewebe dient dem Körper als vorderste Barriere gegen sämtliche Umwelteinflüsse. Insbesondere bei der Abwehr von Krankheitserregern nimmt das Epithelgewebe daher eine Schlüsselrolle ein. Zum Zwecke der Abwehr nutzt der Organismus eine Kombination aus physikalischen, chemischen und biologischen Faktoren. Eine intakte, geschlossene Gewebeoberfläche, ein niedriger pH-Wert, kommensale Bakterien [100] und AMPs [22, 101] verhindern als Bestandteile der angeborenen Immunantwort eine Invasion von Krankheitserregern und damit auch ein Eingreifen von T- und B-Zellen, das fast unweigerlich eine Entzündung auslösen würde [66, 102].

In der Mundhöhle liegt unter physiologischen Bedingungen ein Biofilm aus kommensalen Bakterien vor [42, 103], der in Kombination mit AMPs wie hBD-2, RNase-7, PSO und den proinflammatorischen Mediatoren 5-LO und IL-8 [79, 91, 101, 104] die Besiedlung mit pathogenen Keimen nahezu verhindert [105-107]. Zu berücksichtigen ist dabei, dass die orale Biofilmzusammensetzung bzw. Mikroflora interindividuell stark divergiert. Der komplexe Aufbau wurde bereits in früheren Studien analysiert [3, 108].

Während vereinzelt vorliegende Pathogene durch die oben genannten Maßnahmen neutralisiert werden können, ist ein bereits bestehender Biofilm aus Bakterien durch das Immunsystem kaum angreifbar. Die Matrix des Biofilms besteht aus sogenannten extrazellulären polymeren Substanzen, die sich wiederum aus Polysacchariden, Proteinen, Glykolipiden und Bakterien-DNA zusammensetzen [109]. Der Biofilm verhindert die Phagozytose einzelner, in die Matrix integrierter Bakterien und erschwert den Eintritt von Antikörpern und AMPs. Zudem induzieren Biofilme möglicherweise eine Differenzierung von Makrophagen. Diese Differenzierung führt zum sogenannten M2-Phänotyp, der im Gegensatz zum M1- Phänotyp einer Entzündung entgegenwirkt, oder sogar zu deren Zelltod („*rapid macrophage death*“) [110]. Die Freisetzung von Katalase schützt aggregierte Bakterien des Weiteren vor von Immunzellen produziertem Wasserstoffperoxid [111]. Auf diese Weise ermöglicht der Biofilm den darin befindlichen Bakterien einen geschützten Raum zur Vermehrung und Differenzierung. An seiner Entstehung und Etablierung beteiligte Moleküle werden deswegen als Pathogenitätsfaktoren charakterisiert. Auf die Mundhöhle bezogen kann die Entstehung eines Biofilms pathogener Keime somit als eine Begleiterscheinung, möglicherweise sogar als mitursächlich für den oben beschriebenen, pathogenen *Shift* angesehen werden.

1.3 *Interaktion von Biofilmen und Epithelzellen im Modell*

Das Epithel stellt die äußere „Grenze“ eines Organismus zur Umwelt dar. Es markiert dementsprechend auch die erste Interaktionsmöglichkeit von Pathogenen und Immunsystem. Häufig wird hier die weitere Reaktion des Immunsystems bereits entscheidend geprägt. Ein detailliertes Wissen über diese erste Reaktion des Immunsystems ist für eine mögliche medikamentöse oder anderweitig positive Beeinflussung des Immunsystems bei Infektionen aller Art daher von großer Bedeutung. Verglichen mit anderen Epithelgeweben des respiratorischen oder reproduktiven Trakts, oder anderen Komponenten des

Verdauungsapparates, die ebenfalls zum Austausch von Substanzen mit der Umwelt vorgesehen sind, ist die Mundhöhle vergleichsweise leicht zugänglich und stellt einen sehr genau definierten Raum dar. Die Wichtigkeit der zu gewinnenden Erkenntnisse und die leichte Zugänglichkeit machen die Mundhöhle und noch mehr die von ihr abgeleiteten Modelle zu einem wichtigen Experimentierraum für die Erforschung der ersten Reaktionen des Immunsystems auf von außen eindringende Pathogene. Die so gewonnenen Erkenntnisse können beispielsweise direkt zur Unterstützung der Prophylaxe gegen Karies und Parodontose herangezogen werden.

1.3.1 Biofilmmodelle

Zur Untersuchung von Biofilmen und ihren Eigenschaften wie Akkumulation, Entwicklung, Verhalten und Pathogenität wurden verschiedene Modelle unterschiedlicher Komplexität etabliert [13, 112-116]. Grundsätzlich zu unterscheiden sind hierbei mathematische Modelle, *in situ*-Untersuchungen, Mikrokosmos-Modelle und experimentelle Modellsysteme.

Mathematische Modelle

Die mathematischen Modelle stellen die abstrakteste Form der Biofilmuntersuchung dar. Die charakteristischen Verhaltensweisen des Biofilms werden hier lediglich in Form mathematischer Verhältnisse dargestellt. Mit ihrer Hilfe sollen vorhersagbare Reaktionen berechnet werden. Mathematische Modelle können nur auf einzelne, wesentliche Charakteristika des Biofilms eingehen und gelten daher als extreme Simplifikation. Sie dienen daher nur der Erarbeitung einer Hypothese, die mithilfe von Experimenten validiert werden muss.

In situ-Untersuchungen

Hierbei werden Biofilme, ihre Bestandteile und Eigenschaften direkt *in situ*, wörtlich übersetzt also „am Ort“, untersucht. Damit wird die natürliche Umgebung eines Biofilms so weit wie möglich gewahrt. Bei Untersuchungen von Biofilmen in der Mundhöhle ist dabei allerdings die hohe Heterogenität der Plaque mit Hunderten verschiedener Spezies und einer unbekannt Menge genetisch unterschiedlicher Subspezies und Stämmen [117] zu beachten. Zudem verändert sich ihre Zusammensetzung während des Reifeprozesses deutlich [118] und unterscheidet sich zusätzlich je nach ihrer Lokalisation in der Mundhöhle, sowie von Mensch zu Mensch [119, 120]. Dies erschwert einen Vergleich der individuellen Ergebnisse einzelner

Probanden sowie deren Interpretation deutlich. Ein weiteres Problem stellen die beengten Platzverhältnisse in der menschlichen Mundhöhle dar.

Mikrokosmos-Modelle

Pritchard und Bourquin definierten 1984 den Mikrokosmos als einen Versuch, einen intakten Teil eines Ökosystems in seiner natürlichen Lebensform unter Laborbedingungen zu halten und zu untersuchen. In Bezug auf die orale Plaque bedeutet dies, dass ein Stück des natürlichen Biofilms aus der Mundhöhle entfernt und auf einer Zahnoberfläche, beispielsweise in einem sogenannten *Artificial Mouth* („*artificial mouth*“), in Speichel weitergezüchtet wird, wo er weiteren Versuchen dient [114, 115, 121-130]. Dabei erfährt das natürliche Keimspektrum eine Reduktion auf ein synthetisches Konsortium, das aus wesentlichen plaquebildenden Spezies zusammengestellt wird [39, 46, 100, 131-136]. Somit ist das experimentelle Modellsystem gezielt vereinfacht und kann unter kontrollierten Laborbedingungen verändert werden. Die Experimente im Mikrokosmos sind bequemer auszuführen und die Laborkonditionen zumindest teilweise reproduzierbar. Allerdings ist die Erstellung und Aufrechterhaltung eines Mikrokosmos häufig zeitlich und/oder finanziell aufwendig und für die Antwort auf einzelne Fragestellungen nicht notwendig.

Experimentelle Modelle

Das experimentelle Modell stellt gegenüber dem Mikrokosmos eine weitere Vereinfachung zur Untersuchung einer kleinen Menge von Variablen dar. Dabei werden Parameter ohne Einfluss auf diese Variablen entweder konstant gehalten oder sogar komplett ignoriert. Im besten Fall ist ein experimentelles Modell nur so kompliziert, dass es generelle Voraussetzungen der *in vivo*-Situation widerspiegelt, dabei aber so einfach, dass es mit geringem Aufwand in vielen verschiedenen Laboren unter gleichen Bedingungen den gleichen (Referenz-)Wert für die eine untersuchte Variable erzeugt.

Das einfachste Beispiel eines experimentellen Modellsystems in Bezug auf Fragestellungen zu Eigenschaften und Fähigkeiten einer Bakterienkultur ist das sogenannte Non-Biofilm-Kultursystem, das die Basis für aufwendigere Modelle bildet. Es stellt eine statische Kultur ohne kontinuierlichen Stoffaustausch („*batch culture*“) einer einzigen Spezies dar. Durch das Fehlen genetischer oder räumlicher Heterogenität und ohne wechselnde bakterielle Umgebung handelt es sich bei diesem Modelltyp dementsprechend nicht um einen Biofilm.

Das Non-Biofilm-Kultursystem ist dementsprechend nur geeignet, grundsätzliches Bakterienwachstum zu untersuchen [137].

Im Falle des Chemostat-Modells liegt eine kontinuierliche Kulturform des Biofilms mit planktonischem Anteil vor [38, 138-143]. Der Chemostat ist ein Kulturgefäß, in das stetig eine bestimmte Menge frischen Nährmediums mit einer festgelegten Flussrate zugeführt und aus dem verbrauchtes Nährmedium abtransportiert wird. Durch das Zu- und Abführen des Nährmediums wird die Mortalitätsrate natürlicher Populationen simuliert. Die Wachstumsrate der Mikroorganismen wird durch die Nährstoffzufuhr reguliert. Wichtige Parameter der Populationsentwicklung können mit diesem Modelltyp untersucht werden.

Zu den klassischen mikrobiologischen Untersuchungen mit kontrollierten Chemostat-Versuchen kamen in den letzten Jahren die CDFF-Modelle („*constant depth film fermenter*“). Die Besonderheit dieses Modelltyps ist die Begrenzung der Biofilmdicke durch mechanisches Abtragen. Die Anzucht des Biofilms geschieht auf inerten Teflon-Platten mit variierbaren Vertiefungen von gewöhnlich 300 µm. In diesen Vertiefungen wächst der Biofilm, bis er die Höhe der Vertiefung überschreitet. Durch einen Teflon-Spatel wird der über die Vertiefung hinausragende Anteil abgetragen. Mit dem Spatel können dem System auch notwendige Flüssigkeiten zugeführt beziehungsweise verteilt werden [115, 116, 144]. Bis zum Erreichen der vorgegebenen Höhe befindet sich über dem Biofilm ein planktonischer Anteil als zweite Phase.

Intraorale Modelle nutzen die Mundhöhle als Inkubationsraum, z.B. für die Entstehung und Reifung von Biofilmen auf in den Mundraum eingebrachtes Trägermaterial. Die dafür verwendeten Plastikstreifen [145], Bänder [146] oder der Zahnschmelz [6, 147] dienen hierbei der Plaqueanlagerung und können für spätere Untersuchungen aus der Mundhöhle entnommen werden. Die Anlagerung auf Bändern und Streifen bietet den Vorteil, dass das Risiko plaquebedingter Gewebsentzündungen reduziert ist. Durch den besseren Zugang ergeben sich gegenüber den *in situ*-Untersuchungen bessere Möglichkeiten für Probeentnahmen. Allerdings entsprechen die auftretenden Probleme mit der erschwerten Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Probanden den oben genannten der *in situ*-Untersuchungen [77, 113, 148]. Die intraorale Aufzucht natürlicher Biofilme auf Polycarbonatfolien wurde 2008 erstmals angewendet, um die Freisetzung antimikrobieller Peptide zu untersuchen [57]. Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls angewendet. Damit wurden natürliche Biofilme, die jeweils aus verschiedenen Spezies

bestanden, herangezuechtet. Neben diesen Multispezies-Biofilmen („multispecies biofilms“) wurden zu Vergleichszwecken auch aus einer einzelnen Spezies, das heißt *S. mitis* oder *S. mutans*, bestehende Biofilme hergestellt und für Experimente genutzt. Der Einzelspezies-Biofilm soll hier als artifizielle Sonderform gelten, welche wie ein natürlicher Biofilm eine homogene bakterielle Oberfläche besitzt. Mit dieser entscheidenden Eigenschaft sollte er wie der natürliche Biofilm geeignet sein, Epithelzellen zu stimulieren. Die Bezeichnung des Einzelspezies-Biofilm ist in der Literatur gebräuchlich. Sie soll als textliche Vereinfachung dienen, indem sie der Bezeichnung Multispezies-Biofilm, im vorliegenden Fall als natürlicher Biofilm bezeichnet, gegenübergestellt wird.

1.3.2 HaCaT-Zellen als Modell für orale Epithelzellen

In der vorliegenden Studie sollte ein Modell zur Untersuchung der Reaktion von Epithelzellen auf Biofilme etabliert werden. Die in dieser Machbarkeitsstudie verwendeten Epithelzellen sollten dementsprechend einfach verfügbar, anspruchslos in der Kultivierung und unkompliziert in der Handhabung sein. Die Wahl fiel deswegen auf die lange etablierten HaCaT-Zellen. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um humane, spontan immortalisierte Keratinozyten, die sich unter Langzeit-Kulturbedingungen bei reduzierter Calcium-Konzentration und erhöhter Temperatur aus humanen adulten Hautkeratinozyten entwickelt haben [149]. Der Name HaCaT ist abgeleitet von den beschriebenen Kulturbedingungen, unter denen die Zelllinie entstand (Ha = „human“ / „adult“, Ca = „low calcium“, T = „high temperature“). HaCaT-Zellen besitzen einige Eigenschaften, die sie deutlich von natürlichen Keratinozyten unterscheiden und sie unter diesen Gesichtspunkten nur bedingt mit natürlichen Keratinozyten vergleichbar machen. Natürliche Keratinozyten durchlaufen einen Differenzierungs- beziehungsweise Alterungsprozess, der mit dem Absterben der Zelle endet. HaCaT-Zellen jedoch besitzen Immortalität, die unter anderem in einer erhöhten Aktivität des Enzyms Telomerase [150] sowie Mutationen an beiden Allelen des p53-Gens [151] begründet ist. Über einen Experimentalzeitraum von über sechs Jahren und mehr als 300 Populationsteilungen zeigten HaCaT-Zellen eine konstante Balance des genetischen Materials und blieben tumorfrei verglichen mit viral transformierten Keratinozyten [152]. Auch unter *in vivo*-Bedingungen zeigten HaCaT-Zellen trotz Immortalität keine tumorartigen oder invasiven Eigenschaften [149, 153]. HaCaT-Zellen sind, im Gegensatz zu normalen humanen Keratinozyten, auch in serumfreien Medien kultivierbar. Dies ist in Experimenten von Vorteil, weil das Vorhandensein von Seren die Ergebnisse von *in vitro*-Versuchen verfälscht und ihre Interpretation erschwert. Vorhergehende Untersuchungen hatten ergeben, dass die

Summe der Proliferations- und Differenzierungseigenschaften der in serumfreien Medium aufgezogenen HaCaT-Zellen vergleichbar sind mit denen der normalen humanen Keratinozyten [154]. Durch die Immortalität der verwendeten HaCaT-Zellen gestaltete sich die Aufzucht und Subkultivierung der Epithelzellen vergleichsweise einfach. Sie erwiesen sich als robust und zeigten schnelle Wachstumseigenschaften. Daher eigneten sie sich gut für die Untersuchung der Immunreaktion. Ein weiterer Vorteil der HaCaT-Zellen war, dass sie vollkommen unabhängig von jeglicher Probanden-*Compliance* zur Verfügung standen.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften wurden HaCaT-Zellen bereits mehrfach eingesetzt, um sich einer Reaktion von Epithelzellen in der Mundhöhle modellhaft anzunähern. So stimulierten Gursoy *et al.* HaCaT-Zellen mit in der Parodontose involvierten Fusobakterien und analysierten die freigesetzten Mengen an Matrixmetalloproteinasen und IL-8 [155]. Zur Untersuchung des Einflusses von Arecolin auf die Ausbildung von oraler submukoser Fibrose nutzten Li *et al.* ebenfalls HaCaT-Zellen, um einen Eindruck von der möglichen Reaktion oraler Epithelzellen auf diesen Wirkstoff zu gewinnen [156]. Darüber hinaus wurden mehrere Studien zur Wirkung von Nikotin oder Schnupftabak auf Epithelzellen unter Nutzung von HaCaT-Zellen als Modellzellen durchgeführt. So untersuchten Avezov *et al.* die zeit- und dosisabhängige Wirkung von Zigarettenrauch auf die Modifikation von Proteinen [157], Nakamura *et al.* die Wirkung von Nikotin auf die Expression von hBD2 [158], Lee *et al.* die Effekte von Nikotin auf Proliferation, Zellzyklus und Differenzierung [159] und Merne *et al.* die Wirkung von Schnupftabak auf Wachstum und Differenzierung [160] - nicht nur, aber immer auch - in HaCaT-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden HaCaT-Zellen aufgrund der oben beschriebenen vorteilhaften Eigenschaften und der bereits publizierten Verwendung als solche ebenfalls als ideale Modellzellen für Epithelzellen zur Anwendung gebracht.

1.3.3 Vorhergehende Studien

Die Reaktionen des Immunsystems auf Biofilme aus *Pseudomonas aeruginosa* sind kürzlich in einer Übersichtsarbeit von Jensen *et al.* zusammengefasst worden [161]. Darin diskutieren die Autoren den Stand der Forschung in Bezug auf die Reaktionen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Für die Aktivierung des letzteren wird den dendritischen Zellen eine besondere Rolle zugeschrieben. Zudem wird die Möglichkeit erläutert, den Nachweis spezifischer Antikörper oder T-Zellen als diagnostischen Marker für eine Biofilminfektion zu etablieren. Da eine Infektion mit einem Biofilm aus *P. aeruginosa* am häufigsten in der Lunge von Patienten mit cystischer Fibrose auftritt, wird die Rolle dieser Krankheit bei Reaktionen

der erworbenen Immunität auf Biofilme noch einmal separat diskutiert. Als für die Biofilmbekämpfung entscheidende Komponenten des angeborenen Immunsystems werden neutrophile Granulozyten und Makrophagen genannt, die sowohl bei zystischer Fibrose als auch bei chronischen Wunden gegen Biofilme vorgehen. Außerdem gelten die *Toll like-Rezeptoren* („*toll like receptors*“) TLR1, -2, -4 und -5 als entscheidend. Dabei erkennt die Kombination aus TLR1 und -2 bakterielles Lipoprotein, während TLR2 und -4 zur Monozytenaktivierung durch Erkennung eines von *P. aeruginosa* produzierten Alginats beitragen. TLR5 kann darüber hinaus die noch im Plankton befindlichen *P. aeruginosa* anhand ihres Flagellins detektieren. Interessanterweise scheint die Erkennung von bakterieller DNA, die in der Biofilmmatrix als Strukturprotein verwendet wird, TLR9-unabhängig zu erfolgen. Während das Immunsystem also gegen *P. aeruginosa* vorgeht, ist das Bakterium umgekehrt auch gegenüber dem Immunsystem aktiv. Beispielsweise kann das Komplementsystem durch die Freisetzung von alkalischen Proteasen und Elastase inaktiviert werden. Weiterhin setzt das Pathogen Rhamnolipide frei, die als starke Detergenzien zur Nekrose von neutrophilen Granulozyten (und wohl auch Epithelzellen) führen. Ihre Expression und Freisetzung wird durch *Quorum Sensing*-Signale gesteuert. Diese beeinflussen überdies die Genexpression in eukaryotischen Zellen und schwächen somit die Immunreaktion weiter ab. So inhibieren sie die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF-alpha in Lymphozyten und induzieren Apoptose in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen.

Wie stark ein solch immunstimulierender Effekt eines Biofilms aus *P. aeruginosa* gegenüber im Plankton befindlichen Bakterien ist, konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Schröder vom Universitätsklinikum in Kiel zeigen. In ihrer Studie wird beschrieben, wie eine mukoide Form von *P. aeruginosa* die Expression von hBD-2 in respiratorischen Epithelzellen induziert, während zwei nichtmukoid wachsende Stämme von *P. aeruginosa* keine hBD-2-Produktion verursachen [83].

Die dentale Plaque wurde bereits in mehreren Publikationen als Biofilm charakterisiert, der im Gegensatz zu aus *P. aeruginosa* oder anderen Einzelspezies-Biofilmen aus einem Konglomerat vieler verschiedener Bakterien besteht [162, 163]. Ein solcher Biofilm lässt sich mit einem definierten Bakterienspektrum *in vitro* herstellen [162]. In der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit entstand, wurde bereits vorher mit natürlich und intraoral erstellten Biofilmen gearbeitet [57]. Diese sollten in Bezug auf die in Epithelzellen induzierten Expressionen mit Einzelspezies-Biofilmen verglichen werden. Ein Modell zur Untersuchung der Induktion von immunmodulatorischen Proteinen in Epithelzellen durch Biofilme muss

von standardisiert gezüchteten Biofilmen ausgehen und diese in unmittel- oder mittelbarem Kontakt mit Epithelzellen bringen. Deren Reaktion wird anschließend analysiert. Konkret sollte die Immunreaktion von Epithelzellen auf den kommensalen Keim *S. mitis* und den pathogenen Keim *S. mutans* verglichen werden. Die zu erwartenden Unterschiede könnten Hinweise auf die Divergenz der Immunantworten bei der Plaquebildung – vor und nach dem ökologischen *Shift* – erbringen.

