Streptococcus mutans – Systembiologische Aspekte und *in vivo* Inhibition mittels Carolacton

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Anke Rheinberg geb. Brock

aus Stolberg (Rheinland)

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Georg Conrads
Universitätsprofessor Dr.-Ing. Lars Blank

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Mai 2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Zitierbare Artikel

- Lifu Song, Padhmanand Sudhakar, Wei Wang, Georg Conrads, **Anke Brock**, Jibin Sun, Irene Wagner-Döbler & An-Ping Zeng (2012). A genome-wide study of two-component signal transduction systems in eight newly sequenced mutans streptococci strains. *BMC Genomics* **13**:128
- **Anke Rheinberg**, Izabela Jadwiga Swierzy, Tuan Dung Nguyen, Hans-Peter Horz & Georg Conrads (2013). Cryptic *Streptococcus mutans* 5.6-kb plasmids encode a toxin-antitoxin system for plasmid stabilization. *Journal of Oral Microbiology* **5**: 19729
- Lifu Song, Wei Wang, Georg Conrads, **Anke Rheinberg**, Helena Sztajer, Michael Reck, Irene Wagner-Döbler & An-Ping Zeng (2013). Genetic variability of mutans streptococci revealed by wide whole-genome sequencing. *BMC Genomics* **14**: 430
- Christian Apel, Andree Barg, **Anke Rheinberg**, Georg Conrads & Irene Wagner-Döbler (2013). Dental composite materials containing carolacton inhibit biofilm growth of Streptococcus mutans. *Dental Materials* **29**: 1188-1199

Zitierbare Abstracts

- Christian Apel, Andree Barg, **Anke Rheinberg**, Georg Conrads & Irene Wagner-Döbler. Carolacton incorporated into dental composite materials inhibits biofilm growth of *Streptococcus mutans* (2013). *Caries Research* 47:433-531 (ORCA Congress 2013)
- **Anke Rheinberg**, Lifu Song, Wie Wang, Michael Reck, Irene Wagner-Döbler, An-Ping Zeng & Georg Conrads. Key differences in the metabolom between *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* as determined by whole-genome comparison of multiple strains (2013). *International Journal of Medical Microbiology* 303S1: 49 (Posterpräsentation, DGHM 2013, Rostock)
- **Anke Rheinberg**, Karsten Henne, Hendrik Meyer-Lückel & Georg Conrads. Detection of *Scardovia wiggsiae* and *Bifidobacterium dentium* in caries lesions – a pilot study (2013). *International Journal of Medical Microbiology* 303S1: 96 (Posterpräsentation, DGHM 2013, Rostock)
- **Anke Rheinberg**, Izabela Swierzy, Tuan Dung Nguyen, Hans-Peter Horz & Georg Conrads. *Streptococcus mutans* 5.6kb plasmids encode a Toxin-Antitoxin system for plasmid stabilization and possibly enhancing fitness (2013). *International Journal of Medical Microbiology* 303S1: 96 (Posterpräsentation, DGHM 2013, Rostock)

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 13
1.1. Karies – Ein weltweites Problem 13
1.2. Die Mundflora des Menschen 14
1.3. Kariesassoziierte Bakterien 15
1.3.1. Laktobazillen 16
1.3.2. Streptokokken und *Streptococcus mutans* 16
1.3.3. Aktinobakterien 19
1.3.3.1. *Scardovia wiggsiae* 19
1.3.3.2. Bifidobacteriaceae und *Bifidobacterium dentium* 21
1.3.4. Weitere Zusammensetzung der Mundflora 22
1.4. Biofilme und deren Bedeutung für die Umwelt 22
1.4.1. Biofilme im Mund – Plaque 24
1.5. Carolacton 25
1.6. Zwei-Komponenten Signalsysteme in Streptokokken 27
1.7. Plasmide und Toxin-Antitoxin Systeme 29
1.8. Laktat Oxidase und Pyruvat Oxidase 32
1.9. Serotypisierung von *S. mutans* Stämmen mittels *in silico* PCR 33
1.10. Ziele der Arbeit 33
2. Material und Methoden 35
2.1. Verwendete Materialien 35
2.2. Puffer und weitere Lösungen 35
2.3. Mikroorganismen 36
2.4. Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen 37
2.5. Animpfen von Kulturen 37
2.5.1. Animpfen von Kulturen aus der Instituts-Stammsammlung (-70°C) 37
2.5.2. Animpfen von Kulturen aus der Stammsammlung DSMZ 37
2.6. Herstellung von Stammkulturen mittels einer Cryobank™ 38
2.7. Gramfärbung 38
2.8. Mikroskopische Aufnahmen 38
2.9. Tierversuche zur antikariogenen Wirkung des Biofilminhibitors Carolacton 38
2.9.1. Versuchstiere 38
2.9.2. Versuchsaufbau 39
2.9.3. Tierversuch 1: Carolacton als Additiv im Zahnlack 39

2.9.3.1. Markierung und Gruppierung der Tiere 40
2.9.3.2. Ernährung der Tiere 40
2.9.3.3. Zeitlicher Ablauf des ersten Tierversuchs 2010 40
2.9.3.4. Reduktion der Keimzahl und Kontrolle 41
2.9.3.5. Narkotisierung der Tiere 41
2.9.3.6. Lackierung der Molaren 42
2.9.3.7. Gezielte Ansiedlung mit dem Karieserreger *S. mutans* 42
2.9.3.7.1. Herstellung der konzentrierten *S. mutans* Zellsuspension 43
2.9.3.7.2. Bestimmung der Zellzahl 43
2.9.3.7.3. Inokulation der Ratten mit der *S. mutans* Zellsuspension 43
2.9.3.8. Auswertung 44
2.9.3.8.1. Molekulargenetischer Nachweis von *S. mutans* 44
2.9.3.8.2. Versuchsende und Präparation der Kiefer 44
2.9.3.8.3. Plaquefärbung 44
2.9.3.8.4. Kariesfärbung 45
2.9.3.9. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Rattenkiefer 46
2.9.3.10. EDX-Analyse 46
2.9.4. Tierversuch 2: Carolacton als Additiv im Trinkwasser 46
2.9.4.1. Markierung und Gruppierung der Tiere 47
2.9.4.2. Ernährung der Tiere 47
2.9.4.3. Zeitlicher Ablauf des zweiten Tierversuchs 2011 47
2.9.4.4. Keimzahlreduktion und Ansiedlung mit *S. mutans* 48
2.9.4.5. Trinkwasserzusätze 48
2.9.4.5.1. Herstellung der Fluorid-Stammlösung 48
2.9.4.5.2. Herstellung der Carolacton-Stammlösungen 48
2.9.4.6. Mundspüllösung 48
2.9.4.6.1. Herstellung der Fluoridlösung 49
2.9.4.6.2. Herstellung der Carolactonlösungen 49
2.9.4.7. Festlegung des Versuchsendes 49
2.9.4.8. Auswertung 49
2.10. DNA-Extraktion 49
2.10.1. Zusätzliche Schritte bei der DNA-Extraktion aus Probekörpern 50
2.10.2. Enzymatischer Zellaufschluss bei grampositiven Bakterien 50
2.10.3. DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA mini Kit (250) 50

2.11. Polymerase-Kettenreaktion 51
2.11.1. Durchführung der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion 51
2.11.2. Agarose-Gelelektrophorese 52
2.11.3. Durchführung der real-time quantitativen PCR 53
2.11.4. Auswertung der quantitativen real-time PCR 53
2.12. Primerdesign 54
2.13. Sequenzierung 55
2.13.1. Aufreinigung der PCR-Produkte 55
2.13.2. Sequenzierungsreaktion 55
2.13.3. Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion 56
2.13.4. Sequenzierung 56
2.13.5. Auswertung der Sequenzierungsergebnisse 57
2.14. Zellzahlbestimmung 57
2.15. *In silico* Serotypisierung von *S. mutans* 57
2.16. Nachweis der Two-Component Systems 57
2.17. Nachweis chromosomaler TA-Systeme in *S. mutans* 58
2.18. Nachweis der Laktat-Oxidase in *S. sobrinus* 58
2.19. Entwicklung einer neuen Karies-PCR 58
2.19.1. Pilot-Studie mit Patientenproben 59
3. Ergebnisse 60
3.1. Ergebnisse der Tierversuche 60
3.1.1. Ergebnisse Tierversuch 1 – Carolacton als Additiv im Zahnlack 60
3.1.1.1. Reduktion der natürlichen Rattenflora vor Inokulation 60
3.1.1.2. Zellzahlbestimmung des *S. mutans* Inokulums 61
3.1.1.3. Molekulargenetische Auswertung des ersten Tierversuchs 62
3.1.1.3.1. Erster Abstrich - Überprüfung auf erfolgreiche Ansiedlung 64
3.1.1.3.2. Zweiter Abstrich - vor der zweiten Lackbehandlung 64
3.1.1.3.3. Dritter Abstrich - Einfluss der zweiten Lackbehandlung 65
3.1.1.3.4. Vierter Abstrich - Bestimmung der Zellzahl am Versuchsende 65
3.1.1.3.5. Ergebnisübersicht aller Abstriche 66
3.1.1.4. Zahnmedizinische Auswertung des ersten Tierversuchs 68
3.1.1.4.1. Plaquefärbung 68
3.1.1.4.2. Kariesfärbung und Auswertung 69
3.1.1.5. Nachweis von *S. mutans*-Zellen durch REM-Aufnahmen 72

3.1.1.6. Ergebnis der EDX-Analyse 75
3.1.2. Ergebnisse Tierversuch 2 – Carolacton als Additiv im Trinkwasser 76
3.1.2.1. Kontrolle zur Reduktion der Keimzahl 76
3.1.2.2. Gewichtsentwicklung der Tiere im 2. Versuch (2011) 77
3.1.2.3. Bestimmung der Zellzahl der *S. mutans* Zellsuspensionen 78
3.1.2.4. Molekulargenetische Auswertung des zweiten Tierversuchs 78
3.1.2.4.1. Erster Abstrich - Überprüfung auf erfolgreiche Ansiedlung 80
3.1.2.4.2. Zweiter Abstrich 80
3.1.2.4.3. Dritter Abstrich – Bestimmung der Zellzahl am Versuchsende 80
3.1.2.4.4. Ergebnisübersicht aller Abstriche 81
3.1.2.5. Festlegung des Versuchsendes 83
3.1.2.6. Zahnmedizinische Auswertung des zweiten Tierversuchs 83
3.1.2.6.1. Plaquefärbung 83
3.1.2.6.2. Kariesfärbung und Auswertung 84
3.2. *In silico* Serotypisierung von *Streptococcus mutans* 86
3.3. Zwei-Komponenten Signalsysteme 87
3.4. Toxin-Antitoxin Systeme 89
3.4.1. Nachweis der chromosomal kodierten TA-Systeme durch PCR 89
3.4.2. Sequenzanalysen der verschiedenen TA-Systeme 90
3.4.2.1. *mazE* (Antitoxin) 90
3.4.2.2. *mazF* (Toxin) 91
3.4.2.3. *hicB* (Antitoxin) 92
3.4.2.4. *hicA* (Toxin) 93
3.4.2.5. Chromosomale und plasmidkodierte *relBE*-Systeme 94
3.4.3. Homologieanalyse des *relBE*-Systems mittels I-Tasser 97
3.5. Laktat-Oxidase 98
3.5.1. Nachweis der Laktat-Oxidase in *S. sobrinus* durch PCR 99
3.5.2. Computergestützte Genomanalysen 100
3.6. Entwicklung einer neuen Karies PCR 100
3.6.1. *Scardovia wiggsiae* 101
3.6.2. Nachweis der Gattung *Bifidobacterium* 102
3.6.2.1. Genus-spezifische PCR 102
3.6.2.2. Spezies-spezifische PCR 103
3.7. Pilot-Studie zum Nachweis von *S. wiggsiae* und *B. dentium* 105

4. Diskussion 109
4.1. Einsatz von Carolacton *in vivo* 109
4.1.1. Carolacton als Additiv im Zahnlack 110
4.1.2. Carolacton als Trinkwasserzusatz 113
4.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vivo* Experimente 116
4.2. *In silico* Serotypisierung von *Streptococcus mutans* 118
4.3. Zwei-Komponenten Signalsysteme (TCS) 118
4.4. Toxin-Antitoxin-Systeme 120
4.5. Laktat-Oxidase 123
4.6. Entwicklung einer neuen Karies-PCR und Durchführung der Pilot-Studie 125
4.7. Ausblick 129
5. Zusammenfassung / Summary 131
6. Literatur 137
7. Anhang 149
7.1. Verwendete Materialien 149
7.1.1. Verwendete Chemikalien und Kits 149
7.1.2. Verwendete Verbrauchsmaterialien 151
7.1.3. Verwendete Geräte 152
7.1.4. Verwendete Software 154
7.2. Ohrmarkierung der Versuchstiere 156
7.3. Zeitlicher Ablaufplan des Tierversuchs 2010 157
7.4. Übersicht über die Gesamtdaten des ersten Rattenversuchs 158
7.4.1. Zellzahlen der Abstriche 158
7.4.1.1. Zellzahlen des ersten Abstrichs 2. November 2010 158
7.4.1.2. Zellzahlen des ersten Abstrichs nach dem Kontrollabstrich 159
7.4.1.3. Zellzahlen des zweiten Abstrichs 25. November 2010 160
7.4.1.4. Zellzahlen des dritten Abstrichs 2. Dezember 2010 161
7.4.1.5. Zellzahlen des letzten Abstrichs 26./27. Dezember 2010 162
7.4.2. Ergebnisse des Karies-Scoring nach Keyes zum ersten Versuch 163
7.5. Zeitlicher Ablaufplan des Tierversuchs 2011 164
7.6. Übersicht über die Gesamtdaten des zweiten Rattenversuchs 165
7.6.1. Zellzahlen der Abstriche 165
7.6.1.1. Zellzahlen des ersten Abstrichs 6. Juni 2011 165
7.6.1.2. Zellzahlen des zweiten Abstrichs 22. Juni 2011 166