2 Fragestellung

Die Mundhöhle bietet Raum für eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen, die häufig als Biofilme organisiert sind. Diese liegen in direkter Nachbarschaft zu den Epithelzellen, deren Immunreaktion die erste und wahrscheinlich für das weitere Vorgehen des Immunsystems entscheidende Massnahme gegenüber den Keimen darstellt. Eine Charakterisierung dieser Immunreaktion im Hinblick auf die Expression von AMPs und immunmodulatorischer Moleküle wird zu einem tieferen Verständnis der Organisation von Mikroorganismen und Wirtszellen in der Mundhöhle führen und langfristig möglicherweise die Prophylaxe und/oder eine eventuelle Therapie zur Gesunderhaltung von Zahnfleisch und Zähnen beeinflussen.

Um einen Teil der dazu vorgesehenen Methoden sowie den Ablauf der experimentellen Schritte zu etablieren, sollte in der vorliegenden Arbeit die Verwendung oraler Biofilme als Induktoren zur Expression von AMPs und immunmodulatorischer Moleküle durch Epithelzellen getestet werden. Untersucht werden sollte dies anhand von natürlich gebildeten Biofilmen in unterschiedlichen Wachstums- beziehungsweise Reifungsstufen sowie zwei bakteriellen Kulturen, die aus jeweils einem oralen Keim bestehen. Hierfür wurden *S. mitis* als typischer Vertreter der frühen, und *S. mutans* als Vertreter der späten beziehungsweise reifen Plaque gewählt. Als einfach zu handhabendes Modell für Epithelzellen wurde in dieser Pilotstudie die Keratinozytenzelllinie HaCaT verwendet.

Ziel der Arbeit war somit die Etablierung eines Modellsystems zur Charakterisierung der Reaktion von Epithelzellen auf typischerweise in der Mundhöhle lokalisierte Biofilme. Dazu wurden in einem ersten Schritt die mikrobiellen Zusammensetzungen der intraoral angezüchteten Biofilme dreier Probanden und deren mikrobielle Speichelzusammensetzung miteinander verglichen. Weitere Zielsetzung war das semiquantitative Erfassen der Expression antimikrobieller und immunmodulatorischer Moleküle durch Epithelzellen nach entsprechender Stimulation durch Biofilme verschiedenartiger Zusammensetzung. Abschließend sollte anhand der erhaltenen Daten die Eignung des vorgestellten Modells für weitere Experimente diskutiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Auf dieser und der folgenden Seite werden Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgeführt, die nicht explizit in der Beschreibung der jeweiligen Methode erwähnt werden.

Gerät / Material	Hersteller
<i>Für den wiederkehrenden Gebrauch bei verschiedenen Experimenten:</i>	
Beckman J2-21M/E Centrifuge	Beckman, München
Brutschrank BK6160	Heraeus, Hamburg
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank Heraeus HERA safe	Thermo Electron Corp., Karlsruhe
Tischwaage PCE-BS 6000	PCE Deutschland GmbH, Meschede
<i>Vacusafe comfort</i>	IBS, Fernwald
<i>Für die Pellikelbildung:</i>	
<i>Biopsy Punch</i>	Stiefel, Offenbach am Main
<i>Für die Anzucht der Bakterienkultur:</i>	
<i>CampyPak Plus Microaerophilic System Envelopes with Palladium Catalyst</i>	BD, Heidelberg
<i>Cryobank Stammhaltungssystem</i>	Mast Diagnostica, Reinfeldt
<i>Gas Pak System</i>	BD, Heidelberg
<i>Für die Extraktion der Gesamt-RNA:</i>	
<i>RNeasy Total RNA Kit</i>	Qiagen, Hilden
Ethanol (100 %)	Sigma, Taufkirchen
<i>Spin Tube 50µl</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy mini column</i>	Qiagen, Hilden

Gerät / Material	Hersteller
<i>Für Aufzucht, Einfrieren und Auftauen von HaCaT-Zellen:</i>	
Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin
Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
DMEM <i>Dulbeco's modified Eagle Medium</i>	Biochrom AG, Berlin
DMSO <i>Freeze Medium</i>	Biochrom AG, Berlin
Dulbeco's PBS ohne Mg, Ca	Biochrom AG, Berlin
FCS Kälberserum <i>Fetal calf serum</i>	Biochrom AG, Berlin
Keratinocyten <i>Growth Medium 2 Kit</i>	PromoCell, Heidelberg
Keratinocyten SFM <i>Serum free medium</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Biochrom AG, Berlin
Trypsin-EDTA-Inhibitor	Biochrom AG, Berlin
<i>Tissue Culture Plate 6-Well</i>	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Tissue Culture Flask 25 cm²</i>	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Tissue Culture Flask 75 cm²</i>	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Für die mikrobiologische Analyse:</i>	
Thioglykolat	Oxoid GmbH, Wesel
Columbia Blutagar	Oxoid GmbH, Wesel
Schokoladenagar/Vitox	Oxoid GmbH, Wesel
Haemophilus-Selektivagar	Oxoid GmbH, Wesel
Analyseeinheit Vitek 260	bioMerieux, Nürtingen
Vortex-Mischer Genius 3	IKA GmbH & Co KG, Staufen
Gram-Färbung	Merck, Darmstadt
Oxidase	Oxoid GmbH, Wesel
Katalase	Oxoid GmbH, Wesel
H ₂ O ₂ -Lösung	Merck, Darmstadt

3.2 *Mikrobiologische Methoden*

3.2.1 Herstellung der Einzelspezies-Biofilme

Vorbereitung der Polycarbonatfolien

Als Trägermaterial wurden Polycarbonatfolien (*Overhead Photocopy*-Film, Pelikan, Hannover) verwendet. Um die Anlagerung von Pellikelproteinen und Bakterien zu erleichtern, wurden die Folien mit Schleifpapier (4000er Körnung, Jean Wirtz, Düsseldorf) aufgeraut und nach dem Einpassen in die Kavität einer 6-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht) mittels einer Schablone im ethanolhaltigen (70 %) Ultraschallbad entfettet. Abschließend wurden die Folien bei 134 °C autoklaviert (Vacuklav 24, MELAG, Berlin) und danach auf Glasperlen mit einem Durchmesser von 1 mm in einer Petrischale (*Tissue Culture Disk*, 35 x 10 mm, Sarstedt, Nümbrecht) gebettet. Diese verhinderten als Abstandhalter das Verkleben der Polycarbonatfolien mit dem Gefäßboden und ermöglichten einen beidseitigen Zugang für im nächsten Schritt aufgebrauchte Pellikelproteine.

Ausbildung des Pellikels

Ein entscheidender Schritt zur Ausbildung eines Biofilms ist die vorherige Etablierung einer Pellikelschicht auf der Oberfläche. Um die Pellikelschicht im vorliegenden Fall auf der Polycarbonatoberfläche anzusiedeln, wurden die dazu notwendigen Proteine in Form von vorher gesammeltem Speichel gewonnen. Probanden kauten zur Anregung der Speichelsekretion mehrere Minuten auf Paraffinblöcken (CRT Paraffin, Ivoclar Vivadent, Ellwangen). Der in den ersten zwei Minuten gewonnene Speichel wurde verworfen, um Paraffin- oder Speisereste zu entfernen. Weiterer Speichel wurde in 50 ml Zentrifugierröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gesammelt und bei 6000 U/min für 20 Minuten zentrifugiert (Beckmann J2-21M/E Centrifuge, Beckmann, München). Der Überstand wurde mittels Sterilfilter mit einer Porenweite von 0,22 µm (*Stericup GP Express Plus Membrane*, Millipore, Schwalbach) filtriert. Die Sterilfiltrierung war notwendig, um die im Speichel vorhandenen Bakterien zu isolieren. Diese hätten die Einzelspezies-Biofilme bereits auf der Pellikelebene kontaminiert und die späteren Induktionsergebnisse verfälscht. Während nicht sofort benötigter Speichelüberstand bei -70 °C eingefroren wurde, wurde der andere Teil auf die vorbereiteten Polycarbonatfolien aufgebracht, die anschließend für 12 Stunden bei 37 °C im Brutschrank (Hereaus, Hamburg) inkubiert wurden, um die Bildung eines Pellikels zu ermöglichen. Danach wurde der Speichel mittels einer Absaugvorrichtung (*Vacusafe comfort*,

IBS, Fernwald) entfernt. Die Polycarbonatfolien konnten nun als Träger für einen Biofilm genutzt werden.

Anzucht der Biofilme

Der für die vorliegende Arbeit verwendete Bakterienstamm der *S. mitis*-Kulturen trägt die Bezeichnung DSM 8 und wurde dem Labor freundlichst von Frau Professor Kneist aus Jena zur weiteren Verwendung überlassen. Der Stamm für die *S. mutans*-Kulturen kommt aus den Beständen der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig). Er trägt die ATCC-Nummer 25175 bzw. DMS-Nummer 20523. Beide Stämme gehören der Risikogruppe 2 an.

Die Bakterien wurden als Flüssigkulturen angezüchtet. Das dazu verwendete BHI-Medium (BD, Heidelberg) wurde zuvor mit 0,1%igem Hefeextrakt (Merck, Darmstadt) angereichert und anschließend für 15 Minuten autoklaviert. Nach der Animpfung mit den Bakterien wurde die Kultur für die folgenden zwei bis drei Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach diesem Zeitraum war die bakterielle Suspension trüb und damit bereit für die Beimpfung der Polycarbonatfolien. Diese wurden mit 3 ml der Bakterienkultur bedeckt und in den folgenden 12, 24, 36 und 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Das vorhandene Bakteriennährmedium wurde alle 24 Stunden gewechselt. Jeder Ansatz wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die Abbildung 3-1 zeigt eine mit Biofilm überzogene Polycarbonatfolie direkt nach der Entnahme aus der Petrischale.



Abbildung 3-1: Mit Biofilm bewachsene Polycarbonatfolie. Die so hergestellten Einzelspezies-Biofilme wurden dann zur Stimulation von Epithelzellen verwendet.

3.2.2 Intraorale Anzüchtung natürlicher Biofilme

Neben Biofilmen aus Einzelspezies wurden natürliche, in der Mundhöhle gebildete Biofilme zur Stimulation genutzt. Dazu wurden jeweils drei Polycarbonatfolien wie oben beschrieben aufgeraut, sterilisiert, und dann in eine Trägerapparatur aus Kunststoff (DC PRESS V, Autompolymerisat, Prothesenkunststoff, Dental Central, Trittau) eingepasst (siehe Abbildung 3-2).



Abbildung 3-2: Trägerapparatur zur Aufnahme der Polycarbonatfolien

Dieser Träger wurde mittels Kieferorthopädie-Band (Dentaurum, Ispringen) intraoral platziert und für die folgenden 12, 24, 36 und 48 Stunden am Oberkiefer getragen, wobei sich die Folien in einem Abstand von 2 bis 3 mm zum Gaumen befanden. Für die Gewinnung der auf diese Weise intraoral hergestellten Biofilme konnten drei Probanden gewonnen werden. Nach der Entnahme aus der Trägerapparatur waren die Biofilme zur Stimulation von Epithelzellen verwendbar.

3.2.3 Mikrobiologische Analyse

Die mikrobiologische Zusammensetzung der Speichelproben und der angezüchteten Biofilme wurde durch ein Fremdlabor unter der Leitung von Dr. Wolfgang Falk analysiert. Dazu wurden die Folien in 1 ml Flüssignährboden Thioglykolat (Oxoid, Wesel) überführt und mittels Vortex-Mischer (IKA, Staufen) eine Bakteriensuspension hergestellt. Jeweils 100 µl dieser Suspension wurden auf folgenden Nährböden ausplattiert: Columbia-Blutagar (Oxoid, Wesel), Schokoladen-Agar mit Vitox (Oxoid, Wesel) und Haemophilus-Selektivagar (Oxoid, Wesel). Die ausplattierten Aliquots wurden unter aeroben Bedingungen, der Schokoladen-

Agar mit Vitox und Haemophilus-Selektivagar für 20 Stunden unter CO₂ bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bebrütet. Die Differenzierung der Spezies wurde anhand morphologischer und enzymatischer Reaktionen durchgeführt. Entsprechende Kolonien wurden auf Columbia-Blutagar isoliert und nach 20 Stunden Bebrütung bei 37 °C mittels Vitek 2 (bioMerieux, Nürtingen) bestimmt. Für die Spezies *Neisseria* und *Haemophilus* wurden keine Subspeziesidentifizierungen durchgeführt. Die Differenzierung erfolgte über Gram-Färbung (Merck, Darmstadt), Oxidase- (Oxoid, Wesel) und Katalase-Reaktion mittels 3%iger H₂O₂-Lösung (Merck, Darmstadt) sowie das „Ammon-Phänomen“ bei *Haemophilus*. *Capnocytophaga* wurde mittels Pigmentierung, wegen fehlender Katalase- und Oxidase-Reaktion sowie des Bedarfs an komplexen Wachstumsansprüchen auf Speziesebene bestimmt. Es wurden so mehr als zehn unterschiedliche Spezies festgestellt. Es handelte sich dabei hauptsächlich um frühe Plaquebildner. Die Ergebnisse wurden als die Anzahl von CFUs („colony forming units“) in einem Balkendiagramm dargestellt.

3.3 Zellbiologische Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden sogenannte HaCaT-Zellen als Modell für humane Epithelzellen genutzt. Dabei handelt es sich um eine humane, nicht-tumorigene Zelllinie, die spontan aus normalen humanen Keratinozyten durch Kultur bei erhöhter Temperatur und geringer Kalziumkonzentration entstand [149]. Für die Experimente wurden HaCaT-Zellen aus bestehenden Kulturen des Labors der Klinik für konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel übernommen.

3.3.1 Kultivierung der HaCaT-Zellen

Die Anzucht der Zelllinie erfolgte in 20 ml DMEM-Medium (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Cellconcepts, Umkirch), welches mit 10%igem fetalem Kälberserum (FCS, PAA GmbH, Linz) versetzt war. Um eine mikrobielle Kontamination der Zellkultur durch eventuelles Bakterienwachstum zu verhindern, wurden dem Medium 100 U/ml Penicillin, Amphotericin B (Biochrom AG, Berlin), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin), und als Nährzusatz 2 mM Glutamin (Biochrom AG, Berlin) zugesetzt. Die Kultivierung der HaCaT-Zelllinie erfolgte bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit CO₂-Begasung in 200 ml-Kulturgefäßen (Sarstedt, Newton). Das Wechseln des Nährmediums erfolgte alle zwei Tage nach vorhergehendem Waschen der Kultur mit Pufferlösung. Das hierbei verwendete Nährmedium wurde vorher auf 37 °C angewärmt.

3.3.2 Subkultivierung der Zellen

Eine Subkultivierung der adhärennten HaCaT-Zellen erfolgte alle 7 bis 10 Tage bei ca. 80%iger Konfluenz. Vor Ablösung der adhärennten HaCaT-Zellen vom Boden des Kulturgefäßes (*Tissue Culture Flask 25/75 ccm* Sarstedt, Nümbrecht) wurden diese vorher zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit 5 ml 0,05%iger Trypsin / 0,025%iger EDTA-Lösung (Gibco BRL, Eggenstein) inkubiert. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit im Brutschrank (Heraeus, Hanau) wurden die Zellen abgelöst. Das Ablösen der Zellen wurde durch Schwenken der Kulturflaschen unterstützt und zwischendurch unter dem Mikroskop überprüft. Anschließend wurde durch das Zugeben der gleichen Menge FCS-haltigen Mediums die enzymatische Proteolyse (des Trypsins) gestoppt. Nach mehrmaligem Resuspendieren der Zellen wurden diese bei 400 g für fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurden sie mit DMEM-Medium gewaschen und in sterile Kulturflaschen eingesät, beziehungsweise für anstehende Versuche in 6-Well-Kulturplatten (Sarstedt, Nümbrecht) verteilt.

3.3.3 Einfrieren und Auftauen von adhärennt wachsenden Zellen

Um den Fortbestand der Zellkulturen aufrecht zu erhalten, wurde jeweils die Hälfte der zur Konfluenz angezüchteten Zellen bei -70 °C eingefroren. Zu diesem Zwecke wurden die HaCaT-Zellen wie oben beschrieben mittels einer Trypsinlösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst und anschließend mit FCS-haltigem Medium gewaschen. Nach fünfminütigem Zentrifugieren (Centrifuge 5417 R/5810 R, Eppendorf, Hamburg) bei 400 g wurde der zellfreie Anteil des Nährmediums abpipettiert, und das Zellpräzipitat in 2,5 ml Einfriermedium suspendiert. Das Einfriermedium (*DMSO Freeze Medium*; Biochrom AG, Berlin) war mit 20 % FCS (Biochrom AG, Berlin) und 10 % des als Frostschutzmittel genutzten Dimethylsulfoxids (DMSO) versetzt. Die so präparierte Zellsuspension wurde anschließend bei -70 °C gelagert.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellsuspensionsröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Das zelltoxische DMSO musste möglichst schnell entfernt werden, weshalb die zehnfache Menge an FCS-haltigem, auf 37 °C erwärmtem Nährmedium zu den Zellen gegeben wurde. Nach dem Zentrifugieren für fünf Minuten bei 600 g und dem Dekantieren des Überstandes konnte das Zellpräzipitat in 37 °C warmem Medium in die Zellkulturflasche zur Anzucht gegeben werden.

3.3.4 Stimulation der HaCaT-Zellen durch den Biofilm

Bei der Versuchsanordnung zur Stimulation der Epithelzellen wurden Erkenntnisse aus vorhergehenden Studien und Experimenten genutzt. So hatten Vorversuche [57] eine optimale Stimulationszeit von vier Stunden ergeben. Zudem war bereits bekannt, dass für eine Stimulation ein direkter Zell-zu-Zell-Kontakt von Pathogen und Epithelzelle nicht erforderlich war [164, 165], weil die Induktionswirkung auf von Bakterien freigesetzte Stoffwechselprodukte, wie zum Beispiel Lipoteichonsäure [24], zurückzuführen war. Ein Abstand von 500 μm zwischen Pathogen und Epithelzelle wurde als ausreichend beschrieben [57].

In der vorliegenden Arbeit wurden zur modellhaften Darstellung einer Epithelzellschicht HaCaT-Zellen in 6-Well-Platten bis zur Konfluenz angezchtet. Auf dieser Zellschicht wurde - durch einen 500 μm starken, biokompatiblen, kieferorthopädischen Draht (KfO-Draht, Dentaurem, Ispringen) getrennt - ein separat generierter Biofilm aufgebracht (siehe Abbildung 3-3).

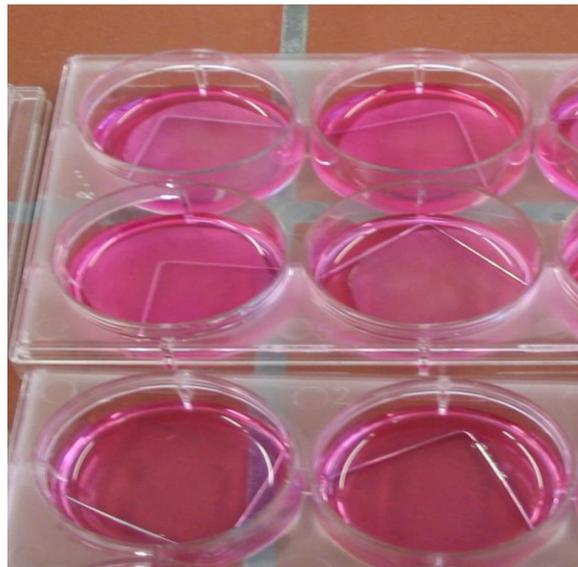


Abbildung 3-3: Inkubation der Epithelzellen

Die Biofilme wurden vor der Stimulation zweimal mit PBS-Puffer gespült. So wurde verhindert, dass sich nur schwach am Biofilm haftende Bakterien lösen konnten. Diese hätten durch den direkten Zell-zu-Zell-Kontakt mit den Epithelzellen das gesamte Stimulationsergebnis verfälscht. Die Stimulation erfolgte in serumfreiem Medium (DMEM; Biochrom, Berlin), um die eventuelle zusätzliche Stimulation der HaCaT-Zellen durch Serumkomponenten zu verhindern. Darüber hinaus musste auf den Einsatz von antibiotikafreiem Medium für die Stimulationsexperimente geachtet werden. Selbst im für das Experiment günstigsten Fall einer Resistenz der Bakterien gegen genau diese Antibiotika

würden die Bakterien des *in vitro* bzw. intraoral generierten Biofilms völlig anders reagieren als Biofilmbakterien in der (unter physiologischen Umständen antibiotikafreien) Mundhöhle. Wahrscheinlicher wäre die rasche Lyse der Bakterien, die komplette Zersetzung des Biofilms und damit eine Stimulation der Epithelzellen nicht mehr - wie angestrebt - durch einen Biofilm, sondern durch frei bewegliche Abbauprodukte, die dann darüber hinaus in direktem Zell-zu-Zell-Kontakt mit der Epithelschicht stünden.

Zu Kontrollzwecken wurde das zum Waschen der mit Bakterien bewachsenen Folien benutzte PBS-Medium gesammelt und für eine weitere Stimulation der Epithelzellkulturen benutzt. Weiterhin wurden 2 Kavitäten der 6-Well-Platte unstimuliert belassen und als Mediumkontrolle geführt. Eine Folienkontrolle wurde mit einer nur mit dem Pellikel bewachsenen Folie durchgeführt.

Für jeden Zeitpunkt nach Beginn der Anzucht der Biofilme (12, 24, 36, 48 Stunden) wurden also folgende Stimulationsversuche durchgeführt:

- 2 Einzelspezies x 3 Biofilme,
- 3 Probanden x 3 intraoral gebildete Biofilme,
- 1 x eine Kontrolle mit PBS-Medium, das zum Abspülen der Biofilmfolien vor der Stimulation genutzt wurde,
- 2 Mediumkontrollen und
- 1 Pellikelkontrolle.

Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden die Biofilme entfernt und die Epithelzellen dreimalig mit PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Epithelzellen lysiert, um ihre RNA extrahieren zu können.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Vor Extraktion der RNA wurde das Inkubationsmedium abgegossen und die Zellen dreimal mit PBS gespült. Anschließend wurde die Extraktion der gesamten RNA mit dem *RNeasy Total RNA Kit* der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Im Folgenden genannte Abkürzungen wie RLT, RW1 und RPE beziehen sich auf Komponenten dieses Kits. Es wurden je 350 µl RLT-Puffer + 3,5 µl 2-Mercaptoethanol (β-ME) (Sigma, Taufkirchen) in ein Well gegeben, und die Zellen mit Hilfe eines sog. *Cell Scrapers (Disposable Cell Scraper*, Sarstedt, Nümbrecht) abgelöst. Weiterhin wurden 350 µl 70%iges Ethanol (Sigma,

Taufkirchen) dazu pipettiert. Unterstützt wurde das Ablösen und die Lyse der Zellen durch wiederholtes Auf- und Abziehen mit der Pipette, wobei sich ein homogenes Zell-Lysat bildete. Nach dem Homogenisieren des Zell-Lysats wurde dieses in ein *RNeasy mini column* Zentrifugierröhrchen (*Spin Tube* 50 µl, Qiagen, Hilden) pipettiert. Die *Spin Tubes* wurden bei 10000 U/min für 21 Sekunden zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Eluat abgegossen und 700 µl des Puffers RW1 pro *Spin Tube* hinzugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren bei 10000 U/min für 21 Sekunden und Abgießen des Eluats, wurden 500 µl RPE pipettiert, für 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert und das Eluat erneut abgegossen. Dieser letzte Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Das auf diese Weise entstandene RNA-Präzipitat wurde zusammen mit jeweils 50 µl RNase-freiem Wasser in neue Eppendorf-*Tubes* pipettiert, die dann bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C eingefroren wurden.

3.4.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die extrahierte RNA wurde zur weiteren Verwendung in DNA umgeschrieben. Dazu wurden jeweils 8 µl mRNA, 1 µl Oligo(dT)-*Primer* (20 mM) und 1 µl DNTP (10 mM) in einem 50 µl *Spin Tube* auf Eis zusammengegeben. Zur Aufhebung der mRNA-Sekundärstruktur wurde der Ansatz für 5 Minuten im *Thermocycler* (Tpersonal, Biometra, Göttingen) auf 65 °C erhitzt und anschließend wieder auf 4 °C gekühlt. Nach 5 Minuten wurden 10 µl eines *Mastermix*' zugesetzt, der sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

- 2 µl 5x Reaktionspuffer
- 4 µl MgCl₂ (25mM)
- 2 µl DTT 0,1 M
- 1 µl RNase out
- 1µl *SuperScript II Reverse Transkriptase*

Während der folgenden, 50-minütigen Erwärmung auf 42 °C erfolgte die eigentliche reverse Transkription, das heißt das Umschreiben von RNA in cDNA („*complementary desoxyribonucleinacid*“). Danach wurde die Lösung auf 70 °C erhitzt, um die Transkriptase zu inaktivieren. Erneut wurde der Ansatz auf 4 °C gekühlt. Nach dem Zusatz von 1 µl RNase H wurde die Lösung auf 37 °C erwärmt, so dass das Enzym die RNA des RNA:DNA-Hybridstrangs abbauen konnte. Die cDNA-Probe wurde dann bei - 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im vorhergehenden Schritt war die mRNA, also die Matrize zur Herstellung aller von der Zelle im Moment der Lyse produzierten Proteine, in cDNA umgeschrieben worden. Im nun folgenden Schritt sollte überprüft werden, ob die mRNA bestimmter antimikrobieller Peptide in der Zelle produziert wurde. Dazu sollten entsprechende Abschnitte der aus der mRNA entstandenen cDNA soweit amplifiziert werden, dass sie unter UV-Beleuchtung in einem Agarosegel sichtbar gemacht werden konnten.

Die Amplifikation erfolgte mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Bezeichnung der Methode erklärt sich durch die Verwendung einer temperaturstabilen DNA-Polymerase (synonym Taq-Polymerase), die in aufeinander folgenden Durchgängen sowohl den ursprünglich vorhandenen, spezifischen cDNA-Abschnitt, als auch alle in vorhergehenden Durchgängen erstellten DNA-Kopien dieses Abschnitts jeweils verdoppelt (Kettenreaktion). Die Kombination von Reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion, wie sie hier zum Nachweis spezifischer mRNAs genutzt wurde, wird mit 'RT-PCR' abgekürzt. Die dazu verwendete Taq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) ist hitzestabil, da sie dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (daher: 'Taq') entnommen wurde. Dadurch ist es der Taq-Polymerase möglich, trotz der starken Temperaturschwankungen, wie sie im Falle der PCR auftreten, zu funktionieren, ohne zu denaturieren. Die Markierung des gewünschten cDNA-Abschnitts geschieht durch die Verwendung zweier Oligonukleotide („*primer*“), die sich aufgrund ihrer spezifischen Nukleotidsequenz am Start- und Endpunkt des zu amplifizierenden cDNA-Abschnitts anlagern. Von ihnen ausgehend, kann die Polymerase die Fehlstelle zwischen beiden *Primern* mit in Lösung verfügbaren Nukleotiden auffüllen und diese zu einem eigenen DNA-Strang verbinden. Dieser Vorgang wird als Elongation bezeichnet. Bei der anschließenden Denaturierung werden die hybridisierten DNA-Stränge durch eine Temperaturerhöhung getrennt, so dass sich im nächsten Schritt an beide DNA-Stränge erneut *Primer* anlagern, und jeden DNA-Strang jeweils für eine erneute Verdopplung markieren. Der Vorgang der PCR findet in einem *Thermocycler* (*Mastercycler Gradient*, Eppendorf, Hamburg oder *Biometra T-Personal*, Whatman Biometra, Göttingen) statt, in dem in zyklischer Abfolge Denaturierung, *Primer*-Anlagerung und Elongation des Stranges ablaufen. So kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des durch den *Primer* selektierten DNA-Abschnittes. Im vorliegenden Fall wurde die PCR durchgeführt, um die mRNA-Expression für hBD-2, RNase-7, Psoriasisin (PSO), Interleukin 8 (IL-8), 5-Lipoxygenase (5-LO) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) semiquantitativ zu analysieren. GAPDH ist ein an der Glykolyse beteiligtes Protein und kommt

dementsprechend in nahezu allen Zellen in fast gleichen Mengen vor. Das entsprechende Gen wird deswegen auch als 'Haushaltsgen („*housekeeping gene*“) bezeichnet. Aufgrund seiner stetigen Expression eignet es sich zur Überprüfung des Vorhandenseins von cDNA und der korrekten Funktion der PCR. Außerdem wird dessen Expressionsstärke bei der Analyse der Expression der anderen Gene als eine Art Basislinie gesetzt werden, damit die Expressionsstärken verschiedener Gene von Zellen in verschiedenen *Wells* mit verschiedenen Stimulatoren über verschieden lange Zeitdauer miteinander verglichen werden können.

Zur Vorbereitung der PCR wurden 1 µl cDNA-Lösung mit 48,5 µl eines *Mastermix*' gemischt. Dieser bestand mehrheitlich aus folgenden Komponenten des *Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Karlsruhe): 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 µl MgCl₂ (50 mM), 5 µl dNTP (2 mM, GE Healthcare, München), 0,25 µl Tag DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe), 0,25 µl *forward-Primer* für GAPDH, 0,25 µl *reverse-Primer* für GAPDH, 2 µl *forward-Primer* und 2 µl *reverse-Primer* für das zu untersuchende Protein, 31,75 µl RNase-freies H₂O. Dazu kamen jeweils eine Positivkontrolle (*Mastermix* mit *Primern* für GAPDH) und eine Negativkontrolle (*Mastermix* ohne cDNA).

Der Amplifikationsvorgang wurde mit folgenden Schritten durchgeführt:

- 1.) Denaturierung der cDNA bei 95 °C für 30 Sekunden.
- 2.) Sequenzspezifische Anlagerung der Primer an die cDNA bei geeigneter *Annealing*-Temperatur (siehe Tabelle 3-1) für 30 Sekunden.
- 3.) Elongation bei 72 °C für 1 Minute.

Nach dem 25-fachen (alle außer hBD2) oder 30-fachen (für hBD2) Durchlaufen der Schritte 1 - 3 fand eine finale Elongation bei 72 °C für 10 Minuten statt. Anschließend wurden die Ansätze bis zur Entnahme bei 4 °C im *Thermocycler* aufbewahrt.

Tabelle 3-1: Nukleotidsequenzen (5'-3') und *Annealing*-Temperaturen der intronüberspannenden *Primer*.

Produkt	Primer-Kurzname	Basensequenz (5' nach 3')	<i>Annealing</i>-Temperatur
GAPDH	GA1	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	60°C
	GA2	CCAAGCCGAGCCACATCGCTC	
Interleukin-8	IL-8 Forw	CTTTCAGAGACAGCAGAGCAC	60°C
	IL-8 Rev	ACTGTGAGGTAAGATGGTGGC	
Oligo-dT	Oligo (dT)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT	42°C
hBD-2	hBD-2 fA	CCAGCCATCAGCCATGAGGGT	60°C
	hBD-2 rA	GGAGCCCTTTCTGAATCCGCA	
5-Lipoxidase	5-LO	CCGCTTCATGCACATGTTCCAG	62°C
	5-LO	GCAGCCAGGAACTGGTGTGTAC	
Psoriasis	PSO 1	TTCTTCTACTCGTGACGCTTC	62°C
	PSO 2	CTCTGCTTGTGGTAGTCTGTG	
RNase-7	S2-31	GGAGTCACAGCACGAAGACCA	60°C
	S2-33 rev	CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA	

3.4.4 Gelelektrophorese

Nach der Amplifikation sollten die in der RT-PCR amplifizierten Fragmente in einem Agarosegel bezüglich ihrer Größe analysiert werden. Zur Herstellung des 1,7 %igen Agarosegels („*weight/volume*“) wurden 1,7 Gramm Agarose (SeaKem LE Agarose, Cambrex, Charles City) in 100 ml TAE-Puffer (Qiagen, Hilden) gegeben und mittels Kochplatte (*Topline 2000*, Rommelsbacher) auf 100 °C erhitzt. Im Abkühlungsprozess wurde für die spätere Betrachtung unter UV-Licht das Agarosegel mit Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen) versetzt, was aufgrund der Toxizität des Ethidiumbromids unter dem Abzug geschah. Die Flüssigkeit wurde in eine Gelkammer überführt. Ein dann eingesteckter Kamm bildete Geltaschen im sich verfestigenden Agarosegel aus. Nach Entfernung des Kamms und Positionierung des Gels im Elektrophoresebad (*Electrophoresis Apparatus Horizon 11-14*, Whatman Biometra, Göttingen) wurde dieses mit TAE-Puffer aufgefüllt, so dass das Gel knapp bedeckt war. Daraufhin wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 5 µl des GAPDH-PCR-Produktes mit 2 µl Laufpuffer (Brom-Phenol-Blau, Formamid, EDTA, Merck, Darmstadt) gemischt, fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Zur späteren Orientierung der erhaltenen Gelbanden wurde ein 100 bp DNA-Marker (*TrackIt 100 bp*

DNALadder, Invitrogen, Karlsruhe) als Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Produkte der PCR wurden bei einer Spannung von 100 bis 120 Volt im TBE-Puffer aufgetrennt, was etwa 45 Minuten dauerte. Die unter UV-Licht (Transilluminator TI 1, Whatman Biometra, Göttingen) als Banden sichtbaren Ergebnisse wurden mit einer Digitalkamera (*Canon Power Shot A561*, Canon, Tokio) dokumentiert. Die Abbildung 3-4 zeigt ein typisches Ergebnis einer solchen Analyse.

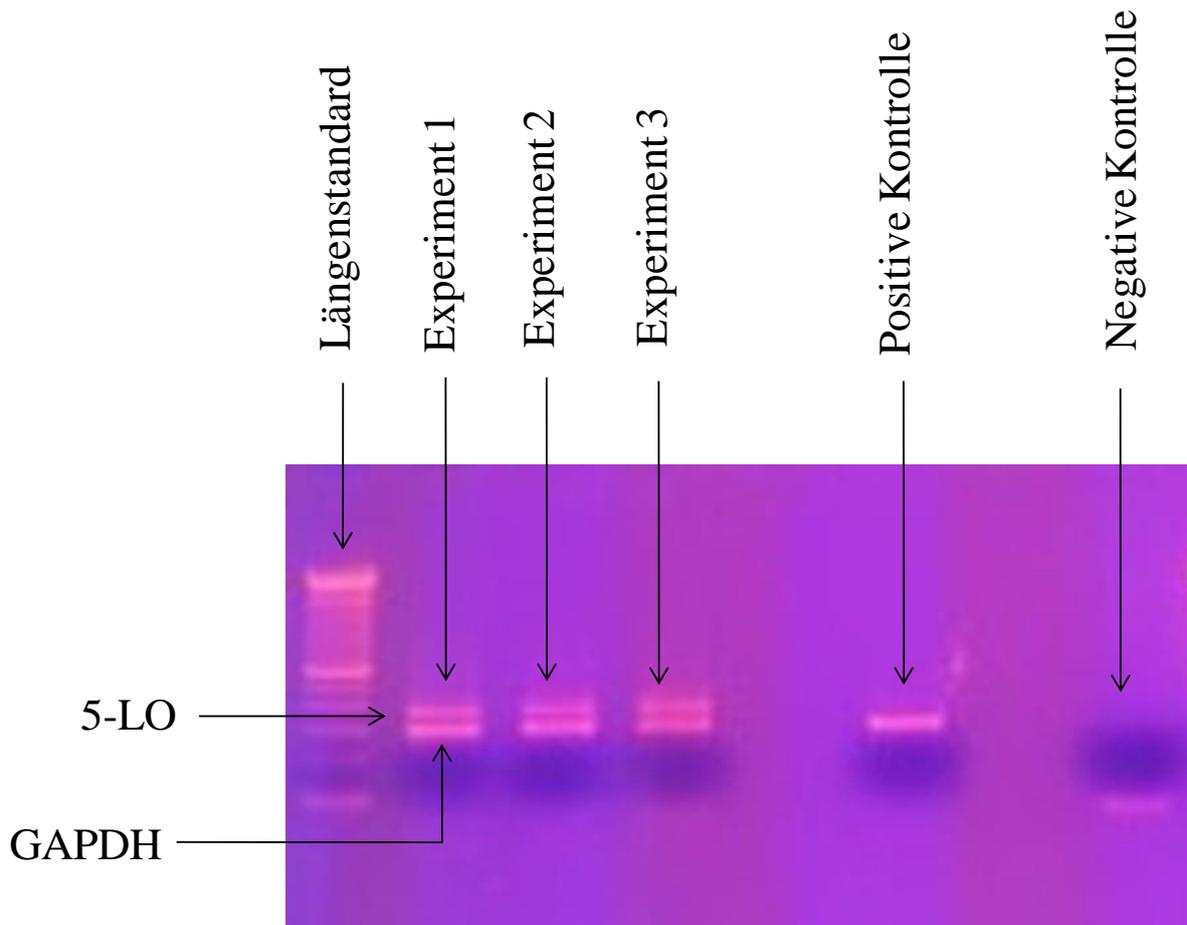


Abbildung 3-4: Ergebnis einer Analyse von RT-PCR-Produkten nach Auftrennung im Agarosegel.

3.4.5 Auswertung der Gelelektrophorese

Auf den Digitalfotos der Agarosegele konnten die einzelnen Banden mithilfe eines Längenstandards den gesuchten Fragmenten zugeordnet werden. Die Farbintensität, das heißt der Tonwert der Bande insgesamt, wurde als Maß für die Menge des amplifizierten Fragments, und damit für die Menge der initial vorhandenen mRNA des gesuchten Proteins angenommen. Zur Ermittlung eines entsprechenden Zahlenwerts wurden die entsprechenden Stellen des Fotos mit der *Software Corel Draw* (Version 9, Corel Corporation, Ottawa,

Kanada) isoliert und in Graustufen mit einer Informationstiefe von 16 Bit umgewandelt. Die Graustufen waren notwendig, um die Banden densitometrisch auswerten zu können. Das Prinzip der Densitometrie ist eine quantitative Messung der Farbdichte, das heißt Farbmenge pro Flächeneinheit. Hierbei werden Tonwerte, jedoch keine Farbtöne bestimmt. Die densitometrische Messung wurde mit dem Bildanalyseprogramm *Image-J* (<http://www.rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) durchgeführt. Über den Menüpunkt „*Analyze Gels*“ ließen sich die Farbdichten der Banden graphisch als Kurven darstellen (siehe Beispiel in Abb. 3-5).

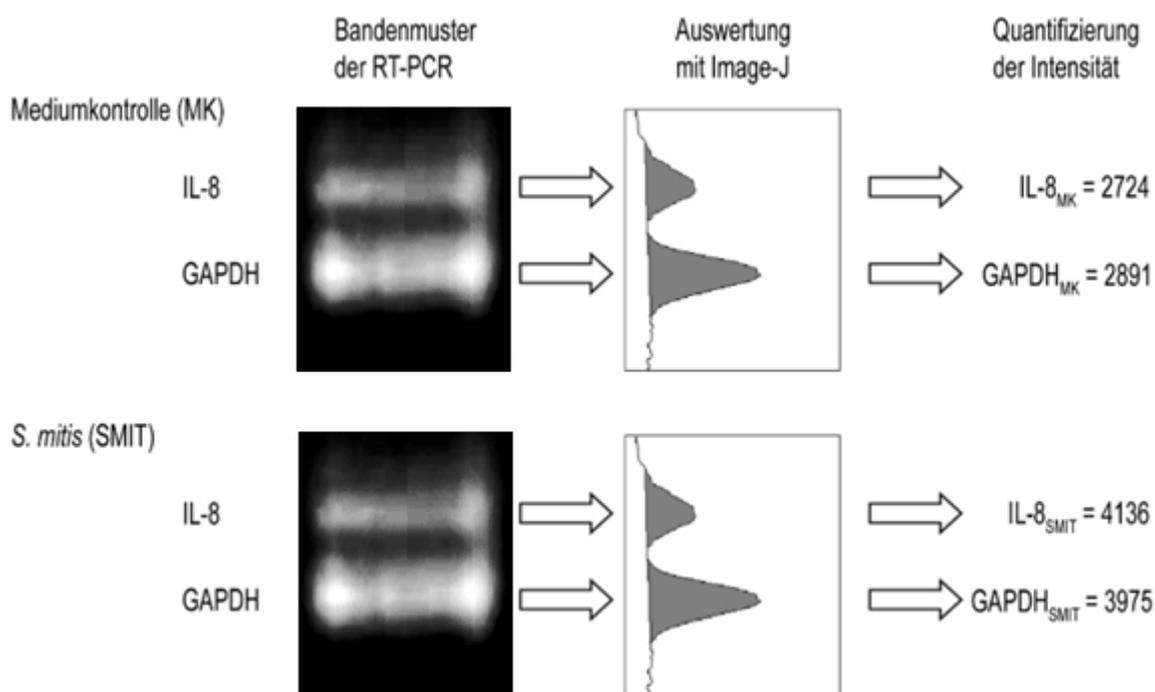


Abbildung 3-5: Schema zur Quantifizierung der PCR-Bandenintensität im Beispiel. Die Banden im Digitalfoto des Agarosegels („Bandenmuster der RT-PCR“) wurden mittels der *Software Image-J* erfasst und ihre Intensitätsverteilung bestimmt. Die Integration der Intensitätsverteilung (grau eingefärbte Flächen in „Auswertung mit *Image-J*“) führte zu einem Zahlenwert, der die Intensität quantifizierte. Die Abbildungen 3-5 und 3-6 wurden erstellt und freundlichst überlassen durch Dr. L. Marischen, Bad Homburg.

Die Flächenmaße unter den Kurven der Intensitätsverteilung wurden durch das Programm errechnet und automatisch in Tabellen dargestellt. Die so erhaltenen numerischen Werte stellten Absolutwerte der Bandenintensität auf dem Agarosegel dar. Da es sich bei den Stimulationswerten jedoch um Relativwerte handelt, musste ein Standardwert festgelegt werden, der mit den ermittelten Werten ins Verhältnis gesetzt wurde. Als Standard wurde hierfür die Bande der GAPDH der unstimulierten Kontrolle festgelegt. Dieser Standardwert wurde in Bezug zu den Intensitäten der Banden der GAPDH der stimulierten Proben und in

Bezug zu den Intensitäten der Banden der untersuchten Zielgene gesetzt. Der resultierende Zahlenwert beschrieb die relativ zur Mediumkontrolle veränderte Intensität der Bande und damit Änderung der Expression eines gesuchten Gens (siehe Beispiel in Abb. 3-6).