7.6.1.3. Zellzahlen des letzten Abstrichs 6. Juli 2011 168
7.6.2. Ergebnisse des Karies-Scoring zum zweiten Versuch 169
7.6.2.1. Karies-Scoring nach Keyes 169
7.6.2.2. Karies-Scoring nach Larson 171
7.7. Gewichtsentwicklung der Tiere im zweiten Versuch 172
7.7.1. Gewichtsentwicklung in der Fluoridgruppe 172
7.7.2. Gewichtsentwicklung in der Carolacton A Gruppe 173
7.7.3. Gewichtsentwicklung in der Carolacton B Gruppe 173
7.8. Verwendete Primer (konventionelle und qPCR) 174
7.9. Sequenzvergleich der Ergebnisse der *in silico*-Typisierung 178
7.9.1. Ergebnisse für den Serotyp C 178
7.9.2. Ergebnisse für den Serotyp F 179
7.10. *Scardovia* und *Bifidobacterium* Standardwerte für die qPCR 180
7.10.1. *S. mutans* Standardwerte 180
7.10.2. *S. wiggsiae* Standardwerte 180
7.10.3. *B. dentium* Standardwerte 180
7.11. Laktat- und Pyruvat-Oxidase 181
7.12. Ergebnisse der Pilot-Studie (Nachweis von *S. wiggsiae* und *B. dentium*) .. 183
7.13. DNA-Ladder 184
III. Abbildungsverzeichnis 185
IV. Tabellenverzeichnis 189
Danksagung 192
Erklärung 193
Lebenslauf 194

II. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenintriphosphat
BHI	Brain Heart Infusion (Nährmedium)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CFU	colony forming units (= koloniebildende Einheiten)
CP	crossing point
Dm	Dentin medium caries (mittlere Dentinkaries)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Ds	Dentin surface caries (oberflächliche Dentinkaries)
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
Dx	Dentin deep caries (tiefe Dentinkaries)
E	Enamel Caries (Schmelzkaries)
EC-Nummer	Enzyme Commission Nummer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (energy dispersive X-ray spectroscopy)
EME	Elektronenmikroskopische Einrichtung (des Universitätsklinikums Aachen)
g	Gramm
g	Konstante für die Schwerebeschleunigung der Erde
G	Guanin

h	Stunde
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HOMD	Human Oral Microbiome Database
kb	Kilobase (= 1000 Basenpaare)
l	Liter
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
M	Formelzeichen für die molare Masse
Mbp	Megabasenpaar
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NC	Negativkontrolle (negative control)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
ppm	parts per million („Teile von einer Million“)
qPCR	quantitative real-time PCR
RDP	Ribosomal Database Project
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SD (SA)	Standard Deviation (=Standardabweichung)
SE	Standard Error (= Standardfehler)
T	Thymin
TADB	Toxin-Antitoxin Database

TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Enzymeinheit zur Angabe der Enzymaktivität)
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WHO	World Health Organization
ZPP	Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums Aachen

1. Einleitung

Das Thema der Dissertation befasst sich mit der Systembiologie des Karieserregers *Streptococcus mutans* und einigen eng verwandten Spezies sowie mit der selektiven *in vivo* Inhibition von *S. mutans* in Biofilmen durch eine aus Myxobakterien isolierte neue antimikrobielle Substanz, dem Carolacton. Die Systembiologie versucht Organismen in ihrer Gesamtheit zu betrachten und zu verstehen. Die im Rahmen der Dissertation betrachteten Aspekte umfassen neben dem Biofilminhibitor Carolacton unter anderem Zwei-Komponenten Signalsysteme (Two Component Systems), Toxin-Antitoxin Systeme, Plasmide, Komponenten des für die Kariogenese wichtigen Laktat-Stoffwechsels und die Serotypisierung verschiedener *S. mutans* Stämme mit Hilfe der *in silico* PCR.

1.1. Karies – Ein weltweites Problem

Die regelmäßige Kontrolle der Zähne durch den Zahnarzt ist wichtig, aber es kostet eine Menge Menschen ein großes Maß an Überwindung zum Zahnarzt zu gehen. Viele Patienten haben Angst vor Schmerzen, dem Bohren, einer hohen Rechnung und / oder Löchern in den Zähnen, sprich Karies. Das deutsche Wort Karies leitet sich vom lateinischen caries ab und bedeutet wörtlich übersetzt „(Zahn-)Fäulnis“ (*1*). Was viele jedoch nicht wissen ist, dass Karies eine Infektionskrankheit ist, die durch Bakterien verursacht wird (*2*)(*3*)(*4*). Bereits 1890 postulierte Willoughby D. Miller mit seiner chemoparasitären Theorie, dass Karies durch Säuren verursacht wird, die durch Bakterien innerhalb der Mundhöhle produziert werden (*5*). Bei einer stark zuckerhaltigen Ernährung wird vor allem die in der Nahrung enthaltene Saccharose vermehrt in Milchsäure umgewandelt. Dadurch wird dem Zahnschmelz Calcium entzogen, was den Abbau des Zahnhartgewebes durch die Bakterien begünstigt und die Entstehung von Karies fördert (*6*)(*7*)(*8*)(*9*). Allerdings ist eine zuckerhaltige Ernährung nicht die einzige Ursache, da Karies eine multifaktoriell bedingte Krankheit ist. Das Zusammenspiel von mehreren direkten oder indirekten Faktoren entscheidet über die Entstehung von Karies. Dabei spielen neben der Ernährung auch die Prädisposition des Wirtes, die Mundflora und die Mundhygiene aber auch das Alter und der sozioökonomische Status eine Rolle (siehe Abbildung 1)(*6*).

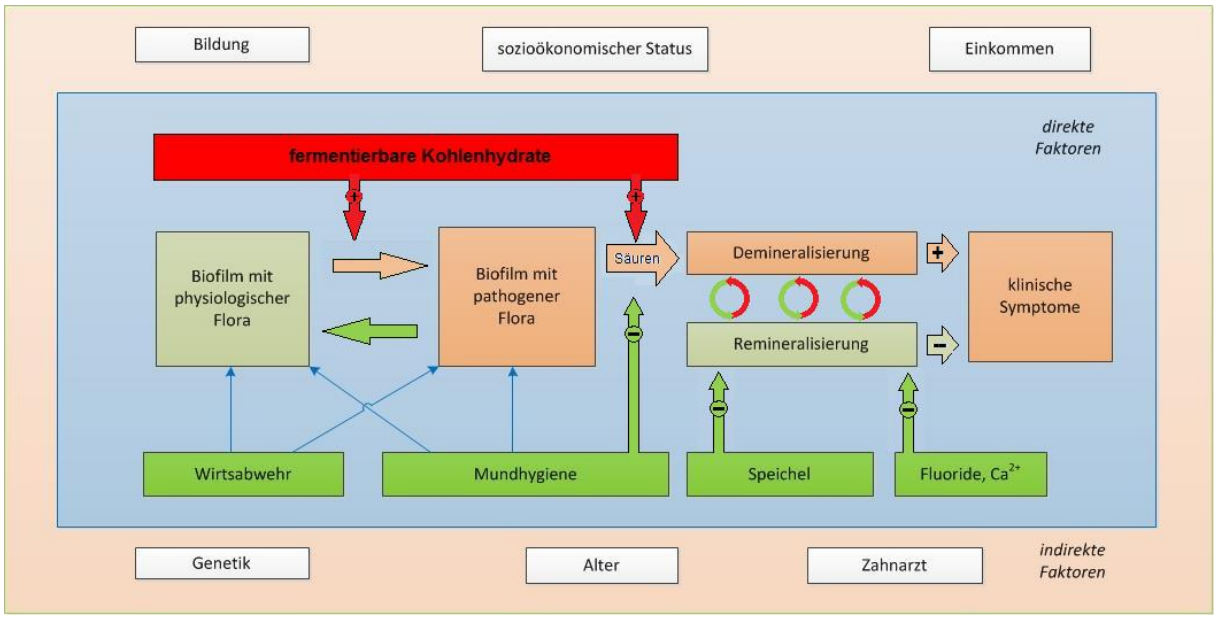


Abbildung 1: Graphische Darstellung verschiedener Einflussfaktoren auf die Bildung von Karies (rot = negativ, grün = positiv) (*6*)

Karies ist eine weltweit verbreitete Krankheit, die jährlich Kosten in Milliardenhöhe verursacht (*10*). Nach Angaben der World Health Organisation (WHO) weisen weltweit 60-90% der Schulkinder und nahezu 100% der Erwachsenen Karies auf (*11*). Die Karies-Prävalenz variiert stark nach geographischer Lage, Erreichbarkeit und Zugang zu dentaler Gesundheitsfürsorge. Allgemein ist die Prävalenz unter armen und sozial benachteiligten Menschen deutlich höher (*11*). Eine Reduktion der Karieserkrankungen könnte alleine in Deutschland Kosten in Millionenhöhe einsparen und ist damit sehr erstrebenswert. Für das Verständnis eines komplexen Prozesses, wie der Kariogenese, ist es wichtig die daran beteiligten Faktoren genauer zu betrachten. Dazu zählen u. a. die Mundflora des Menschen und die karies-assoziierten Bakterien, sowie deren Metabolom und verschiedene Virulenzfaktoren.

1.2. Die Mundflora des Menschen

Der menschliche Körper bietet eine optimale Ansiedlungsfläche für Mikroorganismen verschiedenster Art. Ein durchschnittlicher Erwachsener besteht aus ca. $1x10^{13}$ menschlichen Zellen sowie ca. $1x10^{14}$ bakteriellen Zellen (*12*). Unsere Haut, die Schleimhäute aber auch der Gastrointestinaltrakt bieten einen vielseitigen Lebensraum für die unterschiedlichsten Mikroorganismen.

Einer der heterogensten und komplexesten Lebensräume im menschlichen Körper ist die Mundhöhle (*1*). Einerseits ist es dort warm und feucht, eine Kombination die für Bakterien ideal ist. Es gibt harte und weiche Oberflächen zur Anlagerung und zusätzlich ist der Durchsatz an Nährstoffen besonders hoch. Andererseits ist Speichel kein gutes Wachstumsmedium. Im Tagesverlauf schwankt die Nährstoffkonzentration stark und ist teilweise - z. B. nachts - sehr niedrig. Außerdem beinhaltet Speichel antimikrobielle Stoffe wie Lysozym und Lactoperoxidase, die das Wachstum von Bakterien inhibieren (*6*)(*13*)(*1*). Im besten Fall entsteht im Laufe der Zeit eine Art Kommensalismus zwischen dem Menschen, der als Wirt fungiert, und den besiedelnden Mikroorganismen (*14*). Dieses Gleichgewicht ist jedoch sehr fragil und kann leicht durch die Einnahme von Medikamenten, z. B. Antibiotika oder bestimmten Hormonen, zerstört werden (*8*). Ferner kann ein geschwächtes Immunsystem die Mundflora aus dem Gleichgewicht bringen, sodass die Entstehung von Karies oder Parodontopathien gefördert wird (*14*)(*15*)(*8*).

Die Besiedlung des Menschen durch Mikroorganismen beginnt direkt nach der Geburt durch exogene Ereignisse (*16*)(*8*)(*17*). Dabei werden Bakterien von den Eltern oder anderen nahen Verwandten, z. B. durch Küssen, auf das Kind übertragen (*18*)(*19*)(*20*). In umfangreichen Studien wurden bislang über 680 verschiedene Bakterienarten und (Hefe-)Pilze in der Mundhöhle nachgewiesen (*21*)(*22*)(*23*). Der Nachweis der unterschiedlichen Bakterien gelingt oftmals nur über ihre DNA, da die Kultivierung vieler oraler Bakterien noch immer nicht möglich ist (*24*)(*25*). Die Human Oral Microbiome Database (HOMD, http://www.homd.org/index.php) bietet eine Übersicht über die bisher identifizierten oralen Bakterienspezies (aktuell 688 Taxa, Stand: Februar 2014) und schlägt ein einheitliches Schema zur Benennung neuer Spezies vor (*26*)(*22*).

1.3. Kariesassoziierte Bakterien

Bis in die 1960iger Jahre wurden Laktobazillen als wahrscheinlichste Pathogene für die Entstehung von Karies favorisiert (*6*)(*27*). Nach und nach rückten innerhalb dieser Gruppe immer mehr die Streptokokken in den Vordergrund und dort vor allem *Streptococcus mutans* (*6*)(*27*). Auf Grund dieser Annahme entwickelte sich im Bereich der Zahnmedizin die spezifische Plaquehypothese die besagt, dass die Mutans-Streptokokken bzw. *S. mutans* als alleinige Karieserreger in Frage kommen (*6*)(*9*)(*28*). Allerdings macht *S. mutans* nur einen kleinen Teil der Plaqueflora aus und

wird nicht immer in kariogenen Läsionen nachgewiesen. Überdies kann *S. mutans* in Plaque gefunden werden, aus der sich keine Karies entwickelt (*29*)(*30*)(*31*). Gegenwärtig wird die ökologische Plaquehypothese am häufigsten anerkannt. Sie beruht auf der Tatsache, dass eine hohe Verfügbarkeit von Zucker eine ökologische Verschiebung in der Plaquemikroflora verursacht, die Karies fördernde Bedingungen schafft (*6*)(*32*)(*33*)(*34*). Neben Laktobazillen wurden mittlerweile in vielen kariogenen Läsionen auch verschiedene Aktinobakterien nachgewiesen, wie z. B. *Scardovia wiggsiae* (*35*)(*36*)(*37*) oder *Bifidobacterium dentium* (*35*)(*37*). Im Folgenden werden einige der mutmaßlichen Karieserreger genauer beschrieben.

1.3.1. Laktobazillen

Die Laktobazillen (Milchsäurebakterien) fallen in die Gruppe der Firmicutes, einer großen Gruppe grampositiver Bakterien. Sie standen lange im Verdacht die Haupterreger der Karies zu sein (*6*). Laktobazillen sind sowohl sehr acidophil als auch sehr acidogen. Alle Bakterien dieser Ordnung sind in der Lage über die Milchsäuregärung Zucker zu Milchsäure bzw. Laktat zu verstoffwechseln (*1*).