Zur Ermittlung der Induktionswerte:

	Mediumkontrolle		<i>S. mitis</i>	
gemessen sei:	IL-8 _{MK} = 2724		IL-8 _{SMIT} = 4136	
	GAPDH _{MK} = 2891		GAPDH _{SMIT} = 3975	

Vereinfacht wird angenommen, dass jede Zelle unabhängig von einer Stimulation eine identische Expression des Haushaltsgen GAPDH aufweist. Ein durch die Stimulation der Zellen vermeintlich veränderter GAPDH_{SMIT}-Wert kann auf Zellproliferation oder eine verändert abgelaufene RT-PCR zurückgeführt werden. Beide Effekte dürfen bei der Untersuchung der Expression von Zytokinen oder AMPs herausgerechnet werden. Der GAPDH_{SMIT}-Wert kann demzufolge auf das Niveau des GAPDH_{MK}-Wertes zurückgerechnet werden.

$$\ast \frac{\text{GAPDH}_{\text{MK}}}{\text{GAPDH}_{\text{SMIT}}} = 0,73$$

Der entsprechende IL-8_{SMIT}-Wert wird anschließend identisch behandelt ...

$$\text{GAPDH}_{\text{SMIT (zurückgerechnet)}} = \text{GAPDH}_{\text{MK}} = 2891$$

$$\text{IL-8}_{\text{SMIT (zurückgerechnet)}} = 3008$$

...und kann dann zum IL-8_{MK}-Wert der Mediumkontrolle ins Verhältnis gesetzt werden:

$$\frac{\text{IL-8}_{\text{SMIT (zurückgerechnet)}} = 3008}{\text{IL-8}_{\text{MK}} = 2724} = 1,104 = \text{Induktionswert}$$

Als Ergebnis erhält man den Induktionswert für die IL-8-Expression nach Stimulation mit *S. mitis*. Weil dieser Wert größer als 1 ist, handelt es sich in diesem Beispiel um eine verstärkte Expression.

Abbildung 3-6: Ermittlung der Induktionswerte im Beispiel. Aus den Induktionswerten von drei Versuchen wurde ein Mittelwert gebildet und - im Ergebnisteil - grafisch dargestellt.

3.5 *Statistische Auswertung*

Zur Ermittlung der Induktionswerte der mRNA von hBD-2, PSO, RNase-7, 5-LO und IL-8 wurden Epithelzellen mit Einzelspezies-Biofilmen aus *S. mutans* bzw. *S. mitis* zu vier verschiedenen Inkubationszeiten (12, 24, 38 und 48 h) stimuliert. Zu jedem Inkubationszeitpunkt erfolgte außerdem die Stimulation mit drei natürlichen Biofilmen, die aus dem Speichel dreier Probanden generiert worden waren. Jede Messung wurde als Triplikat durchgeführt. Differierte ein Wert des Triplikats von den beiden anderen um mehr als den Faktor 10, so wurde er nicht berücksichtigt. Differierte der höchste Wert um mehr als den Faktor 10 vom niedrigsten, so wurde der Wert gestrichen, der am stärksten vom mittleren Wert abwich. Aus den drei, oder nach Streichung eines Wertes nur noch zwei Werten wurde ein Induktionsmittelwert gebildet. Die Ergebnisse finden sich einschließlich errechneter Standardabweichungen in Kapitel 4. Die aus verschiedenen Stimulationen erhaltenen Induktionswerte über die Zeit wurden als Graphen in einem Diagramm miteinander verglichen. Die Unterschiede zwischen den Graphen/Messreihen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz untersucht.

Beim Kruskal-Wallis-Test handelt es sich um einen sogenannten Rang-Summen-Test. Dabei werden die einzelnen Werte **aller** zu vergleichenden Messreihen entsprechend ihres Zahlenwertes mit einem Rang versehen. Der erste Rang (in der vorliegenden Studie: Nr. 1) wird dem niedrigsten Wert zugeordnet, der letzte (in der vorliegenden Studie: Nr. 12) dementsprechend dem höchsten. Anschließend werden die Werte mit ihren Rängen entsprechend ihrer Herkunft gruppiert: Der Wert, der aus der Stimulation mit dem Einzelspezies-Biofilm *S. mitis* stammt, wird der „*S. mitis*-Gruppe“ zugeordnet, der aus der Stimulation mit dem *S. mutans*-Biofilm der „*S. mutans*-Gruppe“ usw. Aus den Werten für die Ränge innerhalb einer Gruppe wird ein Mittelwert gebildet. Je weiter die Mittelwerte der Ränge der einzelnen Gruppen auseinander liegen, und je weniger die Rangwerte der einzelnen Messungen in einer Gruppe voneinander und von ihrem Mittelwert abweichen, (das heißt umgekehrt: je eher sie eine fortlaufende Zahlenreihe bilden), desto wahrscheinlicher ist mindestens **ein** Unterschied **zwischen allen drei Messreihen** signifikant. Das bedeutet, dass selbst dann, wenn zwei der Messreihen untereinander **keinen** signifikanten Unterschied aufweisen, die dritte Messreihe sich aber in ihren Werten signifikant von den anderen beiden unterscheidet, liefert der Kruskal-Wallis-Test einen p-Wert $< 0,05$ (siehe Abb. 4-10 für ein Beispiel).

4 Ergebnisse

4.1 *Analyse der mikrobiologischen Zusammensetzung von Speichel und Biofilmen*

4.1.1 Zusammensetzung des Speichels

Der Speichel dreier Probanden stellte das Ausgangsmaterial für die zu erstellenden natürlichen Biofilme dar. Der Vergleich der mikrobiologischen Zusammensetzungen von Speichel und Biofilmen sollte Hinweise erbringen, inwieweit die gezüchteten Biofilme der natürlichen Situation in der Mundhöhle entsprachen. Wie in den Abbildungen 4-1 bis 4-3 zu sehen, variierten Art und Häufigkeit der vorgefundenen Spezies von Proband zu Proband erheblich.

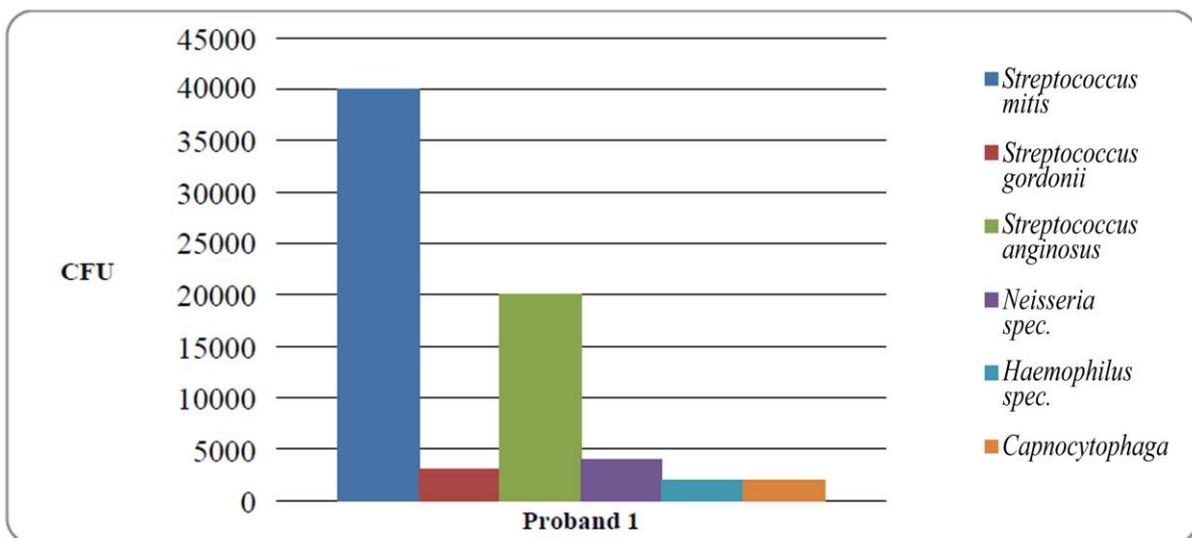
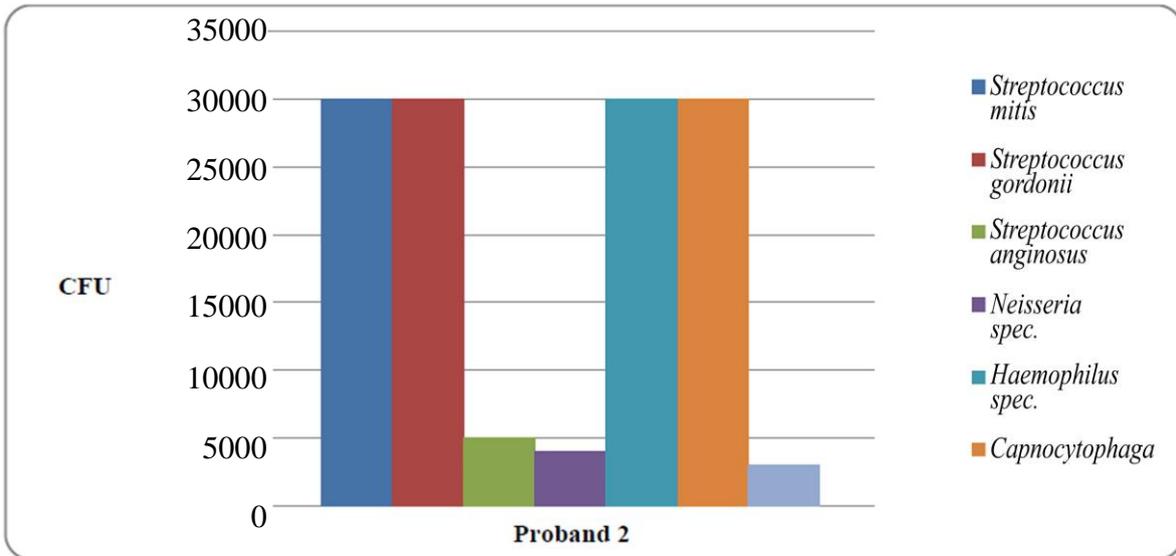
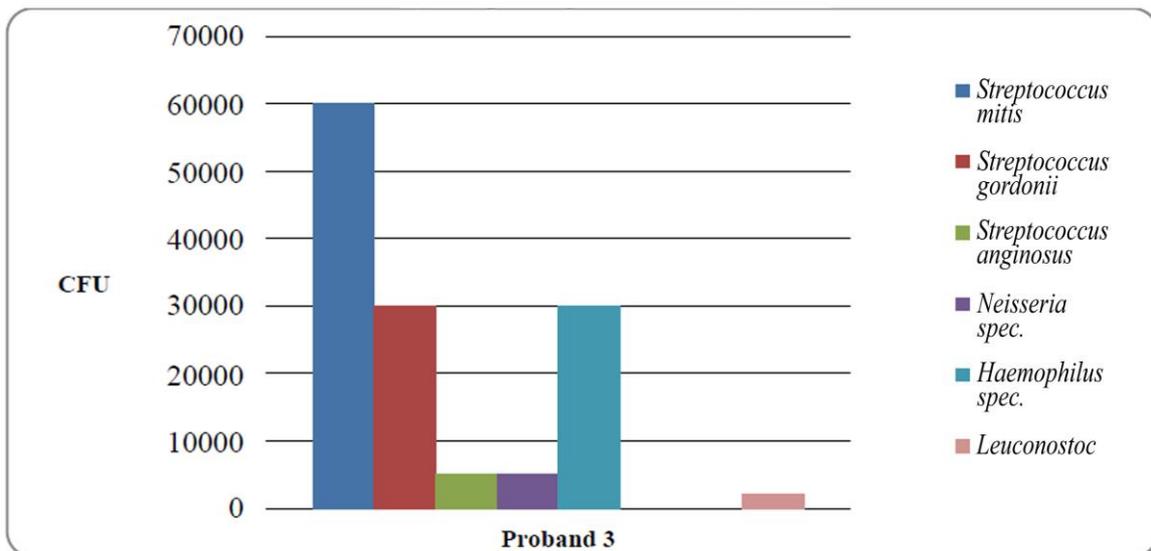


Abbildung 4-1: Mikrobiologische Speichelzusammensetzung Proband 1
(Mengenangaben in „colony forming units“ (CFU))



**Abbildung 4-2: Mikrobiologische Speichelzusammensetzung Proband 2
(Mengenangaben in CFU)**



**Abbildung 4-3: Mikrobiologische Speichelzusammensetzung Proband 3
(Mengenangaben in CFU)**

S. mitis fand sich in den Speichelproben aller drei Probanden in unterschiedlichen Konzentrationen, *S. mutans* hingegen in keiner der untersuchten Speichelproben. In den Speichelzusammensetzungen aller Probanden konnten die Keime *Haemophilus species*, *Neisseria species*, *S. gordonii* und *S. anginosus* nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von *Capnocytophaga* wurde bei den Probanden 1 und 2 gezeigt, der Speichel von Proband 3 enthielt exklusiv *Leuconostoc*.

4.1.2 Zusammensetzung der natürlich gezüchteten Biofilme

Die mikrobiologischen Zusammensetzungen der Biofilme wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach ihrer Anzucht untersucht. Sie unterschieden sich von Proband zu Proband deutlich (s. Abb. 4-4 bis 4-6). Der Erreger *S. mutans* wurde in keinem der natürlich gewachsenen Biofilme nachgewiesen. Im Gegensatz dazu war *S. mitis* in den Biofilmen aller Probanden über alle Zeitstufen zu finden. Außerdem konnten auf den Polycarbonatfolien *Haemophilus spec.*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *Neisseria spec.* sowie *Capnocytophaga* nachgewiesen werden. Diese Keime gelten als feste Bestandteile der dentalen Plaque.

Im Hinblick auf die zeitliche Entwicklung der Biofilmmzusammensetzung war die Abnahme der Besiedelung mit *S. mitis* bei Proband 1 und 3 augenfällig. Beispielsweise wurde für Proband 1 die Bakterienanzahl mit $1,3 \times 10^5$ (12 h), $1,4 \times 10^5$ (24 h), $0,6 \times 10^5$ (36 h) und $0,6 \times 10^5$ (48 h) CFU ermittelt. *S. gordonii* trat ab einem Alter des Biofilms von 24 Stunden bis 48 Stunden bei Proband 1 konstant auf. Im Fall des Probanden 3 fand sich ab den Zeitstufen 36 und 48 Stunden nur noch *S. mitis* auf den Folien.

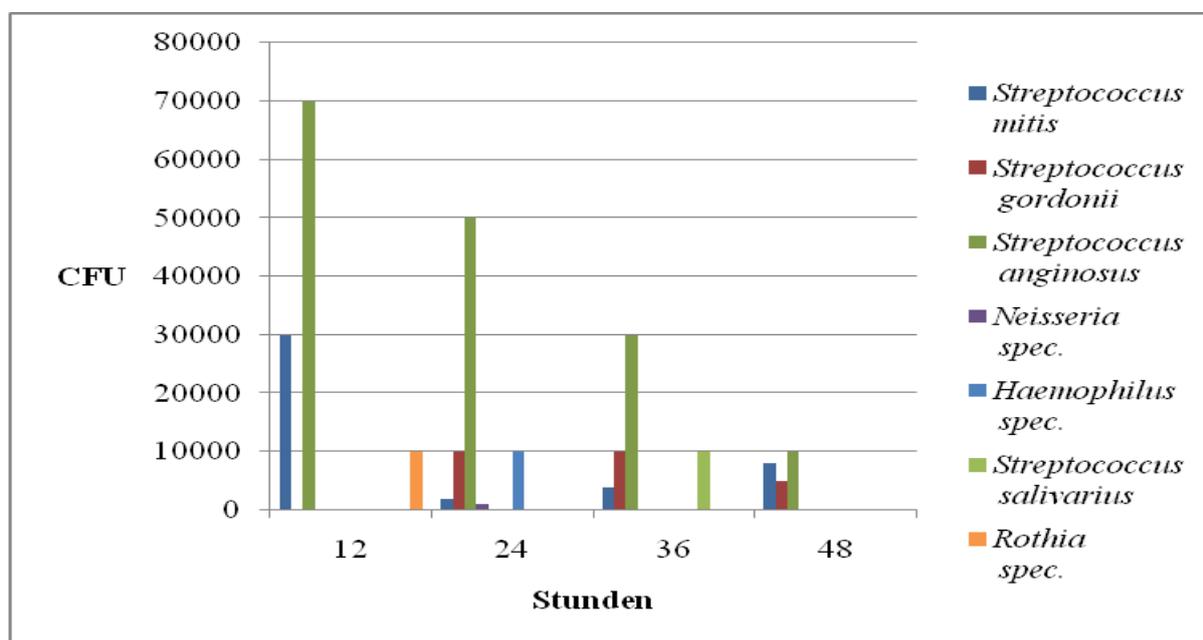


Abbildung 4-4: Biofilmmzusammensetzung Proband 1 (Mengenangaben in CFU)

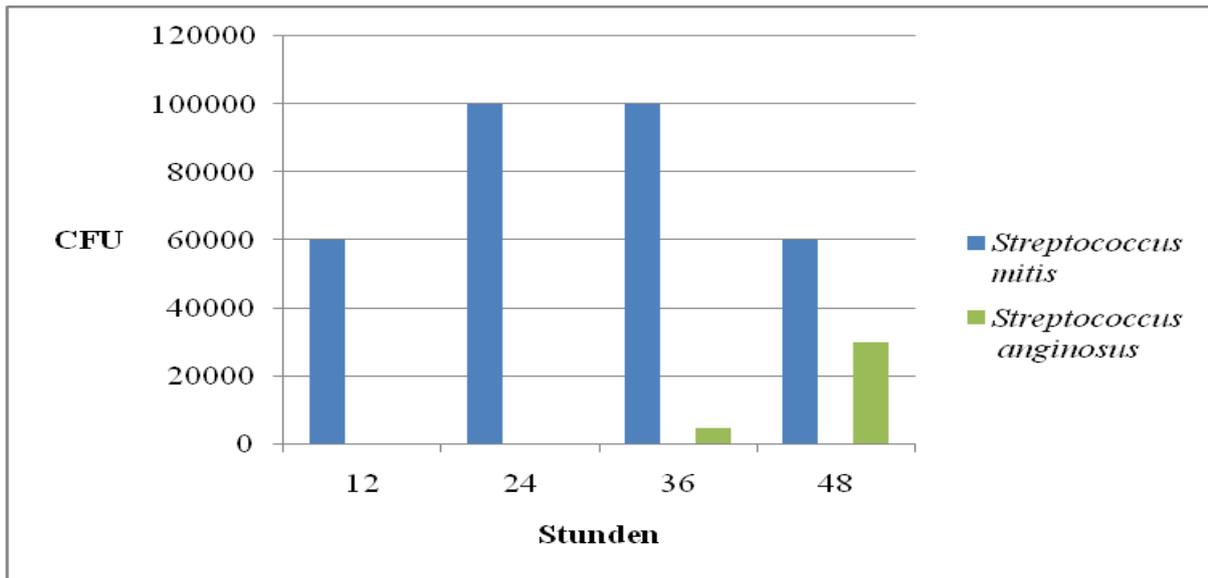


Abbildung 4-5: Biofilmzusammensetzung Proband 2 (Mengenangaben in CFU)

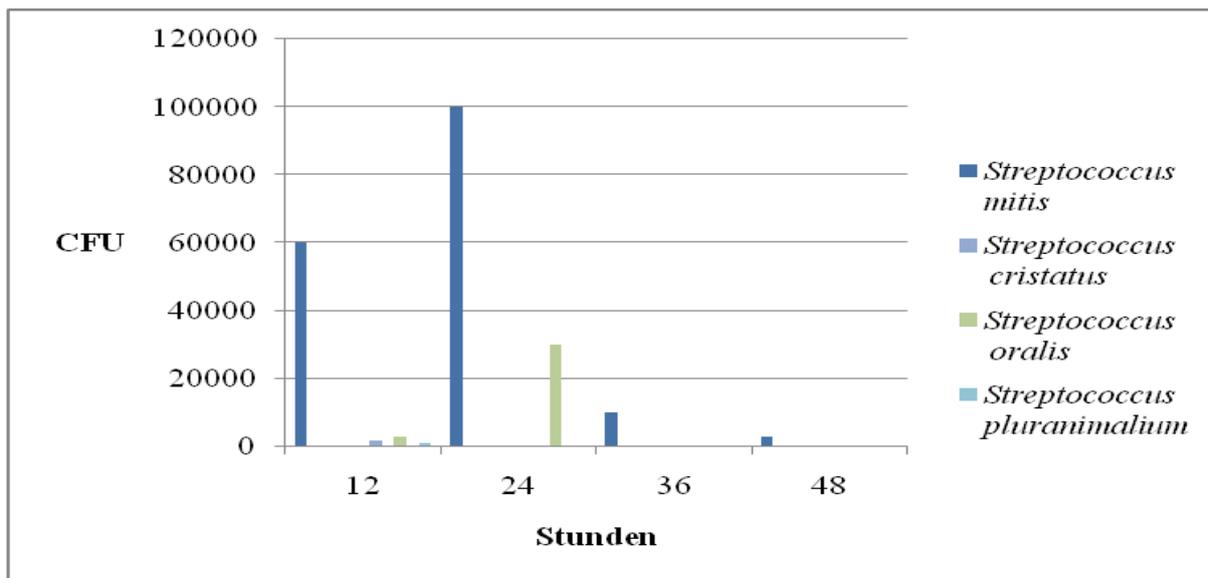


Abbildung 4-6: Biofilmzusammensetzung Proband 3 (Mengenangaben in CFU)

Für die *in vitro* hergestellten Kulturen von *S.mitis* und *S.mutans* ergab die quantitative Analyse $1,8 \times 10^5$ CFU für die unterschiedlichen Zeitstufen. Die Biofilme wurden zur Stimulation von Epithelzellen zur Expression von antimikrobiellen Peptiden und immunmodulatorischen Molekülen durch Epithelzellen genutzt.