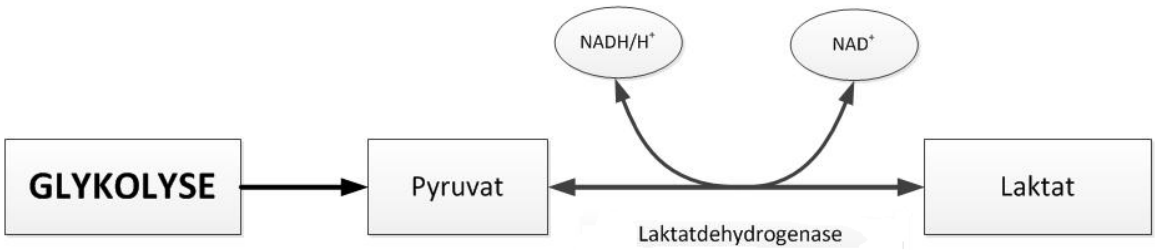


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Umwandlung von Pyruvat zu Laktat während der Milchsäuregärung durch die Laktat-Dehydrogenase

Milchsäure ist mit einem *pK*s-Wert von 3,86 bei 25°C eine stärkere Säure als Essigsäure (*pK*s-Wert: 4,76 bei 25°C) und kann daher die kristalline Struktur der Zähne stark schädigen (*6*)(*38*). Der Effekt wird in der Zahnmedizin als kariogener Säureangriff bezeichnet und führt zur Demineralisierung des Zahnhartgewebes (*6*).

1.3.2. Streptokokken und *Streptococcus mutans*

Die Streptokokken zählen zur Ordnung der Laktobazillen. Streptokokken sind kokkoide, grampositive, aerotolerante, unbewegliche, nicht-sporen-bildende, Katalase- und Oxidase-negative Bakterien (*12*). Viele Arten der Streptokokken gehören zur physiologischen Flora des Menschen, u. a. *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. constellatus* oder *S. oralis*. Sie besiedeln die Schleimhäute (Mund, Nase,

Urogenitaltrakt), die Haut, den Darm und den oberen respiratorischen Trakt (*12*). Unter bestimmten Umständen können sie Krankheiten wie z. B. Sepsis, Meningitis oder Pneumonien auslösen (*12*)(*1*). Weitere wichtige Vertreter der Streptokokken sind *S. sobrinus*, *S. sanguinis* und *S. ratti*.

Tabelle 1: Übersicht über die Systematik der Streptokokken

Systematik	
Domäne	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Klasse	Bacilli
Ordnung	Lactobacillales
Familie	Streptococcaceae
Gattung	*Streptococcus*
Spezies	*S. constellatus* *S. mitis* *S. mutans* *S. oralis* *S. pneumoniae* *S. pyogenes* *S. ratti* *S. salivarius* *S. sanguinis* *S. sobrinus* *etc.*

S. sobrinus zählt ähnlich wie *S. mutans* zu den Haupterregern der Karies (*1*). In dieser Arbeit liegt ein besonderes Augenmerk auf *Streptococcus mutans*, einem der Haupterreger von kariogenen Läsionen.

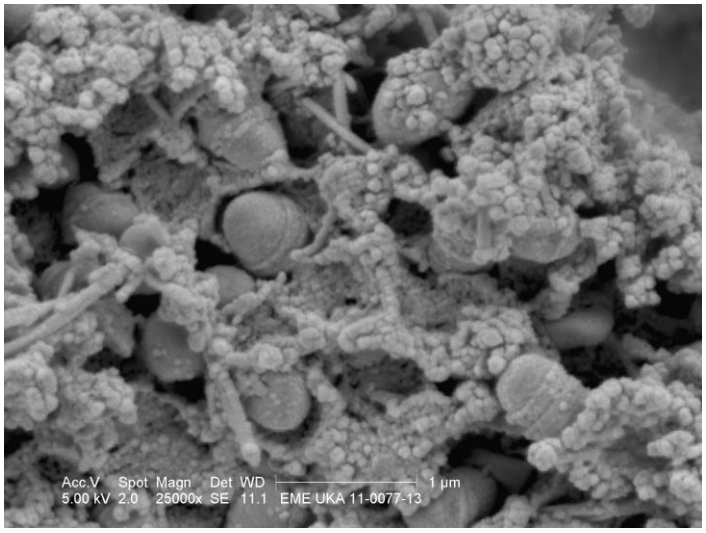


Abbildung 3: REM-Aufnahme von *Streptococcus mutans*-Zellen im Biofilm einer kariösen Läsion bei einer Ratte (25.000fache Vergrößerung)

S. mutans zählt zu den so genannten Viridans-Streptokokken, einem noch stets gebräuchlichen Laborjargon ohne taxonomischen Anspruch. Diese Gruppe umfasst grob alle vergrünenden Streptokokken (*39*). Innerhalb dieser Gruppe gibt es eine Untergruppe der Mutans-Streptokokken. Die evolutionäre Entwicklung von *S. mutans* beginnt vor etwa 10.000 Jahren und fällt interessanterweise mit der Etablierung der Landwirtschaft zusammen. Der damit verbundene Nahrungswechsel, sprich die Verfügbarkeit von Kristallzucker, führte zur exponentiellen Ausbreitung von *S. mutans* (*40*). *Streptococcus mutans* weist verschiedene Virulenzfaktoren auf, die ihm das Überleben unter den harschen Bedingungen der Mundhöhle erleichtern. Streptokokken sind sehr acidotolerant und können bei niedrigen pH-Werten gut wachsen. Sie bilden Mutacine, die das Wachstum anderer, speziell verwandter Bakterien hemmen (*41*)(*42*)(*43*).

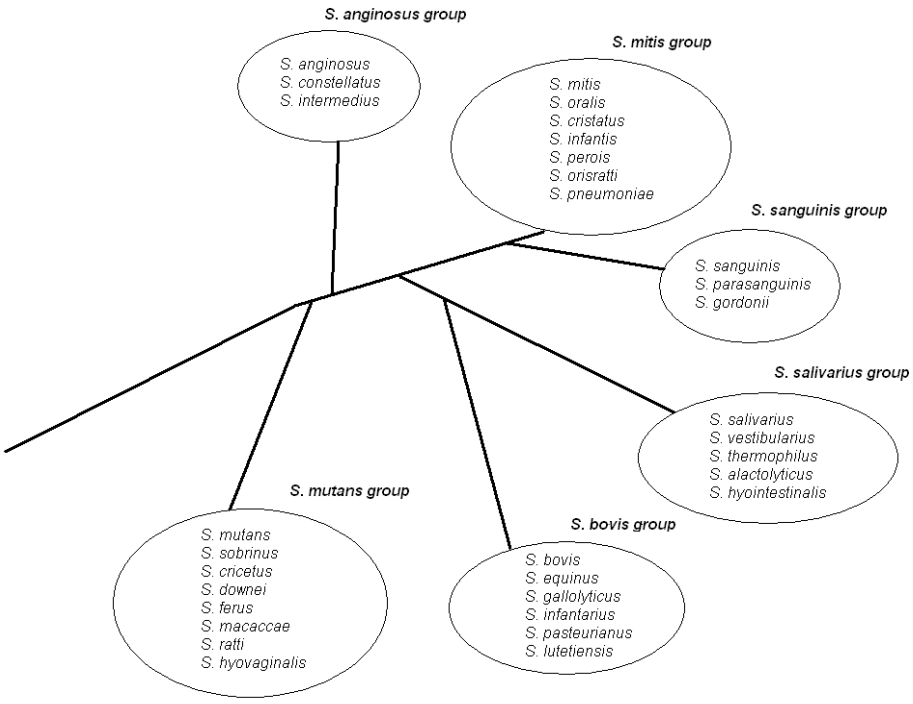


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Viridans-Streptokokken in Anlehnung an (*44*)(*39*)(*45*)

Mutans-Streptokokken wachsen oft in dichten Biofilmen, die ihnen einen sehr guten Schutz z. B. gegenüber Antibiotika verleihen. Des Weiteren verfügen sie über ein großes Repertoire weiterer Virulenzfaktoren, die Ihnen einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Bakterien verschaffen können.

1.3.3. Aktinobakterien

Die Aktinobakterien (Phylum Actinobacteria) umfassen die zweite große Gruppe der grampositiven Bakterien, allerdings weisen sie im Vergleich zu den Firmicutes einen höheren GC-Gehalt auf (*46*). In den letzten Jahren sind immer wieder Vertreter aus dieser Gruppe bei kariogenen Erkrankungen gefunden worden, u.a. *Scardovia wiggsiae* und *Bifidobacterium dentium*.

1.3.3.1. *Scardovia wiggsiae*

Scardovia wiggsiae zählt zur Familie der Bifidobacteriaceae und ist ein grampositives, anaerobes, nicht-sporen-bildendes und unbewegliches Stäbchen. Die Zellen sind pleomorph, d. h. sie können gerade, leicht gebogen und / oder keulenförmig vorliegen. Die Zellen können einzeln, in Paaren oder in kurzen Ketten angeordnet vorkommen (*36*)(*47*)(*48*). *Scardovia wiggsiae* ist erst vor ein paar Jahren in den Fokus der Forschung als Karieserreger gerückt. In mehreren Studien konnte

nachgewiesen werden, dass *S. wiggsiae* anscheinend eine nicht unbedeutende Rolle bei der Entstehung von Early Childhood Caries (ECC)[1] bzw. von White-Spots Lesions (WSL)[2] bei Patienten mit Zahnspangen spielt (*35*)(*37*).

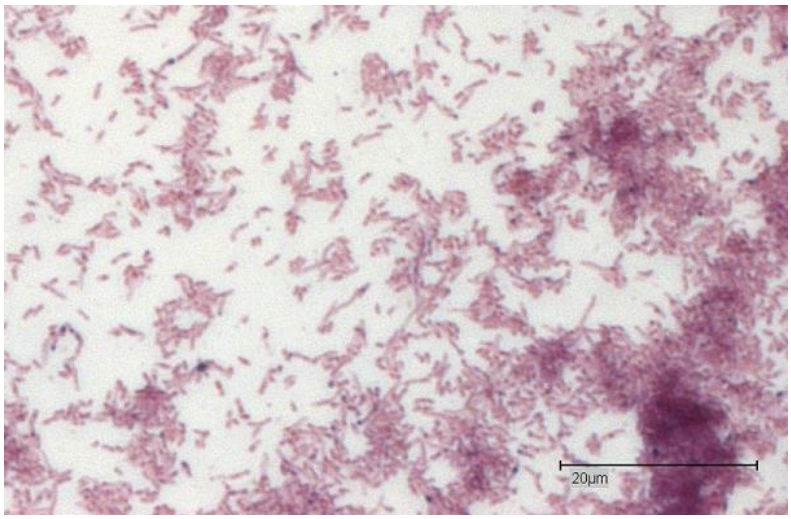


Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahme von *S. wiggsiae* (nach Gram-Färbung, 100er Objektiv)

Tabelle 2: Übersicht über die Systematik der Gattung *Scardovia*

Systematik	
Domäne	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Klasse	Actinobacteria
Unterklasse	Actinobacteridae
Ordnung	Bifidobacteriales
Familie	Bifidobacteriaceae
Gattung	*Scardovia*
Spezies	*Scardovia inopiata* *Scardovia wiggsiae*

[1] Auch Nursing-Bottle Syndrom oder Fläschchenkaries genannt, Kariesform an den Milchzähnen von Kleinkindern (hervorgerufen durch stark gezuckerte Getränke und häufiges Nuckeln an der Flasche)

[2] Als White Spot Lesions (Initialkaries) werden die ersten klinischen Anzeichen für Karies bezeichnet. Es handelt sich dabei um „entkalkte“, also decalcifizierte, Stellen im Zahnhartgewebe, die als weiße Punkte sichtbar sind.

1.3.3.2. Bifidobacteriaceae und *Bifidobacterium dentium*

Bifidobakterien sind ebenfalls grampositive, anaerobe, nicht-sporen-bildende und unbewegliche Zellen (*12*)(*49*). Bei den Bifidobakterien handelt es sich um keulenförmig aufgetriebene und stark verzweigte Zellen (*49*). Ihren Namen verdanken sie ihrer typischen Form, das lateinische Wort „bifidus“ heißt übersetzt „gespalten“ oder „gabelförmig“ (siehe Abbildung 6). *Bifidobacterium dentium* wurde erstmals 1974 von Scardovi und Crociani beschrieben und wurde damals aus kariogenen Läsionen isoliert (*49*). Andere Bifidobakterien gehören zur physiologischen Flora des menschlichen Gastrointestinaltraktes, unter anderem *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum* und *B. infantis* (*12*). Die Bifidobakterien sind eng mit *Scardovia* verwandt. Im Rahmen der Arbeit soll ein PCR-Protokoll etabliert werden, dass den Nachweis von *S. wiggsiae* und *B. dentium* in kariogenen Läsionen ermöglicht.

Tabelle 3: Übersicht über die Systematik der Bifidobacteriaceae

Systematik	
Domäne	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Klasse	Actinobacteria
Unterklasse	Actinobacteridae
Ordnung	Bifidobacteriales
Familie	Bifidobacteriaceae
Gattung	*Bifidobacterium*
Spezies	*Bifidobacterium adolescentis* *Bifidobacterium bifidum* *Bifidobacterium breve* *Bifidobacterium dentium* *Bifidobacterium infantis* *Bifidobacterium longum* etc.