4.2 *Expression von antimikrobiellen Peptiden nach Stimulation mit Biofilmen*

4.2.1 hBD-2

Die Expression von hBD-2 durch unstimulierte und mit intraoral und *in vitro* hergestellten Biofilmen stimulierter Epithelzellen wurde mittels semiquantitativer PCR untersucht. Dabei wurde die Expression stimulierter zur Expression unstimulierter Epithelzellen - wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben - ins Verhältnis gesetzt. Die damit errechneten Induktionswerte wurden in den Tabellen 4-1 und 4-2 sowie in Abb. 4-10 dargestellt.

Tabelle 4-1: Induktionswerte der Expression von hBD-2 relativ zur Expression von GAPDH durch Epithelzellen nach Stimulation mit natürlich gebildeten Biofilmen. Grau unterlegte Werte wurden nicht berücksichtigt.

	Biofilm	natürliche Plaque								
		1			2			3		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
12 h	Einzelwerte	3,25	2,97	0,49	0,58	0,85	0,74	0,57	0,91	0,69
	Mittelwerte	2,24			0,72			0,72		
	Mittelwert d. Mittelwerte	1,23								
	Standardabweichung	0,71								
24 h	Einzelwerte	3,09	3,07	0,30	1,00	0,91	0,97	0,98	0,88	0,98
	Mittelwerte	3,08			0,96			0,95		
	Mittelwert d. Mittelwerte	1,66								
	Standardabweichung	1,00								
36 h	Einzelwerte	1,42	2,42	1,29	1,24	0,95	0,84	1,13	0,96	0,85
	Mittelwerte	1,71			1,01			0,98		
	Mittelwert d. Mittelwerte	1,23								
	Standardabweichung	0,34								
48 h	Einzelwerte	47,67	1,62	1,58	1,12	1,21	0,23	1,21	1,29	0,24
	Mittelwerte	1,60			0,85			0,91		
	Mittelwert d. Mittelwerte	1,12								
	Standardabweichung	0,34								

Tabelle 4-2: Induktionswerte der Expression von hBD-2 relativ zur Expression von GAPDH durch Epithelzellen nach Stimulation mit Einzelspezies-Biofilmen. Grau unterlegte Werte wurden nicht berücksichtigt.

Biofilm		<i>S. mutans</i>			<i>S. mitis</i>		
Versuch		1	2	3	1	2	3
12 h	Einzelwerte	1,00	0,68	1,91	0,75	2,82	2,40
	Mittelwert	1,20			1,99		
	Standardabweichung	0,52			0,89		
24 h	Einzelwerte	8,47	0,85	0,65	1,04	4,38	2,93
	Mittelwert	0,75			2,78		
	Standardabweichung	0,10			1,37		
36 h	Einzelwerte	0,99	0,96	0,87	1,98	2,14	2,23
	Mittelwert	0,94			2,12		
	Standardabweichung	0,05			0,10		
48 h	Einzelwerte	0,33	0,33	0,33	2,03	2,47	2,76
	Mittelwert	0,33			2,42		
	Standardabweichung	0,00			0,30		

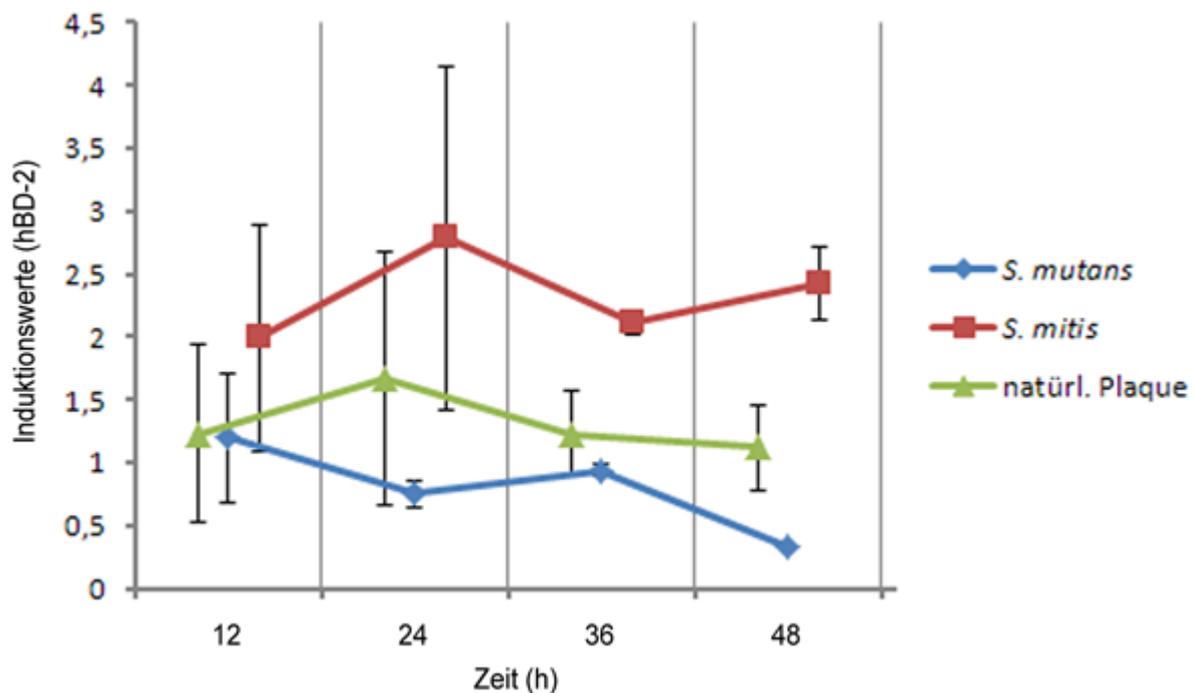


Abbildung 4-7 zeigt die Induktionswerte, d.h. die relative Expression von hBD-2 nach Stimulation mit Einzelspezies-Biofilmen der Spezies *S. mitis* (rote Linie/Quadrat) und *S. mutans* (blaue Linie/Raute), sowie komplexen, intraoral gebildeten Biofilmen (grüne Linie/Dreieck). Die Biofilme waren über 12, 24, 36 und 48 Stunden gewachsen. Die statistische Analyse durch den Kruskal-Wallis-Test zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen den durch die verschiedenen Biofilme hervorgerufenen Induktionswerten ($p = 0,0097 < 0,05$).

Die Epithelzellen reagierten auf die Stimulation mit dem pathogenen Keim *S. mutans* mit der schwächsten, auf die Stimulation mit dem nicht-pathogenen Keim *S. mitis* mit der stärksten relativen Expression von hBD-2. Die Stimulation mit dem natürlich entstandenen Biofilm führte zu einer mittleren Expression. Die Unterschiede in den Induktionswerten nach Stimulation mit verschiedenen Biofilmen waren statistisch signifikant.

4.2.2 RNase-7

Die Expression des antimikrobiellen Peptids RNase-7 durch verschieden stimulierte Epithelzellen wurden in den Tabellen 4-3 und 4-4 sowie in Abb. 4-8 dargestellt. Während die Stimulation mit *S. mitis*-Biofilmen gleichmäßig niedrige Induktionswerte ergab, führte die Stimulation mit der natürlichen Plaque zu Induktionswerten zwischen 1,26 und 1,42. Auffällig war dagegen die Reduktion der relativen RNase-7- Expression von 1,42 zu 0,85 über die Zeit. Der Kruskal-Wallis-Test ergab statistisch signifikante Unterschiede.

Tabelle 4-3: Induktionswerte der Expression von RNase-7 relativ zur Expression von GAPDH durch Epithelzellen nach Stimulation mit natürlich gebildeten Biofilmen. Grau unterlegte Werte wurden nicht berücksichtigt.

	Biofilm	natürliche Plaque								
		1			2			3		
	Proband									
	Versuch	1	2	3	1	2	3	1	2	3
12 h	Einzelwerte	2,18	2,09	0,32	0,70	0,86	0,69	1,25	1,75	1,56
	Mittelwerte	1,53			0,75			1,52		
	Mittelwert d. Mittelwerte	1,26								
	Standardabweichung	0,36								
24 h	Einzelwerte	1,41	1,81	0,94	0,55	0,84	0,96	1,79	1,84	1,45
	Mittelwerte	1,38			0,78			1,69		
	Mittelwert d. Mittelwerte	1,29								
	Standardabweichung	0,38								
36 h	Einzelwerte	1,16	1,46	1,83	1,15	0,74	0,07	2,17	1,88	1,27
	Mittelwerte	1,48			0,94			1,77		
	Mittelwert d. Mittelwerte	1,40								
	Standardabweichung	0,34								
48 h	Einzelwerte	2,80	2,29	1,00	0,77	0,43	0,62	1,43	1,95	1,47
	Mittelwerte	2,03			0,61			1,62		
	Mittelwert d. Mittelwerte	1,42								
	Standardabweichung	0,60								

Tabelle 4-4: Induktionswerte der Expression von RNase-7 relativ zur Expression von GAPDH durch Epithelzellen nach Stimulation mit Einzelspezies-Biofilmen. Grau unterlegte Werte wurden nicht berücksichtigt.

	Biofilm	<i>S. mutans</i>			<i>S. mitis</i>		
		1	2	3	1	2	3
12 h	Einzelwerte	1,78	2,19	0,28	0,15	0,13	0,31
	Mittelwert	1,42			0,20		
	Standardabweichung	0,82			0,08		
24 h	Einzelwerte	1,97	1,78	0,94	0,13	0,16	0,14
	Mittelwert	1,56			0,14		
	Standardabweichung	0,45			0,01		
36 h	Einzelwerte	0,61	2,26	0,39	0,06	0,09	0,17
	Mittelwert	1,09			0,11		
	Standardabweichung	0,83			0,05		
48 h	Einzelwerte	1,92	0,37	0,27	0,25	0,14	0,23
	Mittelwert	0,85			0,21		
	Standardabweichung	0,76			0,05		

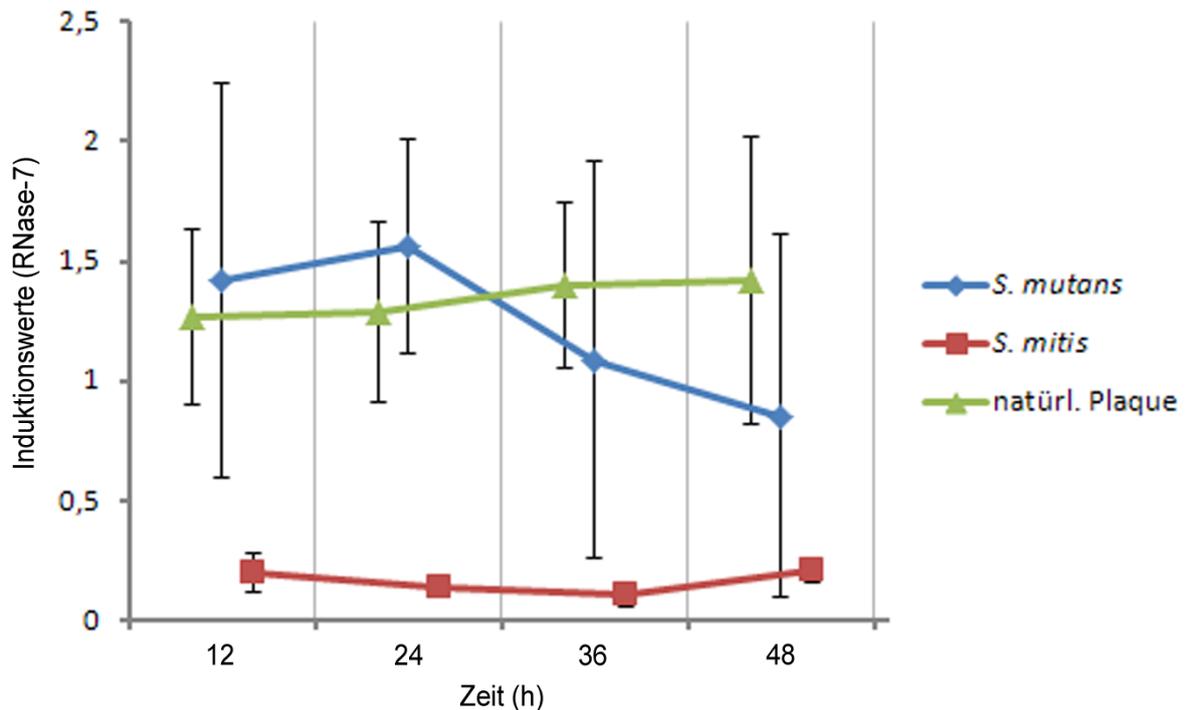


Abbildung 4-8: Die Expression von RNase-7 nach Stimulation mit Einzelspezies-Biofilmen von *S. mitis* (rote Linie/Quadrat) und *S. mutans* (blaue Linie/Raute) und komplexen, intraoral gewachsenen (grüne Linie/Dreieck) Biofilmen. Die statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis-Test zeigte statistisch signifikante Unterschiede der drei Biofilme ($p = 0,0245 < 0,05$).

4.2.3 Psoriasis (PSO)

Die zelluläre mRNA-Expression von PSO durch Epithelzellen nach Stimulation mit Biofilmen wurde in den Tabellen 4-5 und 4-6 sowie in Abbildung 4-9 dargestellt. Nach 12 und 24 Stunden Inkubation entsprachen sich die Induktionswerte der PSO-mRNA zwischen 0,5 und 1,5, um dann nach 36 und 48 Stunden zu divergieren: Während die relative Expression nach Stimulation durch *S. mitis* bzw. die natürliche Plaque auf einen Wert über 2 anstieg, fiel diese nach Stimulation durch *S. mutans* auf einen Wert von unter 0,4. Da sich die Entwicklungen der Induktionswerte nach Stimulation mit verschiedenen Biofilmen in der Graphik teilweise überschneiden, war ein signifikanter Unterschied nicht nachzuweisen.

Tabelle 4-5: Induktionswerte der Expression von PSO relativ zur Expression von GAPDH durch Epithelzellen nach Stimulation mit natürlich gebildeten Biofilmen. Grau unterlegte Werte wurden nicht berücksichtigt.

Biofilm	natürliche Plaque								
	1			2			3		
Proband									
Versuch	1	2	3	1	2	3	1	2	3
12 h Einzelwerte	1,29	1,04	0,68	1,92	0,81	3,91	0,78	1,06	1,02
Mittelwerte	1,01			2,21			0,95		
Mittelwert d. Mittelwerte	1,39								
Standardabweichung	0,58								
24 h Einzelwerte	1,21	0,07	0,46	1,33	1,88	0,26	1,11	1,23	0,94
Mittelwerte	0,26			1,16			1,09		
Mittelwert d. Mittelwerte	0,84								
Standardabweichung	0,41								
36 h Einzelwerte	0,60	0,43	0,27	1,50	0,83	1,82	1,35	1,16	0,84
Mittelwerte	0,43			1,38			1,12		
Mittelwert d. Mittelwerte	0,98								
Standardabweichung	0,40								
48 h Einzelwerte	29,06	1,06	0,81	1,79	2,29	2,05	0,91	1,26	0,93
Mittelwerte	0,94			2,04			1,03		
Mittelwert d. Mittelwerte	1,34								
Standardabweichung	0,50								

Tabelle 4-6: Induktionswerte der Expression von PSO relativ zur Expression von GAPDH durch Epithelzellen nach Stimulation mit Einzelspezies-Biofilmen. Grau unterlegte Werte wurden nicht berücksichtigt.

Biofilm		<i>S. mutans</i>			<i>S. mitis</i>		
Versuch		1	2	3	1	2	3
12 h	Einzelwerte	0,34	0,66	2,38	0,33	0,99	3,85
	Mittelwert	1,13			0,66		
	Standardabweichung	0,90			0,33		
24 h	Einzelwerte	0,94	1,39	1,29	1,60	1,46	1,32
	Mittelwert	1,21			1,46		
	Standardabweichung	0,19			0,11		
36 h	Einzelwerte	1,71	0,64	0,14	1,20	1,88	0,38
	Mittelwert	0,39			1,15		
	Standardabweichung	0,25			0,61		
48 h	Einzelwerte	0,13	0,34	0,68	1,90	1,59	3,34
	Mittelwert	0,38			2,28		
	Standardabweichung	0,23			0,76		

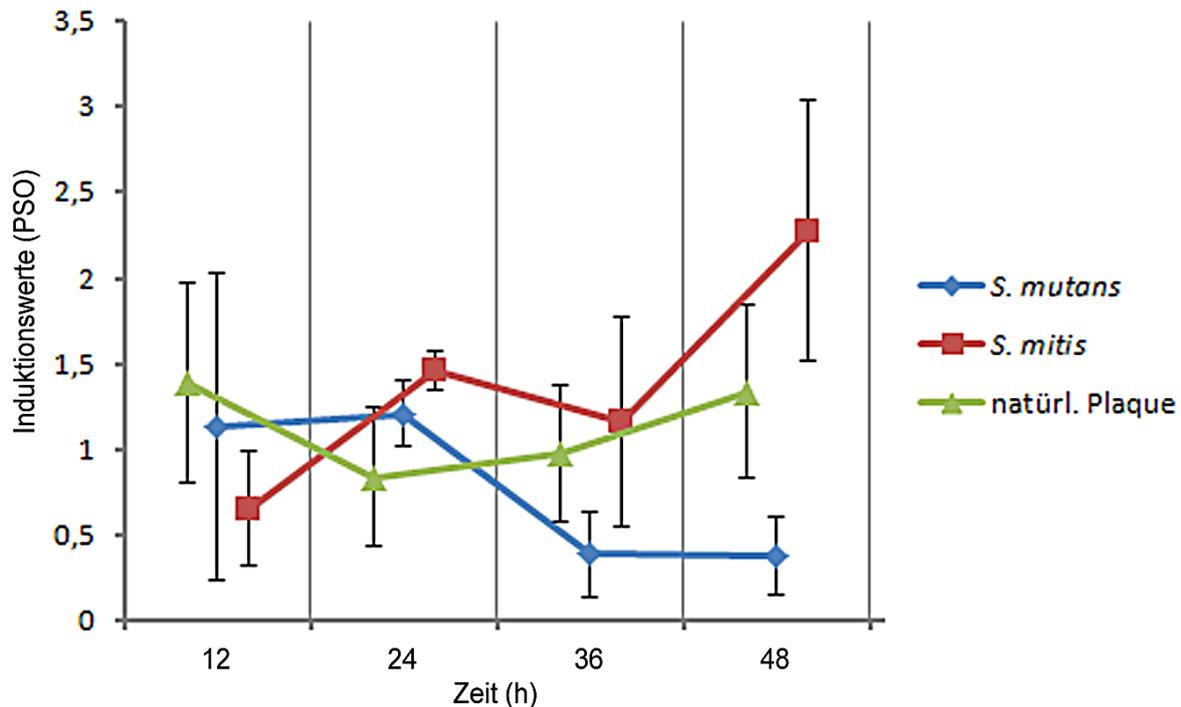


Abbildung 4-9: Die Expression des antimikrobiellen Peptids PSO nach Stimulation mit Einzelspezies-Biofilm von *S. mitis* (rote Linie/Quadrat) und *S. mutans* (blaue Linie/Raute) und komplexen, intraoral gebildeten Biofilmen (grüne Linie/Dreieck). Die statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied der drei unterschiedlichen Biofilme ($p = 0,2753 > 0,05$) nach 12, 24, 36 und 48 Stunden Wachstum des Biofilms.

4.3 *Expression von immunmodulatorischen Molekülen nach Biofilmstimulation*

4.3.1 IL-8

Wie in den vorhergehenden Versuchsreihen wurden Epithelzellen mit intraoral gewachsenen Biofilmen oder mit nur aus einer einzelnen Erregerspezies bestehendem Biofilm in Kontakt gebracht. Diese sind in vier verschiedenen Reifegraden zwischen 12 und 48 Stunden zur Induktion von IL-8 verwendet worden. Die dabei erzielten Induktionswerte für die IL-8-mRNA wurden in den Tabellen 4-7 und 4-8 sowie in Abbildung 4-10 gezeigt.

Tabelle 4-7: Induktionswerte der Expression von IL-8 relativ zur Expression von GAPDH durch Epithelzellen nach Stimulation mit natürlich gebildeten Biofilmen. Grau unterlegte Werte wurden nicht berücksichtigt. „k.D.“ = keine Daten. Die bei Proband 3 verzeichneten Werte von „0,00“ liegen eigentlich darüber, sind aber abgerundet worden.

	Biofilm	natürliche Plaque								
		1			2			3		
Proband										
Versuch		1	2	3	1	2	3	1	2	3
12 h	Einzelwerte	0,19	0,44	0,12	k.D.	k.D.	k.D.	0,00	0,00	0,03
	Mittelwerte	0,25						0,01		
	Mittelwert d. Mittelwerte	0,13								
	Standardabweichung	0,12								
24 h	Einzelwerte	1,37	0,54	0,44	k.D.	k.D.	k.D.	0,12	0,00	0,04
	Mittelwerte	0,78						0,02		
	Mittelwert d. Mittelwerte	0,40								
	Standardabweichung	0,38								
36 h	Einzelwerte	1,25	1,24	0,24	k.D.	k.D.	k.D.	0,13	0,03	0,03
	Mittelwerte	0,91						0,06		
	Mittelwert d. Mittelwerte	0,49								
	Standardabweichung	0,42								
48 h	Einzelwerte	0,29	1,27	0,16	k.D.	k.D.	k.D.	0,04	0,01	0,03
	Mittelwerte	0,57						0,03		
	Mittelwert d. Mittelwerte	0,30								
	Standardabweichung	0,27								

Tabelle 4-8: Induktionswerte der Expression von IL-8 relativ zur Expression von GAPDH durch Epithelzellen nach Stimulation mit Einzelspezies-Biofilmen. Grau unterlegte Werte wurden nicht berücksichtigt.