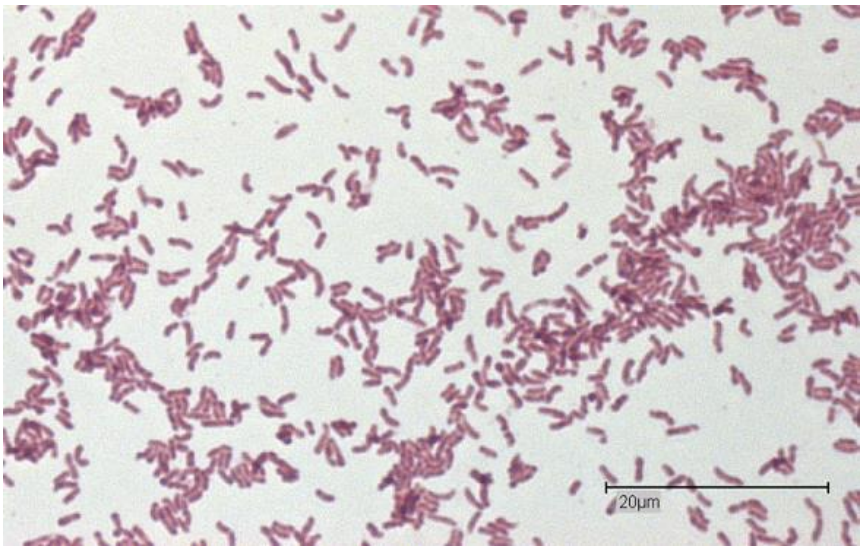


Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme von *B. dentium* (nach Gram-Färbung, 100er Objektiv)

1.3.4. Weitere Zusammensetzung der Mundflora

Neben den oben beschriebenen Bakterien spielen folgende Gattungen eine weitere Rolle in der oralen Mikroflora: Enterokokken, Staphylokokken, Mikrokokken, Veillonella, Aktinomyzeten, Eubakterien, Neisserien, Moraxella, Prevotella, Fusobakterien, Porphyromonaden und viele andere. Neben der großen Vielzahl an Bakterien findet man natürlich auch Viren, Protozoen oder Hefepilze (z. B. Candida) in der Mundhöhle (*50*)(*8*). Entscheidend ist, dass jeder Mensch seine eigene Mikroflora besitzt, die sich in Abhängigkeit seiner Ernährungs- und Hygienegewohnheiten entwickelt. Die einzelnen Bakterien verbindet die Fähigkeit gut innerhalb der feindlichen Mundflora überleben zu können. Eine Möglichkeit die eigenen Überlebenschancen zu steigern ist das Wachstum in einem Biofilm.

1.4. Biofilme und deren Bedeutung für die Umwelt

Mikrobielle Biofilme bilden sich aus Bakterienpopulationen, die sich in wässrigen Systemen an Grenzflächen zwischen zwei Phasen ansiedeln und vermehren (*1*)(*51*). Biofilme sind in der Regel von einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) umgeben, die umgangssprachlich oft als „Schleim“ bezeichnet wird (*51*). Biofilme kommen ubiquitär vor, man findet sie in Seen und Flüssen aber auch in Ölpipelines oder in Wasserbecken von Kernkraftwerken (*51*)(*52*). Fossile Funde belegen die Existenz von Biofilmen schon vor mehr als 3 Milliarden Jahren (*51*), was ihren evolutionären Erfolg verdeutlicht. Noch heute findet man an der Westküste Australiens sogenannte Stromatolithe. Dabei handelt es sich um biogene

Sedimentgesteine die durch Biofilmbildung entstanden sind (*53*). Die Entstehung eines Biofilms läuft klassischer Weise in mehreren Phasen ab: sie beginnt mit der Induktionsphase, an die sich die Akkumulationsphase anschließt, die schließlich in eine Existenzphase übergeht. Während der Induktionsphase lagern sich Bakterien an eine Oberfläche an. Die Anlagerung beginnt mit einer lockeren Bindung und bildet sich zu einer festen Adhäsion aus (siehe Abbildung 7 - Aufnahmen 1 und 2). Anschließend werden die Zellen immer mehr von adhäsiven Polysacchariden umgeben. Es bilden sich Mikrokolonien, die eine Anlagerung der Zellen erleichtern und ein Ablösen erschweren. In der Akkumulationsphase beginnt das Wachstum sowie die Reifung der Biofilme (Abbildung 7 - Aufnahmen 3 und 4). Biofilme breiten sich zuerst flächig und später dreidimensional aus. In der Existenzphase hat sich ein Gleichgewicht zwischen Zuwachs und Abbau des Biofilms eingestellt. Zellen können problemlos in den Biofilm hineintreten und ihn wieder verlassen (Abbildung 7 - Aufnahme 5)(Hall-Stoodley et al., 2004).

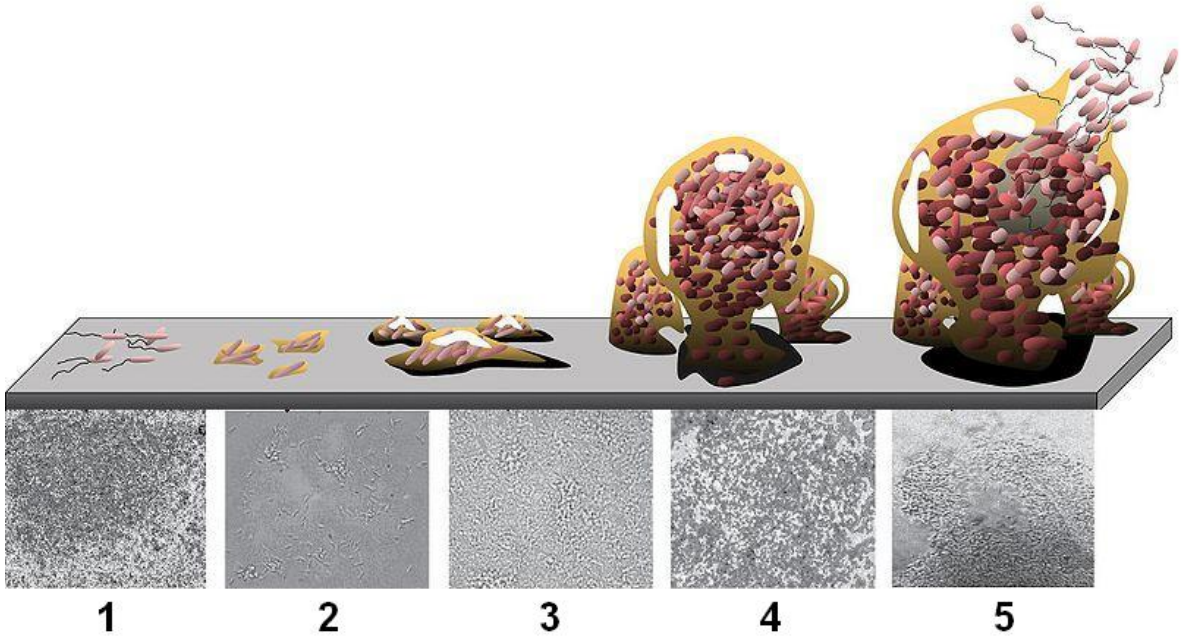


Abbildung 7: Die verschiedenen Phasen während der Biofilmbildung als graphische Darstellung und als mikroskopische Aufnahmen eines Biofilms von *Pseudomonas aeruginosa* (in Anlehnung an http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biofilm.jpg)

Biofilme haben für die Bakterien viele Vorteile, so sind bakterielle Zellen in Biofilmen ungefähr 1000fach resistenter gegenüber Antibiotika als planktonische Zellen der gleichen Art (*54*)(*51*). Um tieferliegende Zellen des Biofilms zu erreichen, werden deutlich höhere Antibiotikakonzentrationen benötigt als bei planktonischen Zellen. Zusätzlich schützt der Biofilm die Bakterien vor den natürlichen Abwehrreaktionen

des Immunsystems (*52*). Die enge Nachbarschaft im Biofilm begünstigt eine intensive „Kommunikation“ der Zellen untereinander. Diese Form der chemischen Kommunikation erfolgt mit Hilfe von Signalmolekülen („autoinducers“) und wird als Quorum sensing bezeichnet (*55*)(*56*). Über chemische Botenstoffe können bestimmte Gene reguliert, sprich an- oder abgeschaltet, werden. So kann unter anderem die Zelldichte einer Population bestimmt werden. Die Unterbrechung dieser Kommunikationsform wird als Quorum quenching bezeichnet (*55*)(*57*). Da innerhalb der letzten Jahrzehnte immer mehr pathogene Bakterien Resistenzen gegenüber konventionellen Antibiotika entwickelt haben, bietet die Erforschung von anti-Quorum sensing- bzw. Quorum quenching-Medikamenten eine wichtige Alternative zur konventionellen Antibiotika-Therapie. Da kein Selektionsdruck auf die Bakterien wirkt, wird die Entstehung von möglichen Resistenzen als deutlich geringer angesehen (*58*)(*57*)(*59*)(*60*)(*61*)(*62*).

Biofilme aus pathogenen Bakterien stellen heutzutage ein ernsthaftes Problem im Gesundheitswesen dar (*58*). Ungefähr zwei Drittel aller bakteriellen Infektionen beim Menschen werden durch biofilm-bildende Bakterien verursacht (*63*)(*58*). In Biofilmen organisierte Bakterien entziehen sich zudem gerne der kulturellen Anzucht und damit der Diagnose (*64*). Es ist daher von großem Interesse Biofilmbildung gezielt zu unterbinden und zu bekämpfen. Vor allem Patienten mit persistierenden, chronischen oder nosokomialen Erkrankungen sind betroffen (*54*)(*58*). Besonders anfällig für die Bildung von Biofilmen sind körperfremde Materialien wie Stents, (Dauer-)Katheter, Knochenimplantate oder künstliche Herzklappen (*58*). Aber auch parodontale Erkrankungen und Karies zählen zu den biofilmassoziierten Erkrankungen.

1.4.1. Biofilme im Mund – Plaque

Jeden Tag bildet sich auf unseren Zähnen frischer Zahnbelag, der auch Plaque genannt wird. Die Plaque ist ein komplexer Biofilm aus einer Vielzahl an Komponenten wie (Glyko-)Proteinen, Kohlenhydraten und Mineralien (*1*)(*8*). Sie bietet ideale Bedingungen zur Ansiedlung von Bakterien. Ein mg Plaque kann bis zu $1x10^8$ koloniebildende Einheiten beinhalten. Selbstreinigungsmechanismen wie Zungen- und Lippenbewegungen aber auch Hygienemaßnahmen, wie das tägliche Zähneputzen erschweren die Bildung von Plaque (*6*). Die Plaquebildung ist in der Regel dort am stärksten ausgeprägt, wo die Selbstreinigungsmechanismen der Mundhöhle nicht greifen (können). Besonders betroffen sind hiervon Zahnhälse,

Zahntaschen, der Interdentalraum und Fissuren (*6*)(*12*)(*8*)(*65*). Diese Stellen werden als Plaqueretentionsstellen bezeichnet und haben ein erhöhtes Kariesrisiko (*6*). Besonders bei den hinteren Molaren gibt es oft tiefe Fissuren auf den Okklusalflächen (Kauflächen). Dort ist eine manuelle und vollständige Entfernung des Zahnbelags, selbst durch regelmäßiges Zähneputzen, nahezu unmöglich. Daher ist es von großem Interesse Substanzen zu entwickeln, die das Bakterienwachstum inhibieren und so die Plaquebildung verringern. Eine verminderte Plaquebildung kann helfen das Risiko für Karies und parodontale Erkrankungen zu senken. Es gibt mittlerweile eine Vielzahl an unterschiedlichsten Produkten, die helfen sollen Karies zu verhindern. So beinhaltet z. B. pro-t-action® von BASF Laktobazillen, die die Verklumpung von Karieserregern fördern sollen, sodass diese verschluckt werden können (*66*). Über Fluorid weiß man, dass es auf Grund seiner Struktur die kristalline Struktur der Zähne verdichtet und so die Demineralisation erschwert (*6*)(*67*). Neben dem täglichen Zähneputzen mit z. B. fluoridhaltigen Zahncremes ist mittlerweile auch der Einsatz spezieller Lacke (zur Zahnversiegelung) und antimikrobieller Zusatzstoffe in Füllungen keine Seltenheit mehr. Seit einigen Jahren werden auch vermehrt metallische Nanopartikel wie Silber eingesetzt (*68*). Das vermehrte Auftreten von Resistenzen gegenüber herkömmlichen Antibiotika hat in den letzten Jahren eine neue Angst vor multiresistenten „superbugs“ (sprich: Superkeimen) hervorgerufen (*69*)(*57*)(*70*). Wie beim Quorum-quenching setzt man mittlerweile auf die Erforschung neuer Wirkstoffe, die ähnlich wie Umweltsignale in die Signalketten eingreifen und das Wachstum der Bakterien stoppen sollen. Ziel ist es durch geringe Manipulationen eine starke Wirkung zu erzeugen, die eine schnelle Resistenzentwicklung ausschließt (*71*). Ein neuer Wirkstoff zur potentiellen Biofilminhibition wurde im Rahmen der Arbeit erstmalig *in vivo* getestet: Carolacton.

1.5. Carolacton

Carolacton ist ein sekundäres Stoffwechselprodukt das bereits 1998 aus Zellextrakten des gram-negativen Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* (Stamm So ce96) isoliert wurde (*72*)(*73*). Myxobakterien sind gram-negative ubiquitär vorkommende Bodenbakterien, die zu dem Phylum der Proteobakterien zählen (*1*). Sie verfügen über einen sehr vielschichtigen Lebenszyklus, der bei Nährstoffmangel die Ausbildung von Fruchtkörpern und Sporen induziert. Dieses komplexe Verhalten spiegelt sich zudem in einem sehr großen Genom von bis zu 13Mbp wider (zum

Vergleich: *Escherichia coli* ca. 4,6Mbp, *S. mutans* 2Mbp) (*74*)(*12*)(*75*). Auf Grund der hohen Zahl an biologisch aktiven Substanzen wurde intensiv nach neuen Antibiotika unter den myxobakteriellen Metaboliten gesucht, dabei wurde Carolacton entdeckt (*54*)(*76*)(*77*).

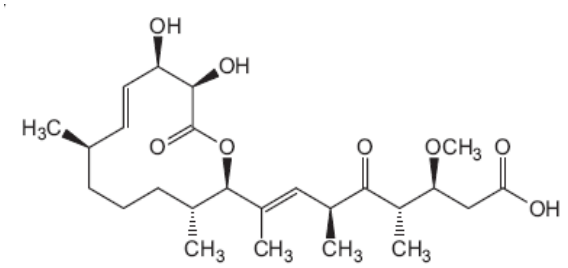


Abbildung 8: Chemische Strukturformel von Carolacton, Summenformal $C_{25}H_{40}O_8$ (*54*)

Aus chemischer Sicht handelt es sich bei Carolacton um eine makrolidische Ketocarbonsäure mit der Summenformel $C_{25}H_{40}O_8$ (*72*). Die Extraktion von Carolacton aus Myxobakterien ist allerdings sehr aufwendig und kompliziert. Eine 100l Fermentation ergibt nach allen Wasch- und Aufreinigungsschritten nur ca. 275mg Carolacton (*54*). Somit war die Produktion durch chemische Totalsynthese die bislang größte Herausforderung bei der Herstellung von Carolacton. 2012 gelang der Gruppe um Andreas Kirsching die komplexe und technisch aufwendige Synthese des Moleküls. In 22 Stufen konnte eine Ausbeute von 4,3% erzielt werden (*73*). Damit wurde der Weg für mögliche Derivatisierungen geebnet, mit dem Ziel – ähnlich wie bei klassischen Antibiotika – die pharmakologischen Eigenschaften des Carolactons zu verbessern.

In vitro zeigte natives Carolacton bislang eine sehr hohe antibakterielle Wirkung gegenüber wachstumsfähigen bakteriellen Zellen in Biofilmen. Zusätzlich zur antibakteriellen Wirkung konnte auch eine geringe antifungale Wirkung, u.a. gegen den Schimmelpilz *Aspergillus niger*, nachgewiesen werden (*58*). Versuche mit eukaryotischen Zellen, genauer gesagt mit murinen Fibroblasten, zeigten keine akute Toxizität, jedoch eine leichte zytostatische Wirkung (*72*)(*58*). Somit kann eine schädliche Wirkung auf den Menschen nahezu ausgeschlossen werden. Carolacton wirkt bereits in nanomolaren Konzentrationen und ist über einen Zeitraum von mehreren Monaten stabil (M. Reck & I. Wagner-Döbler, persönliche Kommunikation). Besonders empfindlich reagieren Biofilme von *S. mutans* auf Carolacton (*72*)(*78*)(*58*)(*54*). Bei einer Konzentration von 0,005µg/ml wurden ca. 35% der Zellen im Biofilm geschädigt (*73*)(*72*). Dieser Effekt wird zusätzlich durch die acidophilen

Bedingungen in *S. mutans*-Biofilmen gesteigert (*78*). Diese Kombination macht Carolacton zu einem interessanten Zusatzstoff für dentale Füllungsmaterialien. Um den antibakteriellen Effekt nun auch *in vivo* bestätigen zu können, wurde im Rahmen des BMBF-MedSys geförderten Projektes BioInSys (http://www.bioinsys.de/) und der vorliegenden Arbeit ein Rattenmodell entwickelt, dass die Wirksamkeit von Carolacton in unterschiedlichen Versuchsansätzen testen sollte. Der genaue Wirkmechanismus von Carolacton ist allerdings noch unbekannt. Carolacton scheint die Zellwandsynthese zu beeinträchtigen, so dass große Moleküle wie Proteine oder DNA aus den Zellen austreten können (*78*)(*58*). Essentiell für die Funktion von Carolacton sind das Wachstum der Zellen sowie ein Abfall des pH-Wertes unter 5,8. Unabhängig von der Art des Wachstums - Biofilm oder planktonische Zellen – wirkt Carolacton ausschließlich auf sich teilende Zellen (*78*). In Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus von Carolacton und der Bildung von Biofilmen wurden u.a. in dieser Arbeit mehrere Zwei-Komponenten Signalsysteme genauer untersucht.

1.6. Zwei-Komponenten Signalsysteme in Streptokokken

Zwei-Komponenten Signalsysteme (= Two-Component signal transduction Systems, kurz TCS) sind zelluläre Systeme, die es Bakterien ermöglichen schnell auf unterschiedliche Umweltreize zu reagieren. Bei Streptokokken spielen sie eine wichtige Rolle bei der Pathogenität (*79*)(*80*). Überwiegend findet man TCS in Bakterien. Sie konnten aber auch schon in Eukaryoten wie höheren Pflanzen (z. B. bei *Arabidopsis thaliana*) oder einigen Pilzen (z. B. *Candida albicans*) nachgewiesen werden (*81*)(*82*). In Säugetieren konnten bislang noch keine TCS nachgewiesen werden, wodurch sie ebenfalls ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuer Antibiotika bieten (*79*).

Ein TCS besteht in der Regel aus zwei Teilen: einer Histidin Kinase (HK) und einem Response Regulator (RR)(*82*). Es gibt allerdings auch einzelne HKs oder RRs (sog. Orphans = Waisen), die ohne entsprechende Partnergene vorkommen (*79*). Die Histidin Kinase ist meistens ein Transmembranprotein, dessen sensorischer Bereich außerhalb des Zytoplasmas liegt (*79*). So können externe Signale bzw. Umweltreize schnell detektiert werden. Durch ein dreistufiges Phosphatübertragungssystem wird das Signal an den Response Regulator weitergegeben. Wie man in Abbildung 9 erkennen kann, erfolgt nach einem Signal / Reiz die Autophosphorylierung des Histidin-Rests der Histidin Kinase.

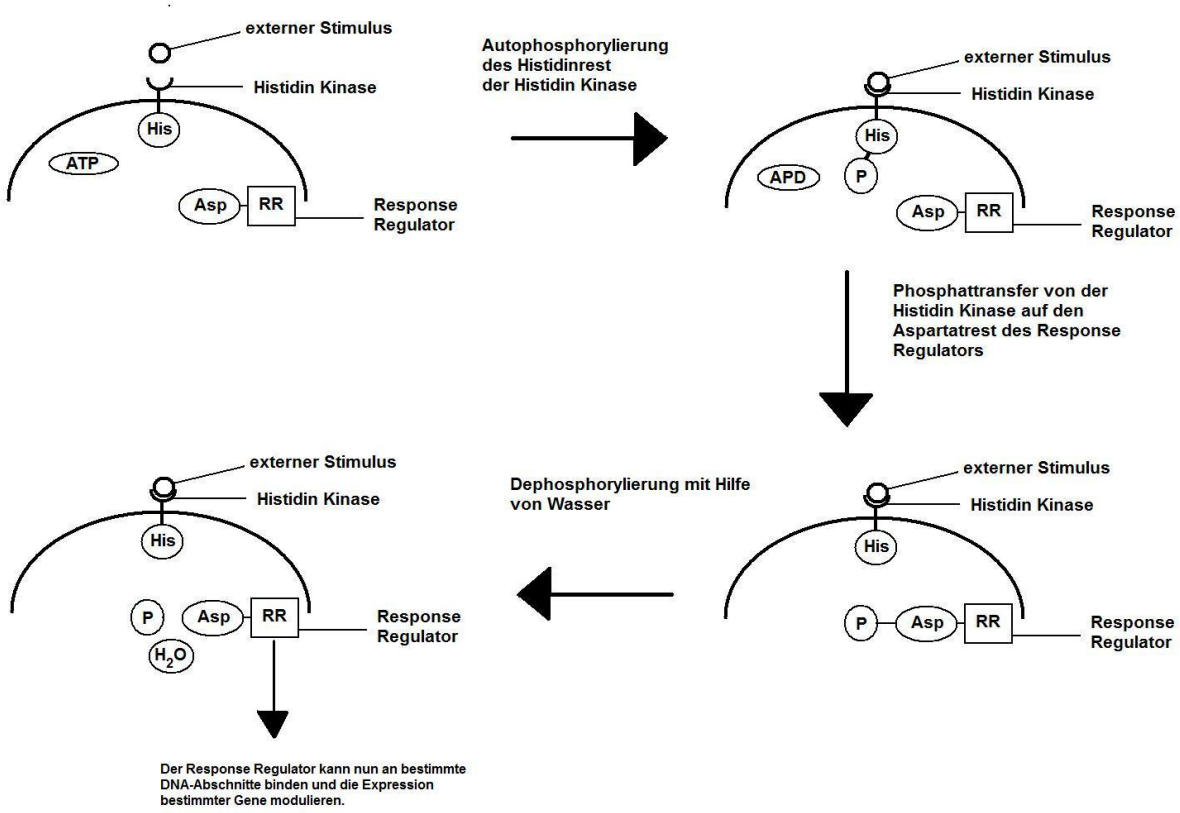


Abbildung 9: Vereinfachte schematische Darstellung der Funktionsweise eines TCS

Im zweiten Schritt erfolgt die Übertragung des Phosphats auf den Aspartat-Rest des Response Regulators. Zuletzt erfolgt mit Hilfe von Wasser die Dephosphorylierung des Response Regulators. Dieser kann nun Gene auf DNA-Ebene regulieren (*79*)(*82*). So können TCS u.a. Biofilmbildung, Quorum sensing, Bacteriocinproduktion, Säuretoleranz und / oder die Kompetenzentwicklung der bakteriellen Zellen steuern. Interessanterweise konnten die Gruppen um Lévesque und Biswas zeigen, dass TCS scheinbar nicht essentiell für das Überleben der Zellen sind (*83*)(*84*).

HK- und RR-Proteine lassen sich nach unterschiedlichen Kriterien in verschiedene Klassen einteilen. Histidin Kinasen werden nach Fabret in fünf verschiedene Homologieklassen eingeteilt (*84*)(*85*). Die Response Regulators werden mit Hilfe der C-terminalen Effektordomäne klassifiziert (*79*). Dabei wird die Co-Evolution unterschiedlicher HKs und RRs deutlich sichtbar, da einige HK-Familien vorzugsweise mit ausgesuchten RR-Familien zusammen vorkommen (*79*). In Zusammenarbeit mit der TU Hamburg-Harburg und dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig wurden unterschiedliche TCS in verschiedenen *S. mutans*-Stämmen untersucht. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe von vergleichenden

Genomanalysen und konventioneller PCR mit anschließender Sequenzierung. Neben den TCS verfügen Streptokokken noch über weitere Schlüsselfaktoren. Dazu zählen unter anderem Plasmide und Toxin-Antitoxin Systeme.

1.7. Plasmide und Toxin-Antitoxin Systeme

Anfang der 70iger Jahre wurde das erste Plasmid im *Streptococcus mutans* Stamm LM-7 entdeckt (*86*). Bis heute sind mehrere Plasmide in verschiedenen Stämmen von *S. mutans* gefunden worden (*87*)(*88*)(*89*). Davon ist allerdings erst eine sehr geringe Anzahl komplett sequenziert worden. Die Plasmide pLM7 (GenBank: AF050494.1) und pUA140 (GenBank: AF068250.1) wurden von Caufield und Zhou 1998 (unpublished) respektive 2001 komplett sequenziert (*87*). Des Weiteren wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe die Plasmide pDC09 und pNC101 vollständig sequenziert (*90*)(*91*). Im Rahmen der Diplomarbeit von Izabela Swierzy wurden erstmals sechs open reading frames (ORFs) gefunden, die für verschiedene Gene kodieren. Besonders interessant sind hierbei ORF 5 und ORF 6, die beide für ein Toxin-Antitoxin System (kurz: TA-System) kodieren. TA-Systeme sind in einer Vielzahl von Prokaryoten bekannt. Erstmals wurden sie 1993 von Lehnherr in *E. coli* beschrieben (*92*). Anfänglich wurde vermutet, dass TA-Systeme nur auf Plasmiden vorkommen. Sie kommen aber auch chromosomal vor (*93*)(*94*). Mittlerweile wurden viele verschiedene TA-Systeme, auch bei pathogenen Organismen, wie z. B. *Mycobacterium tuberculosis* gefunden, dessen Genom mindestens 38 TA-Systeme enthält (*95*). Ein TA-System besteht in der Regel aus zwei Komponenten: einem Toxin und einem dazugehörigen Antitoxin. Das stabile Toxin wird durch das labile Antitoxin deaktiviert (*96*)(*97*). Die Gene für beide Proteine liegen direkt hintereinander. Normalerweise wird zuerst das Antitoxin und dann das Toxin produziert. Je nach Funktionsweise des Antitoxins werden die verschiedenen TA-Systeme in drei Gruppen eingeteilt (*93*):

- Typ I: Die Expression des Toxin-Gens wird über eine antisense-RNA kontrolliert. Das Gen für die antisense-RNA liegt in invertierter Ausrichtung vor dem Toxin (a)
- Typ II: Das Antitoxin wird vor dem Toxin produziert und bildet mit diesem zusammen einen stabilen TA-Komplex, der die Toxinfunktion inaktiviert (b)
- Typ III: Das Antitoxin ist eine RNA, die an das Toxinprotein bindet und es so inhibiert (c)