Biofilm		<i>S. mutans</i>			<i>S. mitis</i>		
Versuch		1	2	3	1	2	3
12 h	Einzelwerte	6,96	9,02	6,46	0,35	0,14	0,06
	Mittelwert	7,48			0,18		
	Standardabweichung	1,11			0,12		
24 h	Einzelwerte	8,24	6,57	5,46	0,29	0,39	0,45
	Mittelwert	6,75			0,38		
	Standardabweichung	1,14			0,07		
36 h	Einzelwerte	6,71	4,76	5,58	0,46	0,76	0,37
	Mittelwert	5,68			0,53		
	Standardabweichung	0,80			0,17		
48 h	Einzelwerte	8,63	5,87	7,20	0,74	0,40	0,44
	Mittelwert	7,23			0,53		
	Standardabweichung	1,13			0,15		

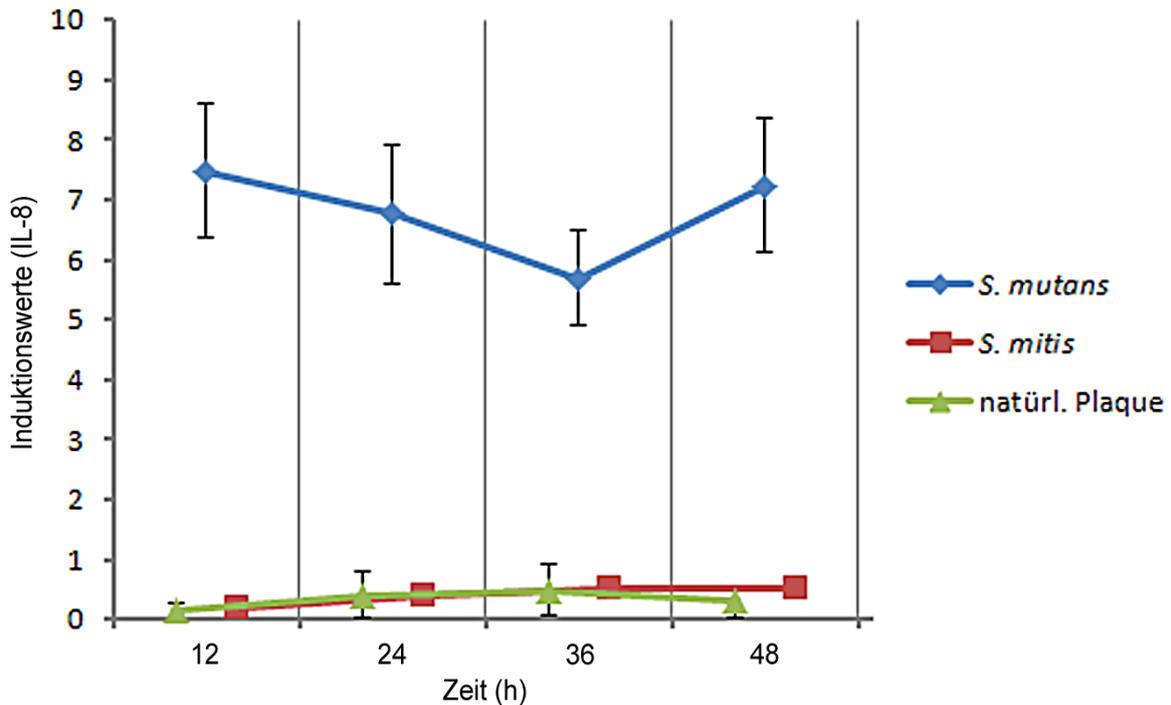


Abbildung 4-10: Die Expression des Entzündungsmediators IL-8 nach Stimulationsversuchen mit Einzelspezies-Biofilmen der Spezies *S. mitis* (rote Linie/Quadrat) und *S. mutans* (blaue Linie/Raute), sowie dem komplexen, intraoral gebildeten Biofilm (grüne Linie/Dreieck). Die Biofilme waren über einen Zeitraum von 12, 24, 36 und 48 Stunden gewachsen. Die statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den durch drei unterschiedliche Biofilme generierten Induktionswertreihen ($p = 0,021 < 0,05$).

Augenfällig war der gleichbleibend hohe Induktionswert (5 - 8) bei der Stimulation mit dem pathogenen Keim *S. mutans*, während die Induktionswerte für den kommensalen Keim *S. mitis* und die natürliche Plaque nicht einmal den Wert 1 erreichten. Dieser Unterschied war somit signifikant.

4.3.2 5-Lipoxidase

Das Protein 5-Lipoxidase ist ein Regulatorenzym für die Synthese von Leukotrienen und somit ein Schlüsselprotein bei der Modulierung einer Immunantwort. Im Folgenden wurde die Expression von 5-LO-mRNA durch Epithelzellen nach Stimulation mit verschiedenen Biofilmen untersucht. Die Induktionswerte wurden in Tabelle den 4-9 und 4-10 sowie in Abbildung 4-11 dargestellt.

Tabelle 4-9: Induktionswerte der Expression von 5-LO relativ zur Expression von GAPDH durch Epithelzellen nach Stimulation mit natürlich gebildeten Biofilmen. Grau unterlegte Werte wurden nicht berücksichtigt.

	Biofilm	natürliche Plaque								
		1			2			3		
	Proband									
	Versuch	1	2	3	1	2	3	1	2	3
12 h	Einzelwerte	0,20	0,12	0,14	0,43	1,00	1,09	0,64	2,40	78,84
	Mittelwerte	0,16			0,84			1,52		
	Mittelwert d. Mittelwerte	0,84								
	Standardabweichung	0,56								
24 h	Einzelwerte	0,16	0,09	0,15	0,92	0,71	0,91	1,74	1,49	2,01
	Mittelwerte	0,13			0,85			1,75		
	Mittelwert d. Mittelwerte	0,91								
	Standardabweichung	0,66								
36 h	Einzelwerte	0,18	0,03	0,27	1,47	0,70	1,23	0,89	1,80	1,76
	Mittelwerte	0,16			1,13			1,48		
	Mittelwert d. Mittelwerte	0,93								
	Standardabweichung	0,56								
48 h	Einzelwerte	0,08	0,29	0,26	1,03	0,99	1,17	1,14	1,77	1,40
	Mittelwerte	0,21			1,06			1,43		
	Mittelwert d. Mittelwerte	0,90								
	Standardabweichung	0,51								

Tabelle 4-10: Induktionswerte der Expression von 5-LO relativ zur Expression von GAPDH durch Epithelzellen nach Stimulation mit Einzelspezies-Biofilmen. Grau unterlegte Werte wurden nicht berücksichtigt.

Biofilm	<i>S. mutans</i>			<i>S. mitis</i>					
	1	2	3	1	2	3			
12 h	Einzelwerte			2,75	2,53	0,42	1,44	1,55	1,65
	Mittelwert			1,90			1,54		
	Standardabweichung			1,05			0,08		
24 h	Einzelwerte			2,40	1,81	2,46	1,74	1,46	1,03
	Mittelwert			2,22			1,41		
	Standardabweichung			0,30			0,29		
36 h	Einzelwerte			2,89	2,43	3,23	0,97	1,49	1,09
	Mittelwert			2,85			1,18		
	Standardabweichung			0,33			0,22		
48 h	Einzelwerte			1,23	2,43	2,78	1,41	1,33	1,38
	Mittelwert			2,15			1,37		
	Standardabweichung			0,67			0,04		

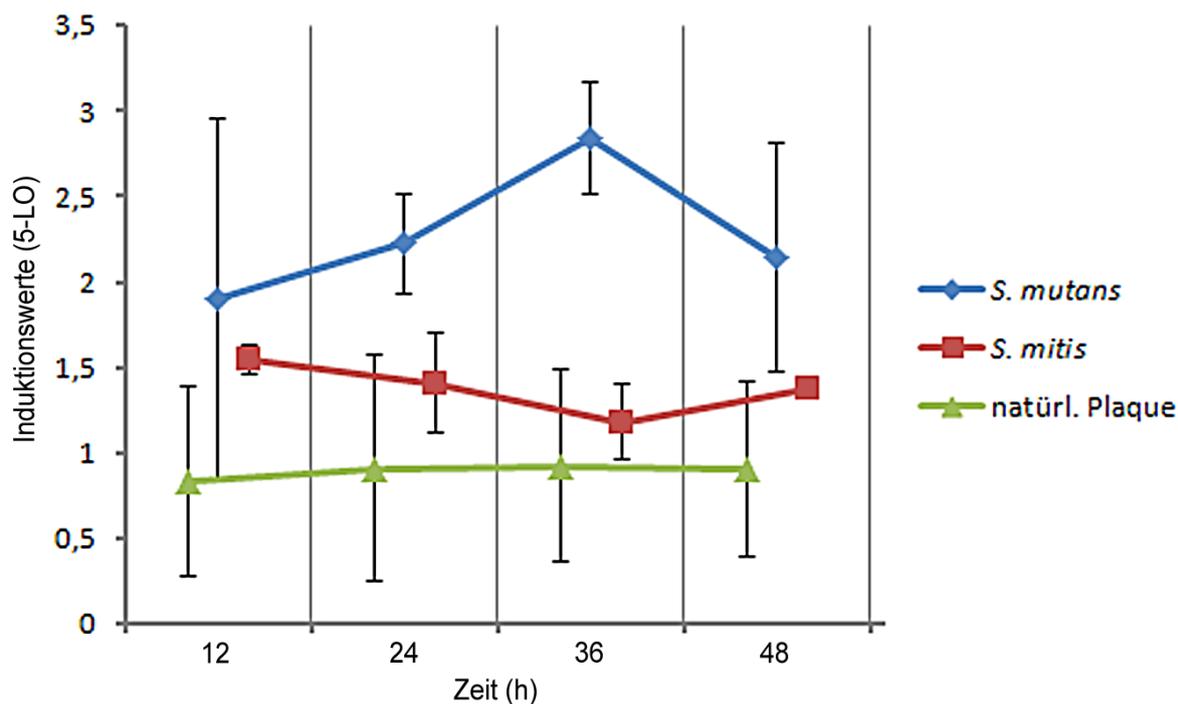


Abbildung 4-11: Die Expression des Enzyms 5-LO nach Stimulation mit Einzelspezies-Biofilmen von *S. mitis* (rote Linie/Quadrat) und *S. mutans* (blaue Linie/Raute) und dem komplexen, intraoral gereiften Biofilm (grüne Linie/Dreieck). Die statistische Analyse durch den Kruskal-Wallis-Test zeigte signifikante Unterschiede in den Induktionswertreihen nach Stimulation mit den drei verschiedenen Biofilmen ($p = 0,0073 < 0,05$).

Während die Inkubation der Epithelzellen mit natürlicher Plaque (Induktionswerte < 1) und mit *S. mitis* (Induktionswerte zwischen 1,2 und 1,6) zu keiner verstärkten Expression von 5-LO führte, konnte bei der Inkubation mit *S. mutans* von 12 h zu 36 h Inkubation eine Steigerung der relativen Expression von 1,9 auf 2,8 festgestellt werden. Nach 48 Stunden Inkubation war der Induktionswert allerdings fast wieder auf den 12 h - Wert abgefallen. Der Vergleich der Induktionswertreihen über die Zeit war statistisch signifikant.

5 Diskussion

Die Mundhöhle stellt einen Lebensraum für eine Vielzahl unterschiedlicher Spezies dar. Während der größte Teil von ihnen als kommensal gelten darf, gibt es unter ihnen auch einige pathogene Vertreter. Als ein erstes Anzeichen für einen pathologischen *Shift* und damit für eine mögliche Infektion wird die Ausbildung eines bakteriellen Biofilms angesehen. In diesem Stadium ist die Immunreaktion durch die Epithelzellen entscheidend, um die Integrität des Mundraums zu bewahren. Eine Erforschung der bei dieser Reaktion durchgeführten Einzelschritte wird es letztlich ermöglichen, Prophylaxe und/oder Therapie bei Verletzungen und Infektionen im Mundraum abstimmen zu können. Zu diesem Zweck sollte ein Modell etabliert werden, mit dessen Hilfe die Reaktion von Epithelzellen auf Biofilme untersucht werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde eine entsprechende Versuchsanordnung in ihren Einzelschritten erprobt und soll im vorliegenden Textabschnitt diskutiert und bewertet werden.

5.1 *Übertragung der Mikroorganismen vom Speichel auf den Biofilm*

Anhand der mikrobiologischen Zusammensetzungen von Speichel und Biofilmen sollte abgeschätzt werden, inwieweit ein intraoral gebildeter Biofilm die natürliche Situation in der Mundhöhle abbilden konnte. Faktoren wie z.B. die Mundhygiene, die Ernährung, der genetische Hintergrund oder der allgemeine Gesundheitszustand ließen interindividuelle Unterschiede bei der Zusammensetzung des Speichels erwarten. Jedoch stimmten die mikrobiellen Kompositionen bei allen drei Spendern nahezu überein (s. Tabelle 5-1).

Außerdem waren in früheren Studien große Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung der Biofilme zutage getreten, die auf eine uneinheitliche Positionierung der Polycarbonatfolien in den Mundhöhlen der Probanden zurückgeführt werden konnten [166]. Um diesem Problem zu begegnen, wurde in der vorliegenden Studie die Lage der Polycarbonatfolien durch den Einsatz von Gaumenplatten vereinheitlicht. Die Folien wurden dabei intraoral mittels einer Halteprothese für einen Zeitraum von bis zu vier Tagen getragen. Danach wurde eine mikrobiologische Analyse der natürlichen Biofilme auf den Folien vorgenommen, deren Keimspektren den Ergebnissen der Speichelproben gegenüber gestellt wurden. Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den mikrobiellen Zusammensetzungen der Speichelproben und denen der Biofilme.

Tabelle 5-1: Vergleich der mikrobiologischen Zusammensetzungen in Speichelproben und Biofilmen

		Speichelprobe von Proband			Biofilm von Proband		
		1	2	3	1	2	3
<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	√	√	√	√	√	√
	<i>anginosus</i>	√	√	√	√	√	
	<i>gordonii</i>	√	√	√	√		
	<i>salivarius</i>				√		
	<i>cristatus</i>						√
	<i>oralis</i>						√
	<i>pluranimalium</i>						√
<i>Neisseria</i>	<i>spec.</i>	√	√	√	√		
<i>Haemophilus</i>	<i>spec.</i>	√	√	√	√		
<i>Rothia</i>	<i>spec.</i>				√		
<i>Capnocytophaga</i>		√	√				
<i>Leuconostoc</i>				√			

S. mitis kam sowohl in allen Speichelproben als auch in allen Biofilmen vor. Diese durchgehende Nachweisbarkeit entsprach der Erwartung an einen weit verbreiteten, kommensalen, aber ggf. auch an einer Plaquebildung beteiligten Keim [2, 57, 167]. Dies konnte im nachhinein als ein Argument für die Verwendung von *S. mitis* als eine der Einzelspezies zur Erstellung eines Biofilms im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewertet werden. *S. anginosus* wurde in allen Speichelproben und in zwei der drei Biofilme nachgewiesen. Dieses Bakterium wurde damit seinem Charakter als eine Art „Standardkeim“ für die Mundhöhle gerecht. Sowohl *S. gordonii* als auch *Neisseria* und *H. species* konnten zwar in allen Speichelproben detektiert werden, allerdings nur in einem der Biofilme. *Capnocytophaga* und *Leuconostoc* traten ausschließlich im Speichel auf, während vier verschiedene Streptokokken-Spezies (*S. Salivarius*, *S. cristatus*, *S. oralis* und *S. pluranimalium*) nur in den Biofilmen nachweisbar waren. Der pathogene Keim *S. mutans* war - wie erwartet - in keiner der Proben von gesunden Spendern aufzufinden.

Die Veränderungen der mikrobiologischen Zusammensetzung bei der Überführung des oralen Keimspektrums auf die Folien könnten verschiedene Ursachen haben. So verfügen in der Mundhöhle in geringerem Umfang vorhandene Keime möglicherweise über eine erhöhte Adhäsion an die Polycarbonatfolien, auf der sie dann zum Beginn der Kultivierungsphase in größerer Zahl vorhanden sind und damit mit einem Wachstumsvorsprung ausgestattet sind. Weiterhin bevorteilen die für die Anzucht der Keime auf den Folien vorhandenen

Wachstumsbedingungen möglicherweise andere Keime als die in der Mundhöhle. Dies schließt nicht nur das Nahrungsangebot, sondern auch das Umfeld mit konkurrierenden Keimen beziehungsweise in der Mundhöhle vorhandenen Epithelzellen (und deren Stoffwechselprodukten) ein.

Zum einen gab dieses Ergebnis Aufschluss über die Wachstums- und Adhäsionseigenschaften der im Speichel vorkommenden Keime unter *in vitro* Bedingungen. Zum anderen zeigte es auch die Grenzen der in dieser Versuchsreihe angewandten Methodik auf: Es gelang nicht, die große Mehrzahl der im Speichel nachgewiesenen Mikroorganismen im Biofilm anzuzüchten. Ihre mögliche stimulative Wirkung auf die oralen Epithelzellen wurde also in den vorliegenden Experimenten nicht erfasst. In zukünftigen Studien muss demnach besonderes Augenmerk auf die Verbesserung der Methoden zur Anzucht von Mikroorganismen auf den Polycarbonatfolien gelegt werden. Möglicherweise müssen die Polycarbonatfolien anders als bisher vorbehandelt werden, so dass den Mikroorganismen die Adhäsion leichter fällt. Vielleicht ist den Probanden während des Tragens der Gaumenplatten eine bestimmte Diät zuzumuten, um ein günstiges Milieu für die Adhäsion zu schaffen. Eventuell erreicht man sogar eine bessere Darstellung der im Mundraum vorhandenen Mikrobenpopulation, wenn man die im Speichel nachgewiesenen Mikroorganismen artifiziell *in vitro* und eben nicht durch intraorale Inkubation auf die Polycarbonatfolien aufbringt. In diesem Fall könnte auch die im Speichel nachgewiesene, relative Menge einzelner Mikroorganismen genau berücksichtigt werden.

5.2 *Expression immunmodulatorischer Proteine nach Biofilmstimulation*

5.2.1 Ergebnisse im Kontext früherer Studien

In früheren Arbeiten war die Induktion von immunologisch wirksamen Molekülen in Epithelzellen durch bakterielle Extrakte und/oder durch Hitze getötete Organismen untersucht worden. Allerdings wurden die Interaktionen zwischen Epithelzellen und intakten Biofilmen während des Beginns oraler Infektionen durch diese Experimente nicht angemessen modelliert [19, 83, 86, 168-170].

Chung und Dale verglichen die Induktion von humanen beta-Defensinen in Epithelzellen durch unterschiedliche Keime [171]. Kommensale Bakterien, wie *F. nucleatum* und *S. gordonii*, wurden dabei als starke Induktoren zur Bildung antimikrobieller Peptide identifiziert, während die Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel IL-8 (und andere

Entzündungsmarker der angeborenen Abwehr) in ihrer Induktion unverändert blieben. Die pathogenen Keime *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* induzierten die Synthese der humanen beta-Defensine dagegen nur schwach, von Entzündungsmarkern der angeborenen Abwehr jedoch stark.

In weiteren Studien konnte eine konstante Sezernierung von IL-8 im parodontal gesunden Gewebe festgestellt werden. Während die Stimulation mit *P. gingivalis* eine Verminderung der Expression von IL-8 bewirkte [172], riefen *F. nucleatum* - im Gegensatz zur oben erwähnten Veröffentlichung von Chung und Dale - [172-175] und *Eikenella corrodens* dessen Verstärkung hervor. Die Stärke der IL-8-Induktion war abhängig von der Konzentration von *E. corrodens* und der Stimulationsdauer [176].

Jüngere Arbeiten verwendeten bereits natürliche Biofilme unterschiedlicher Reifungsstadien als Induktoren zur Bildung antimikrobieller Peptide und Entzündungsmediatoren durch orale Epithelzellen [57]. Es stellte sich in jenen Versuchen heraus, dass die Expression von hBD-2, PSO, RNase-7 und 5-LO in frühen Plaquestadien erhöht ist. In späteren Stadien war eine reduzierte Expression zu beobachten. Einzig die Expression des Entzündungsmediators IL-8 stieg in den späten Plaquephasen. Seitens der Autoren wurde daher vermutet, dass die hBD-2-Induktion vom Stadium der Entzündung des Epithels abhängig ist. Krisanaprakornkit *et al.* [86] konnten bei ähnlichen Versuchsreihen ebenfalls eine differenzierte Expression von hBD-2 und IL-8 zeigen.

Um die experimentelle Darstellung an die Situation in der Mundhöhle anzunähern, wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls die Induktion von AMPs und Entzündungsmediatoren in oralen Epithelzellen durch unterschiedlich zusammengesetzte Biofilme untersucht. Neben intraoral gebildeten wurden auch Biofilme der einzelnen Spezies *S. mitis* bzw. *S. mutans* genutzt, um die maximale Stimulation mit einem kommensalen bzw. pathogenen Keim zu bewirken. Somit konnte die mögliche Bandbreite verschiedener Reaktionen auf einen einzigen Keim dargestellt werden. Dabei zeigte sich, dass

- die relative Expression der antimikrobiellen Peptide hBD-2 und PSO nach Stimulation mit dem kommensalen Keim *S. mitis* nach 24 h bis 48 h am stärksten war, während sie nach Stimulation mit dem pathogenen Keim *S. mutans* ab 36 h am schwächsten ausfiel.
- bei der relativen Expression des antimikrobiellen Peptids RNase-7 eine Abschwächung nach Stimulation mit dem pathogenen Keim *S. mutans* über die Zeit zu beobachten war, während die relative Expression nach Stimulation mit *S. mitis*

beziehungsweise der natürlichen Plaque über die Zeit gleichbleibend stark ausgeprägt war.