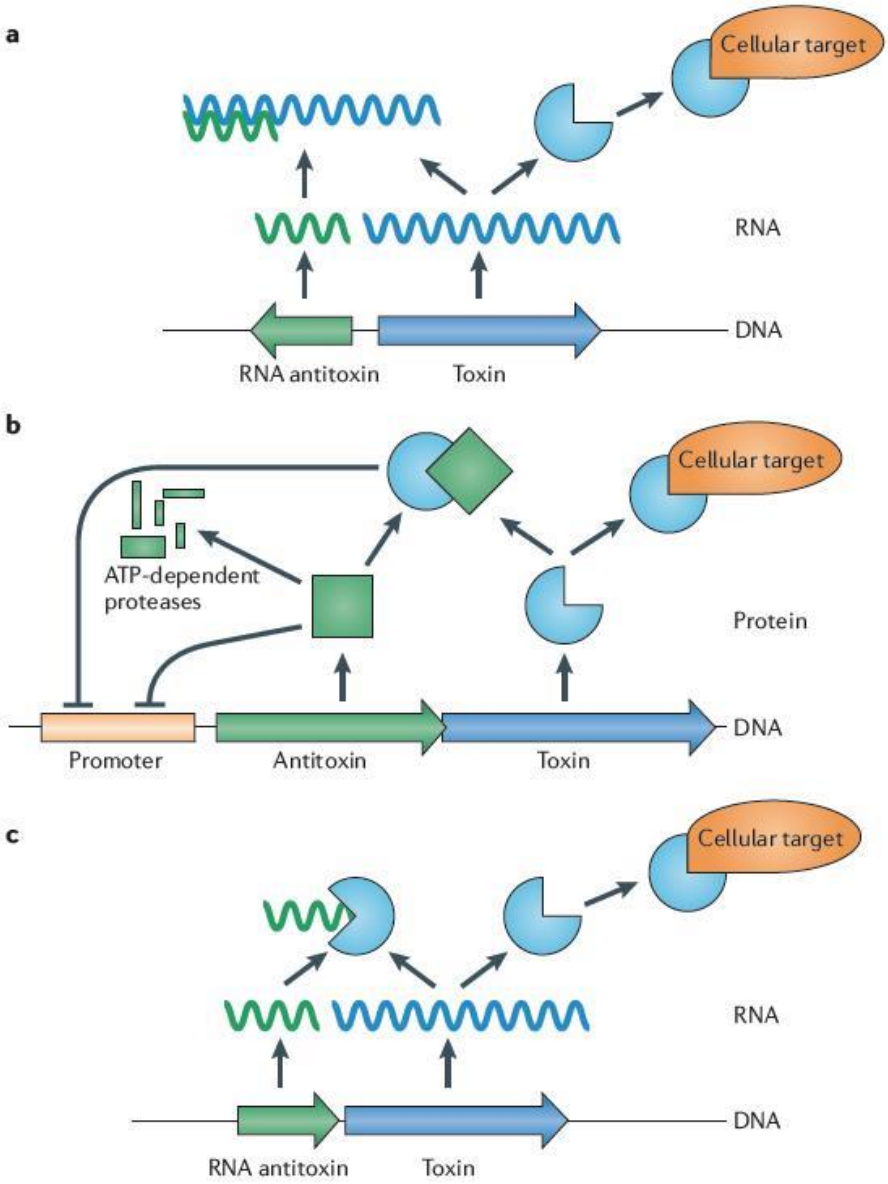


Abbildung 10: Schematische Darstellung der 3 verschiedenen TA-Gruppen nach Yamaguchi & Inouye (*93*) (a = Typ I, b = Typ II, c = Typ III)

Liegen TA-Systeme auf Plasmiden garantieren sie den Erhalt des Plasmids in den Tochterzellen, da Tochterzellen ohne Plasmid kein Antitoxin mehr herstellen können. Das maternale Antitoxin wird schnell abgebaut, sodass die Zellen durch das stabile Toxin aus der Mutterzelle zerstört werden. Dieser Prozess wird „Post-segregational killing“ (PSK) genannt (siehe Abbildung 11) (*98*)(*92*). Dabei stellt sich die Frage welchen Sinn TA-Systeme haben und welchen Zweck sie auf Plasmiden erfüllen. Handelt es sich um reine „selfish-Systeme“ oder vermitteln sie den Zellen vielleicht unter Extrembedingungen sogar einen (Überlebens-)Vorteil?

Es gibt eine Vielzahl an Theorien für die Bedeutung von TA-Systemen: „junk“, „programmed cell death model“, „growth-modulation model“, „persistence model“, „development model“, „stabilization model“ oder „anti-addiction model“ (*98*)(*99*).

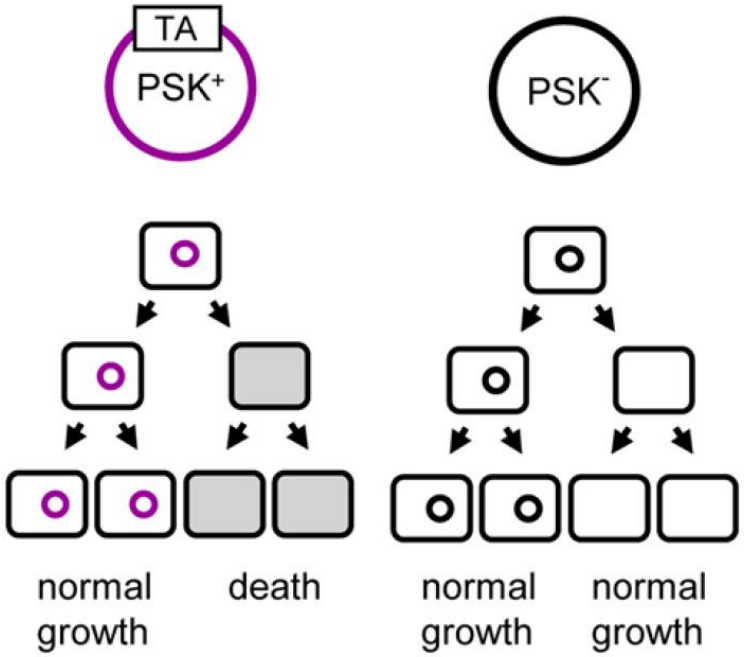


Abbildung 11: Schematische Darstellung des PSK (links: Zelle mit Plasmid und TA-System, rechts: Zelle mit Plasmid ohne TA-System)(*98*)

Allerdings konnte bislang noch keine Theorie schlüssig bewiesen oder widerlegt werden. Eine weitere, von uns aufgestellte Theorie, vermutet, dass plasmidkodierte TA-Systeme als eine Art Komplementierung oder Verstärkung für chromosomale TA-Systeme dienen, die eventuell ihre Funktion verloren haben. Laut Toxin-Antitoxin Database (TADB, http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB/) besitzt der plasmidfreie Stamm *S. mutans* UA159 vier bis sieben verschiedene chromosomale TA-Systeme. Zusätzlich war bekannt, dass das TA-System der *S. mutans* Stämme DC09 und NC101 zur Klasse der *relBE*-Systeme gehört (*91*). Im Rahmen der Arbeit sollten nun die chromosomalen TA-Systeme in den plasmidtragenen Stämmen sowie in einem plasmidfreien Referenzstamm nachgewiesen und deren Funktion überprüft werden. Im Anschluss daran wurden auf der Suche nach neuen energieerzeugenden Stoffwechselwegen mehrere Komponenten des Laktatstoffwechsels genauer untersucht.

1.8. Laktat Oxidase und Pyruvat Oxidase

Durch die Glykolyse wird im Organismus Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) generiert. Das Endprodukt der Glykolyse ist Pyruvat, welches als Ausgangstoff für viele weitere Stoffwechselprodukte dient. Dazu zählen u.a. Acetyl-CoA, Acetylphosphat oder Laktat (*1*). Die meisten Organismen verfügen über die Laktat-Dehydrogenase, die Pyruvat Dehydrogenase Komponenten E1 und E2, die Phosphatacetyltransferase sowie die Acetatkinase (*38*)(*1*). Zwei weitere Enzyme des Pyruvat-Stoffwechsels sind die Laktat Oxidase und die Pyruvat Oxidase. Fakultativen Anaerobiern wie den Streptokokken fehlen essentielle Enzyme im Citrat-Zyklus und der Atmungskette, sodass ATP durch alternative Stoffwechselwege erzeugt werden muss (*1*).

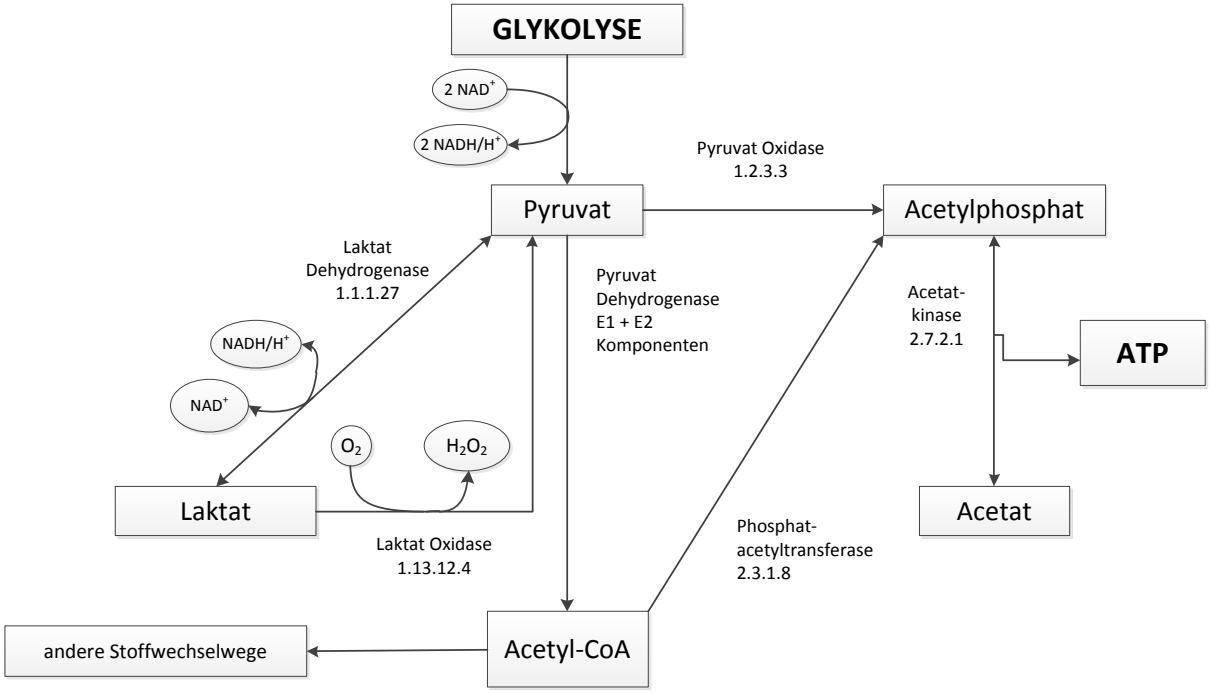


Abbildung 12: Übersicht über den Pyruvat-Stoffwechsel mit den entsprechenden Enzymen und EC-Nummern

Während der Milchsäuregärung wird Pyruvat mit Hilfe der Laktat-Dehydrogenase in Laktat umgewandelt. Dieser Prozess ist NADH/NAD+ abhängig und dient der Regeneration von NAD+, welches innerhalb der Glykolyse verbraucht wird (*1*). Dieser Stoffwechselweg ist reversibel. Zusätzlich kann Laktat auch mit Hilfe der Laktat-Oxidase in Pyruvat umgewandelt werden, da dieser Prozess NAD-unabhängig ist. Die Laktat-Oxidase katalysiert unter aeroben Bedingungen die Reaktion von Laktat zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (*41*)(*100*). Bei der weiterführenden Umwandlung zu Acetat wird ein ATP produziert. Auf diese Weise entsteht ein neuer,

alternativer Stoffwechselweg der Energie in Form von ATP bereitstellen kann (*41*). Weitere Vorteile eines Keims mit diesem alternativen Stoffwechselweg könnten auch die Produktion des wichtigen Intermediärmetaboliten Acetyl-CoA bzw. der antimikrobiellen Substanz H_2O_2 sein. Im Rahmen der Arbeit sollte der Nachweis der Laktat-Oxidase von *S. sobrinus* mittels konventioneller PCR erbracht werden. Zusätzlich wurden mit Hilfe computergestützter Genomanalysen eine große Anzahl unterschiedlicher Streptokokken-Stämme auf die An- bzw. Abwesenheit mehrerer Enzyme des Pyruvat-Stoffwechsels untersucht. Dabei sollte überprüft werden welche Stämme das Enzymbesteck für den alternativen Stoffwechselweg aufweisen.

1.9. Serotypisierung von *S. mutans* Stämmen mittels *in silico* PCR

Als letzter Punkt wurde im Rahmen der Arbeit die *in silico* Serotypisierung verschiedener *S. mutans*-Stämme durchgeführt. Die Serologie beschreibt die Untersuchung von Antigen-Antikörper-Reaktionen *in vitro* (*1*). Die verschiedenen Variationen von Oberflächenantigenen innerhalb einer Bakterien- oder Virenspezies werden als Serotypen bezeichnet. Die Serotypisierung ist eine Möglichkeit die verschiedenen Subspezies voneinander zu unterscheiden (*101*). Im Labor kann dies durch verschiedene serologische Tests ermittelt werden.

Durch die Vielzahl an Sequenzinformationen der letzten Jahre existieren mittlerweile sehr detaillierte Datenbanken mit kompletten Genominformationen für verschiedene Spezies. Dadurch ist es möglich die Serotypisierung von verschiedenen bereits sequenzierten *S. mutans*-Stämmen auch genbasiert mittels *in silico* PCR durchzuführen. Mutans-Streptokokken werden in die Serotypen a bis h eingeteilt (*9*). *S. mutans* wird in drei Serotypen c, e und f unterteilt (*102*)(*9*)(*103*)(*104*). Die serologische Spezifität ist durch das Rhamnose-Glucose Polysaccharid (RGP) der Zellwand gegeben (*102*). Dadurch ist eine Serotypisierung von *S. mutans* Stämmen mit bekannten Genominformationen schnell, einfach und kostengünstig möglich. Für das BMBF-Projekt war es wichtig den Serotyp der genom-untersuchten Stämme zu kennen, da einige z. B. non-c Serotypen invasiver erscheinen.

1.10. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit werden vor allem die Streptokokken genauer untersucht, die bei der Entstehung von Karies eine wichtige Rolle spielen. Der Schwerpunkt liegt hierbei in der Inhibition der kariogenen Prozesse und der Untersuchung

verschiedener systembiologischer Aspekte von *Streptococcus mutans*. Ziel der Arbeit ist es einzelne ausgewählte systembiologische Aspekte von *S. mutans* zu untersuchen, die unmittelbar mit der Kariogenese verbunden sind. Dazu zählen Two-Component Signalverarbeitungs-Systeme, die eine wichtige Rolle bei der Signalverarbeitung und Virulenz der unterschiedlichen Spezies spielen. Durch die Regulation verschiedener Virulenzfaktoren tragen Two-Component Systems aktiv zur Kariesprogression bei. Ein neu entdeckter Stoffwechselweg im Laktatstoffwechsel von *S. sobrinus* ermöglicht die Bildung von ATP unter aeroben Verhältnissen und könnte ebenfalls Einfluss auf die Säureregulation der Spezies haben. Des Weiteren wurde versucht die Bedeutung von chromosomalen Toxin-Antitoxin Systemen im Vergleich zu plasmidgebundenen Systemen näher zu charakterisieren. Die *in silico* Serotypisierung wurde eingesetzt um die Serotypen der neu sequenzierten *S. mutans*-Stämme schnell und kostengünstig zu bestimmen. Da neben *S. mutans* auch noch andere Spezies für die Kariogenese verantwortlich sind, wurden neue Primersysteme und PCR-Programme für den Nachweis der acidogenen Spezies *S. wiggsiae* und *B. dentium* entwickelt. Diese ermöglichen die Durchführung einer neuen „Karies-PCR“ zur Erfassung kariogener Risikokeime. Eine Vielzahl weiterer Aspekte (z. B. Proteom, (membranständiges) Peptidom, Transkriptom) waren Gegenstand anderer mit uns kooperierender Arbeitsgruppen des BioInSys-Verbundprojektes. Besonders wichtig für die vorliegende Arbeit und unsere klinisch orientierte Arbeitsgruppe war dabei, neue Wege zur Inhibition der Biofilmbildung zu finden, um die Kariesbildung auch *in vivo* zu reduzieren (translationale Aspekte). Der Einsatz von Carolacton soll im Idealfall die Biofilmbildung von *S. mutans* inhibieren und so zu einer verminderten Kariesinzidenz führen. Hauptziel der Arbeit ist es die Carolacton-abhängige Inhibition der Biofilmbildung beim Karieserreger *S. mutans in vivo* im Rattenmodell zu bestätigen. Der Effekt soll durch eine verminderte Kariesinzidenz und -progression bei den Versuchstieren sichtbar werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

Eine Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Kits, Geräte sowie die verwendete Software findet sich im Anhang (Punkt 7.1.).

2.2. Puffer und weitere Lösungen

Alle Angaben beziehen sich (wenn nicht anders beschrieben) jeweils auf einen Liter.

- Bluemarker
  - 40% Sucrose
  - 0,1% Bromphenolblau
  - Aqua bidest.
- Mutanolysin-Lysozym Mischung (pro ml)
  - 500U Mutanolysin
  - 15 mg Lysozym
  - 1ml TE-Puffer
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9%)
  - 9g Natriumchlorid
  - 1000ml Aqua bidest.
- Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) 10x:
  - 48,4g Tris-Base
  - 11,4ml Eisessig
  - 20,0ml EDTA (0,5M, pH-Wert 8)
  - pH-Wert auf 8 einstellen
  - mit Aqua bidest. auffüllen

  → für TAE-Puffer 1x entsprechend 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen

2.3. Mikroorganismen

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Mikroorganismen

Art	**Stamm**	**Herkunft**
Streptococcus mutans	UA159 (Wildtyp)	Referenzstamm, 1982 von P. W. Caufield aus einer kariösen Läsion beim Kind isoliert
	UA159 Re-Isolat	UA159 Re-Isolat aus einer Ratte (Ratte 16) zwecks Virulenzsteigerung
	NCTC11060	Referenzstamm, Serotyp F (invasives Blutisolat)
	KK21 KK23 KK15/95	Biologisches Labor des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (ZZMK) Jena, Prof. S. Kneist
	ATCC25175 AC4446	Nationales Referenzlabor für Streptokokken (NRZ), Universitätsklinikum Aachen
	DC09 NC101 NC378	Prof. D. Beighton, Dental Institute King's College London (KCL) (Zahnwurzelkaries / Karies beim Kind)
Streptococcus mitis	AC790	NRZ, Universitätsklinikum Aachen
Streptococcus sobrinus	DSM20742	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSZM), Braunschweig
	AC153	NRZ, Universitätsklinikum Aachen
Streptococcus ratti	DSM20564	Rattenisolat Serotyp B (kariöse Läsion)
Streptococcus macacae	GH395	Sammlung Prof. G. Haase, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Aachen
Streptococcus gordonii	GH355	
Bifidobacterium dentium	DSM20436	DSZM, Braunschweig
Bifidobacterium bifidum	DSM20456	

Bifidobacterium breve	DSM20091	
Bifidobacterium adolescentis	DSM20083	
Scardovia wiggsiae	DSM22547	

2.4. Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen

Zur Kultivierung von Bakterien wurden Fest- und Flüssigmedien verwendet. Von Ende 2010 bis Mitte 2012 wurden die Medien aus der Nährbodenküche des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Aachen bezogen. Danach wurden Fertigmedien von Oxoid (Wesel) verwendet. Die Zusammensetzung der Medien kann über Oxoid nachgeschlagen werden (http://www.oxoid.com/uk/blue/index.asp?c=uk&lang=en). Flüssigmedien wurden entsprechend der Herstellerangaben angesetzt und vor Gebrauch im institutseigenen Autoklaven sterilisiert.

Tabelle 5: Übersicht über die Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen

Bakterien	**Medium**	**Kultivierungsbedingungen**
Streptococcus spp.	Columbia Blutagar mit Schafblut, BHI-Bouillon	37°C, im Kerzentopf oder bei 10% CO_2 über Nacht bzw. nach 2 Tagen
Bifidobacterium spp. *Scardovia wiggsiae*	Schaedler-Agar, Columbia Blutagar mit Schafblut	37°C, im Anaerobiertopf (mit Gaspack), Wachstumsdauer 3 bis 4 Tage

2.5. Animpfen von Kulturen

2.5.1. Animpfen von Kulturen aus der Instituts-Stammsammlung (-70°C)

Zur erstmaligen Anzucht wurden die Stämme aus der Stammsammlung verwendet und auf einem geeigneten Vollmedium ausgestrichen. Zur Vereinzelung der Zellen wurde der Dreiösenausstrich angewendet.

2.5.2. Animpfen von Kulturen aus der Stammsammlung DSMZ

Die Aufbereitung und das Animpfen einer gefriergetrockneten Kultur aus der Stammsammlung der DSMZ wurde gemäß den Anweisungen des Infoblattes der DSMZ durchgeführt (Stand August 2012, Version 2.0.4).

2.6. Herstellung von Stammkulturen mittels einer Cryobank™

Zur längerfristigen Lagerung wurden ausgesuchte Bakterienstämme bei -70°C eingefroren. Dazu wurde die Cryobank™ von Mast Diagnostica (Rheinfeld) verwendet. Die Herstellung einer Stammkultur erfolgte nach Herstellerangaben.

2.7. Gramfärbung

Die Gramfärbung wurde mit Hilfe des Gramfärbe-Kits (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Soweit nicht anders beschrieben wurden alle verwendeten Kulturen zur Kontrolle nach Gram gefärbt, um Kontaminationen frühzeitig zu erkennen und das Übertragungsrisiko zu minimieren.

2.8. Mikroskopische Aufnahmen

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit Hilfe des Lichtmikroskops DMRX (Leica, Wetzlar) mit angeschlossener Farbkamera (Modell scA1390-17fc, Basler, Ahrensburg) gemacht. Für alle Aufnahmen wurde das 100er Ölimmersionsobjektiv verwendet. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der Software Diskus (Version 4.20, Carl H. Hilgers – Technisches Büro, Königswinter) bearbeitet und dokumentiert.

2.9. Tierversuche zur antikariogenen Wirkung des Biofilminhibitors Carolacton

Um die antikariogene Wirksamkeit des Biofilminhibitors Carolacton *in vivo* zu untersuchen wurden im Rahmen der Arbeit zwei Tierversuche durchgeführt. Das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigte den Tierversuchsantrag für den Zeitraum vom 18.03.09 bis zum 31.01.12 (Aktenzeichen 8.87-50.10.35.08.350.).

2.9.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Dieser Stamm ist leicht zu handhaben, da die Tiere vom Wesen her sehr ruhig sind. Die Tiere wurden von der Firma Charles River Laboratorien (Charles River Deutschland, Niederlassung Sulzfeld) bezogen und waren zu Versuchsbeginn zwischen 21 und 23 Tage alt. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet.

2.9.2. Versuchsaufbau

Der grundlegende Aufbau beider Versuche war gleich:

- Ratten als Versuchstiere
- verblindete Versuchsdurchführung
- Markierung und Gruppierung der Tiere
- zweitägige antiinfektive Behandlung der Tiere mit Chlorhexidin und Augmentan zur Reduktion der physiologischen Keimflora im Maul
- zuckerhaltige Diät (zuckerhaltiges Futter und 10%ige Zuckerlösung als Trinkwasser)
- dreitägige Inokulation mit dem Karieserreger *Streptococcus mutans* in hoch konzentrierter Form
- Kontrolle der Mundflora durch regelmäßige Abstriche
- molekularbiologische Auswertung der Abstriche nach DNA-Extraktion mittels quantitativer real-time PCR (qPCR)
- Präparation der Ober- und Unterkiefer
- Plaquefärbung aller Kiefer
- Kariesfärbung (mit basischem Fuchsin) aller Kiefer und Untersuchung der kariogenen Läsionen in mehreren Dimensionen durch die Anfertigung histologischer Schliffe

Der Hauptunterschied zwischen beiden Versuchen lag in der Applikation der Wirkstoffe. Im ersten Versuch wurde ein Zahnlack mit Carolacton bzw. ohne Wirkstoff verwendet, der auf die hinteren Molaren (Backenzähne) der Ratten aufgetragen wurde. Im zweiten Versuch wurden die Wirkstoffe in Form von Trinkwasserzusätzen und täglichen Mundspülungen verabreicht. In beiden Versuchen gab es jeweils eine Kontrollgruppe, die unbehandelt blieb.

2.9.3. Tierversuch 1: Carolacton als Additiv im Zahnlack

Im ersten Tierversuch wurde der Biofilminhibitor Carolacton als Additiv im Zahnlack (Voco, Cuxhaven) verwendet. Dazu wurde der Zahnlack auf die hinteren Molaren der Ratten aufgetragen. Zu Beginn des Versuchs wurden zwei Zahnlacke mit den Bezeichnungen Lack C und Lack D zur Verfügung gestellt. Diese Bezeichnungen wurden für die Dauer des Versuchs beibehalten. Es war unbekannt welcher Lack den Wirkstoff Carolacton enthielt.

2.9.3.1. Markierung und Gruppierung der Tiere

Insgesamt wurden im Versuch 36 Tiere eingesetzt, die in drei Gruppen zu je 12 Tieren aufgeteilt wurden. Für den Versuch wurde den Gruppen folgende Farblegende zugewiesen: Kontrollgruppe = grün, Lack C = orange, Lack D = rot.

Tabelle 6: Gruppeneinteilung und Art der Behandlung der Versuchstiere im ersten Tierversuch 2010 (mit entsprechender Farblegende)

Tiere	Gruppe und Art der Behandlung
1 bis 12	Kontrolle, keine Behandlung bzw. Lackierung
13 bis 24	Lack C, Lackierung der hinteren Molaren mit Lack C
25 bis 36	Lack D, Lackierung der hinteren Molaren mit Lack D

Zur Unterscheidung der Tiere wurden sie an den Ohren mit Hilfe einer Lochzange nach folgendem Schema gekennzeichnet:



Abbildung 13: Übersicht der Ohrmarkierungen am Beispiel der Tiere eins bis zehn

Das rechte Ohr erhält jeweils die Markierung für die Einserziffern eins bis neun, das linke Ohr erhält die Markierung für die Zehnerzahlen. Höhere Tierzahlen werden durch Kombination der Einser- und Zehnermarkierung erreicht. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Ohrmarkierungen befindet sich im Anhang (Punkt 7.2.).

2.9.3.2. Ernährung der Tiere

Um kariogene Bedingungen zu forcieren wurden die Tiere einer extrem zuckerhaltigen Diät ausgesetzt. Neben dem Hauptfutter mit 63% Zuckeranteil (Cariogenic diet – Experimental Futter, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) wurde zusätzlich das Trinkwasser mit handelsüblichem Haushaltszucker (Diamant Raffinade Zucker, Köln) versetzt, sodass eine Endkonzentration von 10% erreicht wurde.

2.9.3.3. Zeitlicher Ablauf des ersten Tierversuchs 2010

Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf des ersten Tierversuchs bietet Tabelle 28 (siehe Anhang Punkt 7.3.).

2.9.3.4. Reduktion der Keimzahl und Kontrolle

Um die physiologische Keimflora im Maul zu reduzieren wurden alle Tiere nach Anlieferung einer zweitägigen antiinfektiven Behandlung unterzogen. Am ersten Tag wurden die Tiere mit Chlorhexidin (Paroex Mundspüllösung, 0,12% Chlorhexidin, Sunstar Gum, Schönau) und am zweiten Tag mit Augmentan (Amoxicillin plus Clavulansäure, Aluid Pharma, Laichingen) behandelt. Dazu wurden den Tieren jeweils 100µl der entsprechenden Substanz in die Maulhöhle appliziert.