- die Stimulation mit dem pathogenen Keim *S. mutans* von Beginn bis zum Ende der Messreihe die höchsten Induktionswerte für die Mediatormoleküle IL-8 und 5-LO hervorrief.
- die Induktionswerte für IL-8 und 5-LO sich durch die Stimulation mit *S. mitis* beziehungsweise der natürlichen Plaque über die Zeit kaum veränderten.

Die beschriebenen Immunreaktionen der Epithelzellen der vorliegenden Studie decken sich mit denen früherer Arbeiten [57]. Studienübergreifend ist festzustellen, dass kommensale Keime wie in der natürlichen Plaque oder als Einzelspezies-Biofilm von *S. mitis* die Expression von antimikrobiellen Peptiden, pathogene Keime die von Entzündungsmediatoren hervorrufen. Als einzige Ausnahme ist die Expression von RNase-7 zu nennen, die durch die Inkubation mit *S. mitis* nicht stimuliert werden konnte.

Damit werden kommensale Keime offensichtlich durch AMPs nur in ihrer Zahl und/oder ihrer lokalen Ausdehnung begrenzt, während pathogene Keime durch mittels Mediatoren herbeigerufene Immunzellen aktiv bekämpft und möglicherweise komplett neutralisiert werden. Dieses Verhaltensmuster des Immunsystems ist beispielhaft mit der Theorie einer Koevolution von Mensch und Bakterium in Einklang zu bringen.

5.2.2 Ergebnisse im Kontext der Koevolution von Mensch und Mikroorganismus

Ein großer Teil der in der Mundhöhle des Menschen vorkommenden Keime ist kommensaler Art, d.h. die Keime nutzen für den Menschen Unbrauchbares bzw. nur geringe Mengen von Verwertbarem. So erhält der kommensale Keim seinen Wirt und damit seine eigene Lebensgrundlage, während der Wirt von der Gegenwart des Keimes nicht beeinflusst oder gar gefährdet wird. Unter diesen Bedingungen passt sich der Wirt dem Keim in aller Regel ebenfalls an: statt energie- und zeitintensive Immunreaktionen zu generieren, akzeptiert der Wirt die Gegenwart des Keims und kontrolliert lediglich die Häufigkeit seines Vorkommens. Würde diese nämlich zu groß, käme es zu einem ökologischen *Shift* mit den bekannten negativen Auswirkungen. Ein somit als „balanciert“ bezeichneter Parasitismus stellt häufig das Ergebnis einer Koevolution dar, bei der beide Spezies im Laufe der Evolution ihr jeweiliges Genom in Abhängigkeit von der anderen Spezies ändern, um letztlich die jeweiligen Existenzgrundlagen zu optimieren. Möglicherweise stellen die Mikroorganismen auf diese Weise einen gewissen Nutzen für ihren Wirt dar.

S. mitis gehört zu einer großen Gruppe von in der Regel nichtpathogenen, kommensalen Streptokokkenspezies und ist Teil der normalen Mund- und Rachenflora. Eine Stimulation mit einem aus *S. mitis* bestehenden Biofilm verstärkte die PSO-Expression, nicht jedoch die anderer antimikrobieller Peptide wie RNase-7, hBD-2 oder die der Entzündungsmediatoren IL-8 beziehungsweise 5-LO. Der intraoral angezüchtete, natürliche Biofilm enthielt nur kommensale, nichtpathogene Keime. In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Stimulation von oralen Epithelzellen mit einem solchen Biofilm eine weitgehend gleichbleibende Expressionsstärke (mit geringen Ausschlägen) der getesteten Proteine. Zusammengefasst induzierten kommensale Keime die Produktion antimikrobieller Peptide auf einem nahezu gleichbleibenden Level über die Zeit, durch welche die Epithelzellen die Konzentration des Keims am entsprechenden Ort begrenzen. Zur Kontrolle eines solchen Keims werden Entzündungsmediatoren wie IL-8, die Immunzellen aus weiter entfernten Gewebsabschnitten anlocken würden, offensichtlich nicht (oder erst bei sehr hohen Konzentrationen) gebraucht. Damit liegt bei der Besiedlung der Mundhöhle mit *S. mitis* bzw. natürlichem Biofilm offensichtlich eine ausgewogene Koexistenz vor, wobei der Wirt die kommensalen Keime nicht gänzlich abwehrt, sondern nur ihre Zahl kontrolliert.

Neben kommensalen existieren zeitweilig auch pathogene Keime in der Mundhöhle des Menschen. Letztere zeichnen sich durch Virulenzfaktoren aus. Im Fall von *S. mutans* führen diese zur Entwicklung eines Biofilms in der Mundhöhle, der Karies zur Folge haben kann. Es handelt sich hierbei um einen pathologischen Parasitismus. Der Parasit verändert sein Genom, um seine Besiedlungsmöglichkeiten bei seinem Wirt zu verbessern. Der Wirt verändert sein Genom, um die Abwehr des Keims zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit führte die Stimulation mit *S. mutans* zu den höchsten Induktionswerten der Entzündungsmediatoren IL-8 und 5-LO, während sie gleichzeitig - spätestens nach 36 h - zur niedrigsten relativen Expression der AMPs RNase-7, hBD-2 und PSO führte. Im Unterschied zur Stimulation mit kommensalen Keimen ist es offensichtlich bei pathogenen Keimen nicht ausreichend, ihre Anzahl nur zu begrenzen. Vielmehr sollen durch die Entzündungsmediatoren Immunzellen zur Infektionsstelle gelockt und der Keim bestenfalls vollständig eliminiert werden.

Die verschiedenen Immunantworten der Epithelzellen auf die unterschiedlichen Keime zeigen ebenso beispielhaft die verschiedenartigen Immunreaktionen vor und nach einem ökologischen *Shift*, das heißt vor und nach dem Übergang von einem überwiegend aus kommensalen zu einem überwiegend aus pathogenen Keimen bestehenden oralen Keimspektrum. Die verschiedenen Immunantworten lassen überdies vermuten, dass die

einzelnen Keime unterschiedliche Mechanismen, sogenannte *Pathways* („*pathways*“), benutzen, um in Epithelien einzudringen [86]. Die dabei auftretenden Unterschiede sind jedoch eher stamm- als speziesabhängig [53].

Zusammengefasst führte die Koevolution im Rahmen eines balancierten Parasitismus (*S. mitis*) zur lokalen Begrenzung des Keims mittels antimikrobieller Peptide. Im Fall eines pathogenen Parasitismus (*S. mutans*) resultierte die Gegenwart der Keime in der Expression entzündungsfördernder Stoffe wie IL-8. Damit geben die vorliegenden Ergebnisse Hinweise auf eine unterschiedliche Art der Koexistenz des Menschen mit *S. mitis* oder *S. mutans*.

5.3 *Verwendung oraler Biofilme als Induktoren zur Expression antimikrobieller und immunmodulatorischer Moleküle durch Epithelzellen*

Die immunologische Reaktion von Epithelzellen auf Bakterien in der Mundhöhle wurde bereits in mehreren vorhergehenden Studien untersucht. In diesem Zusammenhang konstatierten Moore und Moore in einer Übersichtsarbeit, dass wahrscheinlich die große genetische Heterogenität der natürlichen Plaque mit Hunderten verschiedener Spezies für die Immunreaktion der Zellen notwendig sei [117]. Eine solche ließ sich bisher in keinem Modellsystem nachempfinden. Trotzdem wurde in vorhergehenden Studien versucht, sich der physiologischen Situation in der Mundhöhle anzunähern. So wurden - wie in der Einleitung beschrieben – unter anderem Bakterienextrakte oder abgetötete Mikroorganismen zur Stimulation der Epithelzellen verwendet.

Demgegenüber konnte mit der Verwendung von intraoral gezüchteten Biofilmen in vorhergehenden Studien und der vorliegenden Arbeit ein weiterer Schritt zur experimentellen Annäherung der physiologischen Situation in der Mundhöhle gemacht werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Keimzusammensetzung des angezüchteten Biofilms nicht genau der des Speichels entspricht. Tatsächlich sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, um einen solchen Biofilm in seiner Zusammensetzung so nah wie möglich an die physiologische Situation anzunähern.

Der angezüchtete Biofilm wurde anschließend in räumliche Nähe zu HaCaT-Zellen gebracht, die in diesem Modell die Epithelzellen darstellen sollten. Deren in der Einleitung angesprochenen Eigenschaften konnten bei der Versuchsdurchführung auch so erfahren und bestätigt werden. Allerdings muss auch hier in zukünftigen Studien der Umstieg auf aus dem

Mundraum isolierte Zellen erfolgen. Mittlerweile konnte eine Arbeit, die die hier vorgestellte Methodik auf gingivale Epithelzellen anwendete, publiziert werden [177].

Die Expression von AMPs und Entzündungsmediatoren durch Epithelzellen nach Stimulation mit Biofilmen wurde mittels semiquantitativer PCR ermittelt. Der Nachweis der jeweiligen mRNA gegenüber dem ebenso denkbaren Nachweis des entsprechenden Proteins bot einen experimentell einfacheren und kostengünstigeren Zugang, der zudem die unmittelbare Reaktion der Epithelzelle abbildete. Im übrigen waren die einzelnen Schritte dieser Nachweismethode (Isolation der mRNA, Transkription zu cDNA, PCR der relevanten cDNA-Teilstücke, Probenvorbereitung, Gelchromatographie und Dokumentation der Banden in Laufhöhe und Färbungsintensität, Auswertung der relativen Intensitäten zueinander) zeitlich unabhängig voneinander durchführbar und nicht von äußeren Umständen abhängig. Zudem wurde diese Methode in ihrer Anwendung für einen solchen Nachweis bereits publiziert [57]. Für eine zukünftige Quantifizierung der Immunreaktion bieten sich die real-time PCR, oder - für den Nachweis von Proteinen - eine Analyse per Western-Blot, ELISA, ELISPOT oder durchflusszytometrische Verfahren an.

Im Ergebnis konnte in Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien gezeigt werden, dass ein kommensaler Keim die Expression von antimikrobiellen Peptiden, ein pathogener Keim die Expression von Entzündungsmediatoren auslöst. Diese Ergebnisse ließen sich folgerichtig in die Theorie der Koevolution von Mensch und Bakterium einordnen. Die hier beschriebene Methodik führt also zu erwart- und nachvollziehbaren Ergebnissen.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die hier beschriebenen Arbeitsschritte in ihrer Kombination eine vielversprechende Grundlage für ein Modell zur Untersuchung der Expression immunrelevanter Moleküle durch Epithelzellen nach Stimulation mit Biofilmen darstellen. Tatsächlich hat die Anwendung dieses Modells auf orale Epithelzellen in der Nachfolge dieser Arbeit bereits publizierte Ergebnisse erbracht [177].

6 Zusammenfassung

In der epithelialen Grenzfläche zwischen dem Organismus und der Umwelt ist das Immunsystem in besonderer Weise gefordert. Es muss gleichzeitig zwischen schädlichen, unschädlichen oder sogar nützlichen Mikroorganismen differenzieren und angemessen reagieren. In der Mundhöhle wird die Situation durch die immer wieder erfolgende Aufnahme von Nahrung - und damit ebenfalls von Mikroorganismen - weiter verkompliziert. Dazu kommt die Fähigkeit bestimmter Bakterien zur Ausbildung eines Biofilms, der sie dem unmittelbaren Zugriff des Immunsystems entzieht und innerhalb der Mundhöhle zu einem ökologischen *Shift* führen kann. Biofilme verschiedener Bakterien und in verschiedenen Stadien müssen somit differenzierte Reaktionen des Immunsystems auslösen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Erforschung der Immunreaktion von Epithelzellen auf unterschiedliche Biofilme zu etablieren.

Dazu wurden komplexe Biofilme verschiedener Reifestadien unter weitgehend physiologischen Bedingungen herangezogen. Zum Vergleich wurden aus den Einzelspezies *S. mitis* bzw. *S. mutans* bestehende Biofilme angezchtet. Als Modell für epitheliale Zellen wurden HaCaT-Zellen mit den unterschiedlichen Biofilmen stimuliert und ihre Expression immunmodulatorischer Moleküle mittels semi-quantitativer PCR untersucht. Im Ergebnis waren die relativen Expressionen von AMPs wie PSO und hBD-2 nach Stimulation mit dem kommensalen Keim *S. mitis* am höchsten, während sie nach Stimulation mit dem pathogenen Keim *S. mutans* nach spätestens 36 h am niedrigsten waren. Umgekehrt resultierte die Stimulation mit *S. mutans* in den höchsten Induktionswerten von Mediatormolekülen wie IL-8 und 5-LO über den gesamten Stimulationszeitraum, während die Stimulation mit natürlicher Plaque zu den niedrigsten führte. Diese Ergebnisse sind im Rahmen der Theorie einer Koevolution zwischen Mensch und Mikroorganismen nachvollziehbar.

In Bezug auf die Handhabung, die Aussagekraft als auch die erzielten Ergebnisse erscheint die in dieser Arbeit vorgestellte Methode als eine aussichtsreiche Grundlage zur weiteren Erforschung der Immunreaktion von Epithelzellen auf Biofilme - und wurde mittlerweile mit ähnlichen Ergebnissen auch auf orale Epithelzellen angewendet.

7 Literaturverzeichnis

1. Wade, W., *Unculturable bacteria in oral biofilms.*, in *Dental plaque revisited. Oral biofilms in health and disease.*, H.N. Newman and M. Wilson, Editors. 1999, BioLine: Cardiff. 313-322.
2. Svensater, G., et al., *The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces.* Caries Res, 2003. **37**(6): 395-403.
3. Davey, M.E. and G.A. O'Toole, *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.* Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2000. **64**(4): 847–867.
4. Freeman, C. and M.A. Lock, *The biofilm polysaccharide matrix: A buffer against changing organic substrate supply?* Limnology and Oceanography, 1995. **40**(2): 273–278.
5. Kidd, E., *Caries control from cradle to grave.* Dental update, 2010. **37**(10): 651-652, 654-656.
6. Liljemark, W.F., et al., *Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management.* Advances in dental research, 1997. **11**(1): 14–23.
7. Scannapieco, F.A. and M.J. Levine, *Saliva and dental pellicles.*, in *Contemporary periodontics* R.J. Genco, H.M. Goldman, and D.W. Cohen, Editors. 1990, Mosby: St. Louis. 117.
8. Gibbons, R.J., D.I. Hay, and D.H. Schlesinger, *Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of Streptococcus gordonii to apatitic surfaces.* Infection and immunity, 1991. **59**(9): 2948–2954.
9. Cucarella, C., et al., *Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation.* Journal of bacteriology, 2001. **183**(9): 2888–2896.
10. Rupp, M.E., et al., *Characterization of Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model.* Infect Immun, 1999. **67**(5): 2656-2659.
11. Cowan, M.M., K.G. Taylor, and R.J. Doyle, *Energetics of the initial phase of adhesion of Streptococcus sanguis to hydroxylapatite.* Journal of bacteriology, 1987. **169**(7): 2995–3000.
12. Diamond, G., et al., *Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA.* Proceedings

- of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(9): 3952–3956.
13. Bowden, G.H., *The role of microbiology in models of dental caries: Reaction paper*. Advances in Dental Research (Adv Dent Res), 1995. **9**(3): 255–269.
 14. Frias, J., E. Olle, and M. Alsina, *Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules*. Infection and immunity, 2001. **69**(5): 3431–3434.
 15. Kolenbrander, P.E., et al., *Communication among oral bacteria*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2002. **66**(3): 486-505, table of contents.
 16. Suntharalingam, and D.G. Cvitkovitch, *Quorum sensing in streptococcal biofilm formation*. Trends Microbiol, 2005. **13**(1): 3-6.
 17. Li, Y.H., et al., *Natural genetic transformation of Streptococcus mutans growing in biofilms*. Journal of bacteriology, 2001. **183**(3): 897–908.
 18. Miller, M.B. and B.L. Bassler, *Quorum sensing in bacteria*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: 165-199.
 19. Kievit, T.R.d. and B.H. Iglewski, *Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships*. Infection and immunity, 2000. **68**(9): 4839–4849.
 20. Parsek, M.R. and E.P. Greenberg, *Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8789-8793.
 21. Surette, M.G., M.B. Miller, and B.L. Bassler, *Quorum sensing in Escherichia coli, Salmonella typhimurium, and Vibrio harveyi: a new family of genes responsible for autoinducer production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): 1639-1644.
 22. Bassler, B.L., *How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing*. Current opinion in microbiology, 1999. **2**(6): 582–587.
 23. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science (New York, N, 1999. **284**(5418): 1318–1322.
 24. Plagmann, H.C., *Lehrbuch der Parodontologie*. 1998.
 25. König, K.G., *Karies und Parodontopathien. Ätiologie und Prophylaxe*. 1987, Stuttgart: Thieme.
 26. Weiger, R., et al., *Microbial vitality of supragingival dental plaque during initial stages of experimental gingivitis in humans*. J Periodontal Res, 1995. **30**(3): 204-209.
 27. Kolenbrander, P.E. and J. London, *Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence*. Journal of bacteriology, 1993. **175**(11): 3247–3252.

28. Masius, H., *Untersuchungen zur Ökologie oraler Mikroorganismen in subgingivalen Biofilmen mit Hilfe der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH)*. , in *Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité*. 2001, Humboldt-Universität: Berlin.
29. Jenkinson, H.F. and R.J. Lamont, *Streptococcal adhesion and colonization*. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists, 1997. **8**(2): 175–200.
30. Theilade, J., *Dental Plaque and dental calculus*, in *Textbook of clinical periodontology*, J. Lindhe, Editor. 1983, Munksgaard: Copenhagen.
31. Yamada, T., K. Igarashi, and M. Mitsutomi, *Evaluation of Cariogenicity of Glycosylsurose by a New Method to Measure pH under Human Dental Plaque In Situ*. Journal of Dental Research, 1980. **59**: 2157-2162.
32. Svensater, G., et al., *Acid tolerance response and survival by oral bacteria*. Oral Microbiol Immunol, 1997. **12**(5): 266-273.
33. Vickerman, M.M., D.B. Clewell, and G.W. Jones, *Sucrose-promoted accumulation of growing glucosyltransferase variants of Streptococcus gordonii on hydroxyapatite surfaces*. Infect Immun, 1991. **59**(10): 3523-3530.
34. Rosan, B. and R.J. Lamont, *Dental plaque formation*. Microbes Infect, 2000. **2**(13): 1599-1607.
35. Hamada, S. and H.D. Slade, *Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans*. Microbiological reviews, 1980. **44**(2): 331–384.
36. Marsh, P.D., *Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease*. Adv Dent Res, 1994. **8**(2): 263-271.
37. Marsh, P.D., *Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries*. Dent Clin North Am, 1999. **43**(4): 599-614, v-vi.
38. Marsh, P.D. and D.J. Bradshaw, *Physiological approaches to the control of oral biofilms*. Adv Dent Res, 1997. **11**(1): 176-185.
39. Bradshaw, D.J., A.S. McKee, and P.D. Marsh, *Prevention of population shifts in oral microbial communities in vitro by low fluoride concentrations*. Journal of dental research, 1990. **69**(2): 436–441.
40. Marsh, P.D. and D.J. Bradshaw, *Dental plaque as a biofilm*. J Ind Microbiol, 1995. **15**(3): 169-175.
41. Pratten, J. and M. Wilson, *Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(7): 1595-1599.

42. Bradshaw, D.J., et al., *A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms*. The Journal of applied bacteriology, 1996. **80**(2): 124–130.
43. Marsh, P.D., *Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries*. Caries Res, 1993. **27 Suppl 1**: 72-76.
44. Embleton, J.V., H.N. Newman, and M. Wilson, *Influence of growth mode and sucrose on susceptibility of Streptococcus sanguis to amine fluorides and amine fluoride-inorganic fluoride combinations*. Applied and environmental microbiology, 1998. **64**(9): 3503–3506.
45. Marsh, P.D., *Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis*. J Dent Res, 1992. **71**(7): 1431-1438.
46. McKee, A.S., et al., *The establishment of reproducible, complex communities of oral bacteria in the chemostat using defined inocula*. J Appl Bacteriol, 1985. **59**(3): 263-275.
47. Millward, T.A. and M. Wilson, *The effect of chlorhexidine on Streptococcus sanguis biofilms*. Microbios, 1989. **58**(236-237): 155-164.
48. Schierholz, J.M., et al., *Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria*. Zentralbl Bakteriologie, 1999. **289**(2): 165-177.
49. Jefferson, K.K., *What drives bacteria to produce a biofilm?* FEMS microbiology letters, 2004. **236**(2): 163–173.
50. Stoodley, P., et al., *Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(12): 5608-5613.
51. Chung, W.O. and B.A. Dale, *Differential utilization of nuclear factor-kappaB signaling pathways for gingival epithelial cell responses to oral commensal and pathogenic bacteria*. Oral microbiology and immunology, 2008. **23**(2): 119–126.
52. Feng, Z., et al., *Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by Candida albicans*. Journal of dental research, 2005. **84**(5): 445–450.
53. Joly, S., et al., *Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms*. Journal of clinical microbiology, 2004. **42**(3): 1024–1029.
54. Lehrer, R.I. and T. Ganz, *Defensins of vertebrate animals*. Current opinion in immunology, 2002. **14**(1): 96–102.
55. Murakami, M., et al., *Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva*. J Dent Res, 2002. **81**(12): 845-850.

56. Premratanachai, P., et al., *Expression and regulation of novel human beta-defensins in gingival keratinocytes*. Oral Microbiol Immunol, 2004. **19**(2): 111-117.
57. Eberhard, J., et al., *The stage of native biofilm formation determines the gene expression of human beta-defensin-2, psoriasin, ribonuclease 7 and inflammatory mediators: a novel approach for stimulation of keratinocytes with in situ formed biofilms*. Oral microbiology and immunology, 2008. **23**(1): 21–28.
58. Glaser, R., et al., *Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection*. Nature immunology, 2005. **6**(1): 57–64.
59. Harder, J. and J.-M. Schröder, *RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(48): 46779–46784.
60. Huttner, K.M. and C.L. Bevins, *Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense*. Pediatric research, 1999. **45**(6): 785–794.
61. Hancock, R.E. and M.G. Scott, *The role of antimicrobial peptides in animal defenses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(16): 8856–8861.
62. Krisanaprakornkit, S., et al., *Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue*. Infection and immunity, 1998. **66**(9): 9.
63. Selsted, M.E. and A.J. Ouellette, *Mammalian defensins in the antimicrobial immune response*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): 551-557.
64. Valore, E.V., et al., *Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues*. J Clin Invest, 1998. **101**(8): 1633-1642.
65. Ziegler, A., et al., *Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): 4216-4220.
66. Dale, B.A., *Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease*. Periodontology 2000, 2002. **30**: 70–78.
67. Singh, P.K., et al., *Production of beta-defensins by human airway epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): 14961-14966.
68. Goebel, C., et al., *Determination of defensin HNP-1, HNP-2, and HNP-3 in human saliva by using LC/MS*. Peptides, 2000. **21**(6): 757–765.
69. Mizukawa, N., et al., *Levels of human defensin-1, an antimicrobial peptide, in saliva of patients with oral inflammation*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1999. **87**(5): 539-543.

70. Kuramitsu, H.K., *Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics*. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists, 1993. **4**(2): 159–176.
71. Dale, B.A., et al., *Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva*. Journal of periodontal research, 2001. **36**(5): 285–294.
72. Abiko, Y., et al., *Pattern of expression of beta-defensins in oral squamous cell carcinoma*. Cancer letters, 1999. **143**(1): 37–43.
73. Mathews, M., et al., *Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands*. Infect Immun, 1999. **67**(6): 2740-2745.
74. Mizukawa, N., et al., *Presence of human beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma*. Anticancer Res, 2000. **20**(3b): 2005-2007.
75. Diamond, G., J.P. Russell, and C.L. Bevins, *Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(10): 5156–5160.
76. Schonwetter, B.S., E.D. Stolzenberg, and M.A. Zasloff, *Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation*. Science, 1995. **267**(5204): 1645-1648.
77. Zhao, C., I. Wang, and R.I. Lehrer, *Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells*. FEBS Lett, 1996. **396**(2-3): 319-322.
78. Cole, A.M., P. Dewan, and T. Ganz, *Innate antimicrobial activity of nasal secretions*. Infection and immunity, 1999. **67**(7): 3267–3275.
79. Crabtree, J.E., et al., *Modulation of Helicobacter pylori induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by cag PAI encoded VirD4 homologue*. Journal of clinical pathology, 1999. **52**(9): 653–657.
80. Sahasrabudhe, K.S., et al., *Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva*. J Dent Res, 2000. **79**(9): 1669-1674.
81. O'Toole, G.A. and R. Kolter, *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Mol Microbiol, 1998. **30**(2): 295-304.
82. Harder, J., et al., *A peptide antibiotic from human skin*. Nature, 1997. **387**(6636): 861.
83. Harder, J., et al., *Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2000. **22**(6): 714–721.

84. Chung, W.O., et al., *Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease*. Current pharmaceutical design, 2007. **13**(30): 3073–3083.
85. Diamond, G. and C.L. Bevins, *Endotoxin upregulates expression of an antimicrobial peptide gene in mammalian airway epithelial cells*. Chest, 1994. **105**(3 Suppl): 51S-52S.
86. Krisanaprakornkit, S., et al., *Inducible expression of human beta-defensin 2 by Fusobacterium nucleatum in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier*. Infection and immunity, 2000. **68**(5): 2907–2915.
87. O'Neil, D.A., et al., *Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium*. J Immunol, 1999. **163**(12): 6718-6724.
88. Russell, J.P., et al., *Coordinate induction of two antibiotic genes in tracheal epithelial cells exposed to the inflammatory mediators lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha*. Infect Immun, 1996. **64**(5): 1565-1568.
89. Dale, B.A. and L.P. Fredericks, *Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease*. Current issues in molecular biology, 2005. **7**(2): 119–133.
90. Lu, Q., et al., *Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia*. J Periodontal Res, 2005. **40**(6): 474-481.
91. Lu, Q., et al., *Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis*. J Periodontal Res, 2004. **39**(4): 221-227.
92. Dommisch, H., et al., *Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases*. Oral microbiology and immunology, 2005. **20**(3): 186–190.
93. Dunsche, A., et al., *The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues*. European journal of oral sciences, 2002. **110**(2): 121–124.
94. Bissell, J., et al., *Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease*. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, 2004. **33**(5): 278–285.
95. Friedrich, C.L., et al., *Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(26): 24015–24022.

96. Haeggstrom, J.Z. and C.D. Funk, *Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease*. Chem Rev, 2011. **111**(10): 5866-5898.
97. Brock, T. and M. Lesperance, *Leukotriene Synthesis by Epithelial Cells of Human Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*. The Internet Journal of Pathology., 1999. **1**(1).
98. Jame, A.J., et al., *Human bronchial epithelial cells express an active and inducible biosynthetic pathway for leukotrienes B4 and C4*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(6): 880-892.
99. Janssen-Timmen, U., et al., *Expression of 5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): 6966-6970.
100. Marsh, P.D., et al., *Community development in a mixed species oral biofilm*, in *The life and death of biofilm.*, J.W.T. Wimpenny, Editor. 1995, BioLine. 181.
101. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates*. Comptes rendus biologies, 2004. **327**(6): 539–549.
102. Dale, B.A. and S. Krisanaprakornkit, *Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity*. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, 2001. **30**(6): 321–327.
103. Seymour, R.A. and P.A. Heasman, *Pharmacological control of periodontal disease. II. Antimicrobial agents*. J Dent, 1995. **23**(1): 5-14.
104. Weinberg, A., S. Krisanaprakornkit, and B.A. Dale, *Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications*. Crit Rev Oral Biol Med, 1998. **9**(4): 399-414.
105. Bradshaw, D.J. and P.D. Marsh, *Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms*. Methods in enzymology, 1999. **310**: 279–296.
106. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. Annual review of microbiology, 1995. **49**: 711–745.
107. Fine, D.H., *Chemical agents to prevent and regulate plaque development*. Periodontology 2000, 1995. **8**: 87–107.
108. Kolenbrander, P.E., *Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems*. Annual review of microbiology, 2000. **54**: 413–437.
109. Phillips, P.L., et al., *Biofilme Einfach erklart*. Wounds International, 2010. **1**(3).
110. Valle, J., et al., *Biofilm switch and immune response determinants at early stages of infection*. Trends Microbiol, 2013. **21**(8): 364-371.

111. Stewart, P.S., et al., *Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(2): 836-838.
112. Gilbert, P. and D.G. Allison, *Laboratory methods for biofilm production*, in *Microbial biofilms: formation and control.*, S.P. Denyer, S.P. Gorman, and M. Sussman, Editors. 1993, Blackwell Scientific Publications London, UK. 29–49.
113. Marsh, P.D., *The role of microbiology in models of dental caries*. Adv Dent Res, 1995. **9**(3): 244-54; discussion 255-269.
114. Tatevossian, A., *Film fermenters in dental research*. In: *CRC handbook of laboratory model systems for microbial ecosystems*, in *CRC handbook of laboratory model systems for microbial ecosystems.*, J.W.T. Wimpenny, Editor. 1988, CRC Press Inc.: Boca Raton, Florida. 197-227.
115. Wimpenny, J.W., *The validity of models*. Adv Dent Res, 1997. **11**(1): 150-159.
116. Wimpenny, J.W.T., S.L. Kinniment, and M.A. Scourfield, *The physiology and biochemistry of biofilm.*, in *Microbial biofilms: formation and control.* , S.P. Denyer, S.P. Gorman, and M. Sussman, Editors. 1993, Blackwell Scientific Publications: London, UK. 51-94.
117. Moore, W.E. and L.V. Moore, *The bacteria of periodontal diseases*. Periodontol 2000, 1994. **5**: 66-77.
118. Socransky, S.S., et al., *Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque*. J Periodontal Res, 1977. **12**(2): 90-106.
119. Marsh, P.D., *Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions*. Journal of Dental Research, 1989. **68**: 1567–1575.
120. Marsh, P.D., *The significance of maintaining the stability of the natural microflora of the mouth*. Br Dent J, 1991. **171**(6): 174-177.
121. Sissons, C.H., et al., *pH responses to sucrose and the formation of pH gradients in thick 'artificial mouth' microcosm plaques*. Arch Oral Biol, 1992. **37**(11): 913-22.
122. Sissons, C.H., et al., *A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization*. J Dent Res, 1991. **70**(11): 1409-1416.
123. Sissons, C.H., T.W. Cutress, and E.I. Pearce, *Kinetics and product stoichiometry of ureolysis by human salivary bacteria and artificial mouth plaques*. Arch Oral Biol, 1985. **30**(11-12): 781-790.

124. Sissons, C.H., E.M. Hancock, and T.W. Cutress, *The source of variation in ureolysis in artificial plaques cultured from human salivary bacteria*. Arch Oral Biol, 1988. **33**(10): 721-726.
125. Sissons, C.H., et al., *The bacteria responsible for ureolysis in artificial dental plaque*. Arch Oral Biol, 1988. **33**(10): 727-733.
126. Sissons, C.H., L. Wong, and T.W. Cutress, *Patterns and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms*. Oral Microbiol Immunol, 1995. **10**(3): 160-167.
127. Sissons, C.H., L. Wong, and T.W. Cutress, *Regulation of Urease Levels in Microcosm Plaque Dental*. Microbial Ecology in Health and Disease, 1995. **8**(5): 219-224.
128. Sissons, C.H., L. Wong, and T.W. Cutress, *Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaques*. Arch Oral Biol, 1996. **41**(1): 27-34.
129. Sissons, C.H., et al., *pH gradients induced by urea metabolism in 'artificial mouth' microcosm plaques*. Arch Oral Biol, 1994. **39**(6): 507-511.
130. Sissons, C.H., et al., *The pH response to urea and the effect of liquid flow in 'artificial mouth' microcosm plaques*. Arch Oral Biol, 1994. **39**(6): 497-505.
131. Bradshaw, D.J., et al., *Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin*. Microbiology (Reading, England), 1994. **140 (Pt 12)**: 3407-3412.
132. Bradshaw, D.J., et al., *The effects of triclosan and zinc citrate, alone and in combination, on a community of oral bacteria grown in vitro*. Journal of dental research, 1993. **72**(1): 25-30.
133. Bradshaw, D.J., A.S. McKee, and P.D. Marsh, *Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro*. Journal of dental research, 1989. **68**(9): 1298-1302.
134. Kinniment, S.L., et al., *Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter*. Microbiology (Reading, England), 1996. **142 (Pt 3)**: 631-638.
135. Kinniment, S.L., et al., *The effect of chlorhexidine on defined, mixed culture oral biofilms grown in a novel model system*. The Journal of applied bacteriology, 1996. **81**(2): 120-125.
136. Marsh, P.D., et al., *Factors affecting the development and composition of defined mixed culture biofilms of oral bacteria.*, in *Bacterial biofilms and their control in medicine and industry: contributions made at the inaugural meeting of the British Biofilms Club held at Gregynog Hall, Powys, 31 March-2 April, 1993*, B.B. Club and J.W.T. Wimpenny, Editors. 1994, BioLine. 194.

137. Marsh, P.D., *The role of continuous culture in modelling the human microflora*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 1995. **64**(1): 1-9.
138. Bowden, G.H. and Y.H. Li, *Nutritional influences on biofilm development*. Advances in dental research, 1997. **11**(1): 81–99.
139. Burne, R.A., Y.Y. Chen, and J.E. Penders, *Analysis of gene expression in Streptococcus mutans in biofilms in vitro*. Advances in dental research, 1997. **11**(1): 100–109.
140. Keevil, C.W., et al., *Microbial film formation: dental plaque deposition on acrylic tiles using continuous culture techniques*. The Journal of applied bacteriology, 1987. **62**(2): 129–138.
141. Li, Y.H. and G.H. Bowden, *Characteristics of accumulation of oral gram-positive bacteria on mucin-conditioned glass surfaces in a model system*. Oral microbiology and immunology, 1994. **9**(1): 1–11.
142. Li, Y.H. and G.H. Bowden, *The effect of environmental pH and fluoride from the substratum on the development of biofilms of selected oral bacteria*. Journal of dental research, 1994. **73**(10): 1615–1626.
143. Li, Y.H. and G.H. Bowden, *Carbon source, environmental pH and accumulation of two species biofilms (abstract)*. Journal of dental research, 1996: 205.
144. Peters, A. and J.W.T. Wimpenny, *A constant-depth laboratory model film fermenter*. , in *CRC handbook of laboratory model systems for microbial ecosystems.*, J.W.T. Wimpenny, Editor. 1988, CRC Press: Boca Raton, Florida. 175-195.
145. Brex, M., et al., *Early formation of dental plaque on plastic films. 2. Electron microscopic observations*. Journal of periodontal research, 1981. **16**(2): 213–227.
146. Boyar, R.M., et al., *The microflora associated with the development of initial enamel decalcification below orthodontic bands in vivo in children living in a fluoridated-water area*. Journal of dental research, 1989. **68**(12): 1734–1738.
147. Robinson, C., et al., *A quantitative site-specific study of plaque biofilms formed in vivo (abstract)*. . J Dent Res, 1996(75): 232.
148. Nyvad, B., *Microbial colonization of human tooth surfaces*. 1993, University of Aarhus, Denmark.: Copenhagen.
149. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. The Journal of cell biology, 1988. **106**(3): 761–771.
150. Harle-Bachor, C. and P. Boukamp, *Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin*

- keratinocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(13): 6476–6481.
151. Lehmann, T.A., et al., *p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines*. Carcinogenesis, 1993. **14**: 833–839.
 152. Boukamp, P., et al., *Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT*. Genes, chromosomes & cancer, 1997. **19**(4): 201–214.
 153. Boukamp, P., H.T. Rupniak, and N.E. Fusenig, *Environmental modulation of the expression of differentiation and malignancy in six human squamous cell carcinoma cell lines*. Cancer research, 1985. **45**(11 Pt 2): 5582–5592.
 154. Rekus, M.T., *Characterization of growth and differentiation of a spontaneously immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) in a defined, serum-free culture system*, in *Medizinische Fakultät 2000*, Heinrich-Heine-Universität: Düsseldorf.
 155. Gursoy, U.K., E. Könönen, and V.J. Uitto, *Stimulation of epithelial cell matrix metalloproteinase (MMP-2, -9, -13) and interleukin-8 secretion by fusobacteria*. Oral microbiology and immunology, 2008. **23**(5): 3.
 156. Li, M., et al., *Arecoline inhibits epithelial cell viability by upregulating the apoptosis pathway: implication for oral submucous fibrosis*. Oncol Rep, 2014. **31**(5): 2422-8.
 157. Avezov, K., A.Z. Reznick, and D. Aizenbud, *Time and dose effects of cigarette smoke and acrolein on protein carbonyl formation in HaCaT keratinocytes*. Adv Exp Med Biol, 2015. **849**: 57-64.
 158. Nakamura, S., et al., *Nicotine induces upregulated expression of beta defensin-2 via the p38MAPK pathway in the HaCaT human keratinocyte cell line*. Med Mol Morphol, 2010. **43**(4): 204-210.
 159. Lee, H.J., et al., *Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes*. J Oral Pathol Med, 2005. **34**(7): 436-443.
 160. Merne, M., et al., *Effects of snuff extract on epithelial growth and differentiation in vitro*. Oral Oncol, 2004. **40**(1): 6-12.
 161. Jensen, P.O., et al., *The immune system vs. Pseudomonas aeruginosa biofilms*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **59**(3): 292-305.
 162. Guggenheim, B., et al., *Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque*. Journal of dental research, 2001. **80**(1): 363–370.

163. ten Cate, J.M., *Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque*. Odontology, 2006. **94**(1): 1-9.
164. Meyer-Hoffert, U., et al., *Supernatants of Pseudomonas aeruginosa induce the Pseudomonas-specific antibiotic elafin in human keratinocytes*. Exp Dermatol, 2003. **12**(4): 418-425.
165. Wehkamp, J., et al., *NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium*. Infect Immun, 2004. **72**(10): 5750-5758.
166. Sissons, C.H., *Artificial dental plaque biofilm model systems*. Adv Dent Res, 1997. **11**(1): 110-126.
167. Ramberg, P., et al., *Bacterial colonization during de novo plaque formation*. J Clin Periodontol, 2003. **30**(11): 990-995.
168. Feucht, E.C., C.L. DeSanti, and A. Weinberg, *Selective induction of human beta-defensin mRNAs by Actinobacillus actinomycetemcomitans in primary and immortalized oral epithelial cells*. Oral microbiology and immunology, 2003. **18**(6): 359-363.
169. Liu, A.Y., et al., *Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation*. The Journal of investigative dermatology, 2002. **118**(2): 275-281.
170. Vankeerberghen, A., et al., *Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells*. J Periodontol, 2005. **76**(8): 1293-1303.
171. Chung, W.O. and B.A. Dale, *Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species*. Infection and immunity, 2004. **72**(1): 352-358.
172. Darveau, R.P., et al., *Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for Porphyromonas gingivalis*. Infection and immunity, 1998. **66**(4): 1660-1665.
173. Moughal, N.A., et al., *Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis*. J Periodontal Res, 1992. **27**(6): 623-630.
174. Nylander, K., et al., *Expression of the endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) on endothelial cells in experimental gingivitis in humans*. J Periodontol, 1993. **64**(5): 355-357.

175. Tonetti, M.S., et al., *Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections*. *Infect Immun*, 1994. **62**(9): 4005-4014.
176. Yumoto, H., et al., *Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 are induced in human oral epithelial cells in response to exposure to periodontopathic Eikenella corrodens*. *Infect Immun*, 1999. **67**(1): 384-394.
177. Eberhard, J., et al., *The immune response of oral epithelial cells induced by single-species and complex naturally formed biofilms*. *Oral Microbiol Immunol*, 2009. **24**(4): 325-330.

8 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Christof Dörfer, Leiter der Klinik für konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Betreuungsübernahme der vorliegenden Arbeit nach dem Weggang von Herrn Professor Dr. Jörg Eberhard und dafür, dass er mich in jeglicher Hinsicht bei meinem Dissertationsvorhaben unterstützt hat.

Weiterer Dank gilt Herrn Professor Dr. Jörg Eberhard, zum Zeitpunkt der Doktorarbeit Oberarzt an der Klinik für konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die freundliche Überlassung des Themas.

Ich danke Frau Professor Dr. Birte Größner-Schreiber für die Unterstützung bei den Vorbereitungen zur Disputation der vorliegenden Arbeit.

Besonders herzlich möchte ich mich bei den MTA Frau Mojgan Paymard und Frau Regina Marquardt bedanken für die hilfreiche Unterstützung bei der Anzucht der Zellen und der Bakterienkulturen sowie dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. H. Albers, zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführungen Leiter der Klinik für konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel dafür, dass ich in seiner Abteilung die praktischen Versuche durchführen konnte.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Falk, der mir bezüglich der mikrobiologischen Untersuchungen und Nachweise und der Erklärung der entsprechenden Vorgehensweisen behilflich war.

Ich bedanke mich bei Frau Professor Dr. Kneist aus Jena, die den für die vorliegende Arbeit Bakterienstamm der *S. mitis*-Kulturen zur Verfügung stellte.

Vielen Dank möchte ich auch an Frau Nermin Kirbudak aussprechen für die Herstellung der Halteplatten und die Bereitstellung der Materialien.

Des Weiteren danke ich Frau Marion Gorzitze, die mir bei der Beschaffung der Literatur behilflich war.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Lothar Marischen, durch dessen tatkräftige und beratende Unterstützung zu jeder Zeit die vorliegende Arbeit zu dem wurde was sie jetzt ist.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben und mir in jeder Hinsicht stets beiseite standen. Genauso möchte ich Barbara Grimm danken, die mich während der gesamten Studienzeit begleitet und unterstützt hat.

Weiteren Dank an:

Carsten Hellkötter

Robert Vollenbruk

Stefan Flader

Lilian Sperlich

Katrin Kurzmann

Maik Swienty

Melanie Swienty-Reidenbach

Catrin Bruhn

u.v.a.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Robert Pietschmann
Geburtsdatum,-ort: 14.04.1979 in Kiel
Anschrift: Stromeyerstr. 4
24116 Kiel
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. Norbert Pietschmann, Allgemeinarzt
Helga Pietschmann, geb. Grönwaldt, Arzthelferin

Schulbildung:

1985-1990 Gerhardt-Hauptmann-Grundschule, Kiel
1990-1996 Theodor-Storm-Realschule, Kiel
1996-1999 Ludwig-Erhard-Gymnasium, Kiel
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1999-2000 Kindertagesstätte Michaelis, Kiel

Hochschulausbildung:

2000-2008

Studium der Zahnmedizin an der
Christian- Albrechts-Universität in Kiel

12.07.2008

Staatsexamen

29.07.2008

Approbation