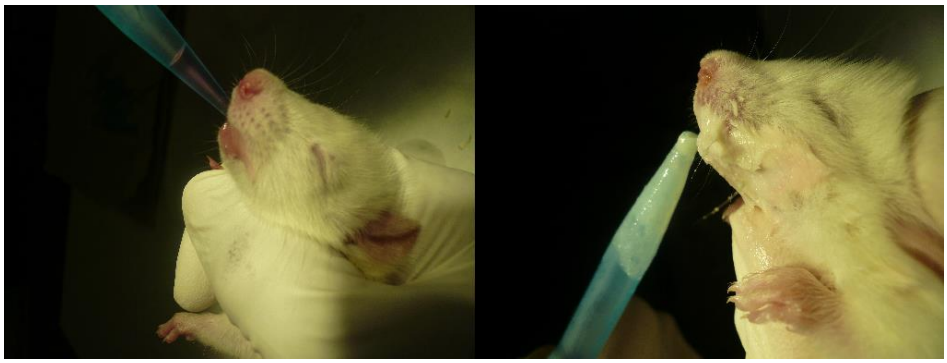


Abbildung 14: Behandlung einer Ratte mit Chlorhexidin (links) und Augmentan (rechts)

Um zu kontrollieren ob eine Reduktion der Keimflora erfolgreich war, wurde vor der Chlorhexidin-Behandlung und nach der Augmentan-Behandlung jeweils von einer Ratte pro Gruppe ein Abstrich mit einem sterilen Wattetupfer entnommen. Um die Keimzahl zu bestimmen wurde der Wattetupfer auf drei verschiedenen Agarplatten ausgestrichen. Für die Isolierung von Gram-negativen Bakterien wurde MacConkey-Agar verwendet. Zur Isolierung von grampositiven Bakterien wurde Columbia Blutagar mit den Zusätzen Colistin und Nalidixinsäure verwendet. Außerdem wurde Columbia Blutagar verwendet um eine Übersicht aller Keime zu bekommen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C und 10% CO_2 bebrütet.

2.9.3.5. Narkotisierung der Tiere

Um die hinteren Molaren der Versuchstiere lackieren zu können war eine Narkotisierung der Tiere notwendig. Die Narkose erfolgte durch eine Kombination aus Ketamin (10%, Ceva, Düsseldorf) und Domitor (Medetomidin, Pfizer Karlsruhe), die den Tieren subkutan injiziert wurde. Innerhalb von 10min waren die Tiere narkotisiert und konnten behandelt werden.

2.9.3.6. Lackierung der Molaren

Die Lackierung der Molaren wurde von Prof. Dr. Apel (Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahlheilkunde, ZPP, Universitätsklinikum Aachen) durchgeführt.

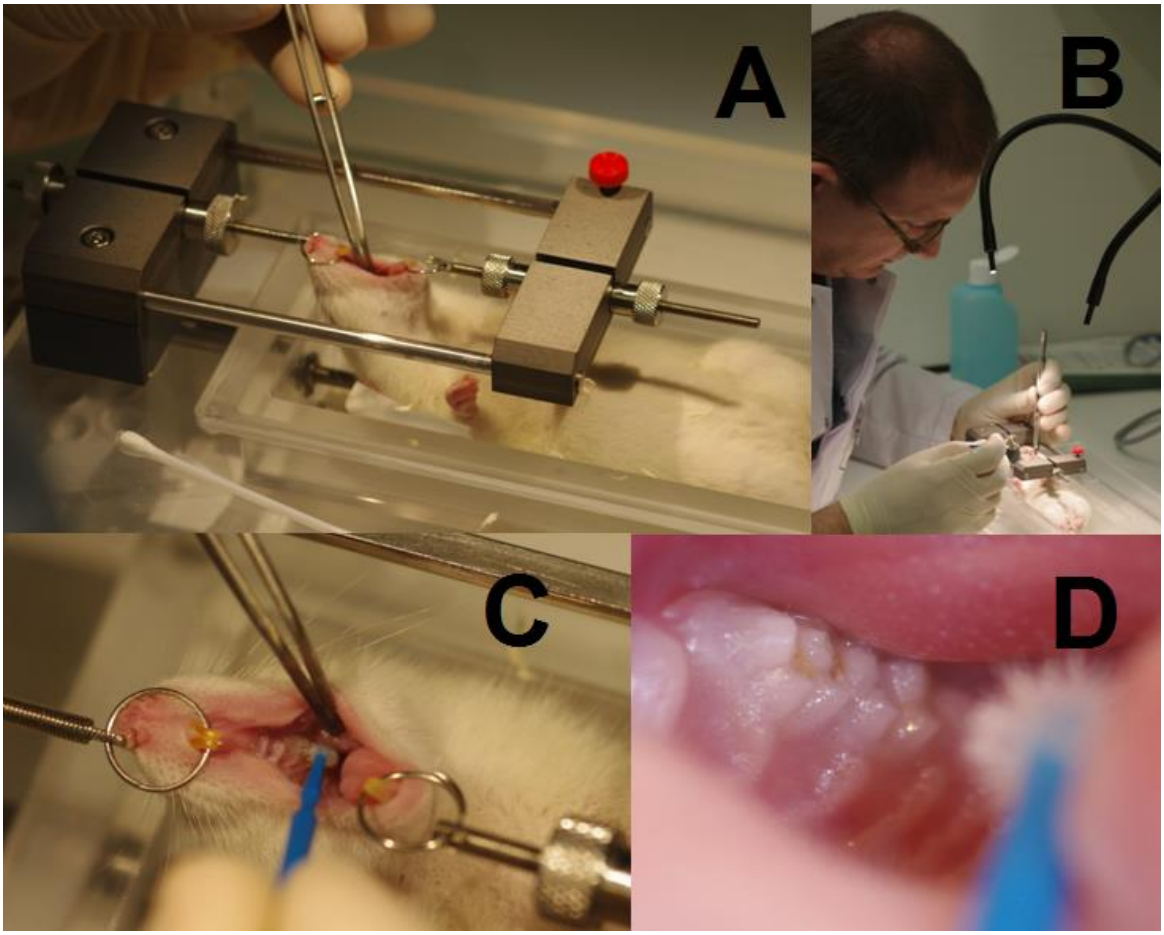


Abbildung 15: Eine narkotisierte und fixierte Ratte in der Halteapparatur während der Lackierung der hinteren Molaren (C = Nahaufnahme, D = Detailaufnahme)

Dazu wurden die narkotisierten Tiere in einen speziellen Halteapparat (Eigenbau, Medizintechnik Universitätsklinikum Aachen) gelegt, der es ermöglicht Ober- und Unterkiefer der Tiere weit auseinander zu spannen. Mit einem kleinen Applikatorpinsel wurde der Lack auf die Molaren der Ratten aufgebracht.

2.9.3.7. Gezielte Ansiedlung mit dem Karieserreger *S. mutans*

Die Inokulation mit dem Karieserreger *S. mutans* in Form einer konzentrierten Zellsuspension diente der gezielten Ansiedlung in den Maulhöhlen der Ratten. Die Inokulation wurde an drei aufeinander folgenden Tagen wiederholt. Dieses Verfahren gliedert sich in die Herstellung einer hochkonzentrierten Zellsuspension, die Bestimmung der Zellzahl sowie die Inokulation der Tiere mit der Suspension.

2.9.3.7.1. Herstellung der konzentrierten *S. mutans* Zellsuspension

Für die Herstellung der konzentrierten *S. mutans* Zellsuspension wurde der Stamm *S. mutans* UA159 (Re-Isolat aus Ratte 16) verwendet. Um eine möglichst hohe Zelldichte zu erreichen, wurden Kolonien von bewachsenen Agarplatten sowie Flüssigkulturen zur Herstellung der Suspension verwendet. Dazu wurden 30 Platten Columbia Blutagar und sechs mal 5ml Brain Heart Infusion-Bouillon (BHI) mit dem entsprechenden Stamm beimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bebrütet. Die Flüssigkulturen wurden am nächsten Tag für 5min bei 3000g zentrifugiert und die Pellets vereinigt. Die gesamte Zellmenge wurde in 7ml BHI-Bouillon gelöst. Die Platten wurden vorsichtig mit einer Impföse oder einem Wattetupfer abgekratzt und mit in die Zellsuspension gegeben. Danach wurde die Zellsuspension in Portionen zu je 150µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis Gebrauch erfolgte die weitere Lagerung bei -70°C.

2.9.3.7.2. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl der konzentrierten Suspension wurde eine Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung mit den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-8} angelegt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-6}, 10^{-7} und 10^{-8} wurden jeweils 100µl Suspension auf Columbia Blutagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag erfolgte die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (Colony Forming Units, CFU).

2.9.3.7.3. Inokulation der Ratten mit der *S. mutans* Zellsuspension

Für die Inokulation wurde den Tieren jeweils 100µl der konzentrierten Zellsuspension ins Maul gespritzt. Dazu wurden die Tiere einzeln entnommen und vorsichtig fixiert. Als Hilfsmittel diente eine 200µl Pipette.

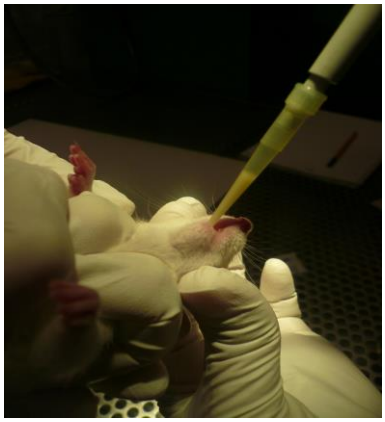


Abbildung 16: Inokulation einer Ratte mit 100 µl konzentrierter *S. mutans* Zellsuspension

2.9.3.8. Auswertung

Die Auswertung der Tierversuche erfolgte auf zwei unterschiedliche Arten. Erstens wurden regelmäßig Proben aus der Maulhöhle der Tiere entnommen und molekularbiologisch analysiert. Zweitens wurden die Zähne und Kiefer nach Beendigung der Versuche präpariert und histologisch untersucht. Dabei stand vor allem die Plaque- und Kariesbildung im Vordergrund.

2.9.3.8.1. Molekulargenetischer Nachweis von *S. mutans*

Während der gesamten Versuchsdauer wurden regelmäßig Abstriche von den Zähnen und der Maulhöhle der Versuchstiere entnommen. Dies geschah mit Hilfe von sterilen Wattetupfern. Pro Tier wurde jeweils ein Abstrich entnommen. Dabei wurde versucht die hinteren Molaren der Tiere zu erreichen. Die Verweildauer der Wattetupfer im Maul der Tiere belief sich auf mehrere Sekunden. Anschließend wurde aus den Wattetupfern die DNA extrahiert und mittels qPCR analysiert (siehe Punkt 2.10. bis 2.11.).

2.9.3.8.2. Versuchsende und Präparation der Kiefer

Um eine vollständige Präparation der Kiefer vornehmen zu können mussten die Tiere eingeschläfert werden. Dies geschah mit Hilfe des Inhalationsanästhetikums Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden). Die Tiere wurden in ein Glasgefäß mit Deckel gesetzt, indem sich ein Tuch mit dem Narkotikum befand. Nach dem Einschläfern der Tiere wurden die Kiefer entfernt und präpariert. Zur Fixierung und Konservierung wurden die Kiefer in isotonischer Kochsalzlösung (0,9%) oder Formaldehyd-Lösung (4%, neutral gepuffert, Roth, Karlsruhe) gelagert.

2.9.3.8.3. Plaquefärbung

Um die Plaquebildung auf den Zähnen sichtbar zu machen wurden die Zähne angefärbt. Dazu wurden mit Farbstoff getränkte Wattepellets (Rondells Blue, Directa, Upplands Väsby, Schweden) verwendet, mit deren Hilfe die Kiefer vorsichtig abgetupft wurden. Der Farbstoff färbt vorhandene Plaque, je nach Alter verschiedenfarbig an. Plaque die älter als drei Tage ist verfärbt sich blau, während sich Plaque die nicht älter als drei Tage ist rot verfärbt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte durch das Stereomikroskop MZ6 (Leica, Wetzlar) mit angeschlossener Kamera (Hitachi, Tokio, Japan). Für alle Aufnahmen wurde die

2,5fache Vergrößerung verwendet. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der Software Diskus bearbeitet und dokumentiert. Um die Kiefer für die Dokumentation zu fixieren wurden sie auf Objektträgern mit Hilfe von Knetmasse arretiert. Von allen Kiefern wurden Aufnahmen von okklusal (Aufsicht) und vestibulär bzw. oral (seitliche Ansicht) gemacht.

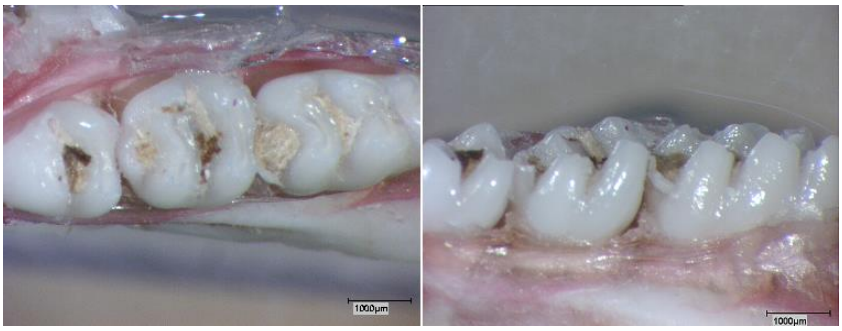


Abbildung 17: Beispielhafte Dokumentation einer nativen Kieferhälfte (Ansicht links: okklusal, Ansicht rechts: vestibulär/oral)

2.9.3.8.4. Kariesfärbung

Zur Durchführung der Kariesfärbung mussten die kariogenen Läsionen freigelegt werden. Die Zähne mussten dazu möglichst gleichmäßig von einer Seite her abgeschliffen werden. Dazu wurden die Kiefer nach der Plaquefärbung mit Hilfe eines Fixationsklebers (Technovit 7230 VLC, Heraeus-Kulzer, Wehrheim) auf Kunststoffobjekträger (PSI Grünewald, Laudenbach) geklebt. In einer Klebepresse (EXAKT 402, EXAKT, Norderstedt) härtet der Kleber unter blauem Licht schnell und sehr fest aus, sodass eine gute Fixierung erreicht wurde. Die aufgeklebten Kiefer wurden dann vorsichtig abgeschliffen. Die Schleifarbeiten wurden mit der Schleifmaschine DP-U4 (Struers, Willich) mit Wasserzulauf durchgeführt. Es wurde das passende Schleifpapier Silicon Carbide in den Stärken P800-1200 verwendet (Struers, Willich). Es wurden jeweils beide Kieferhälften aus dem Ober- und Unterkiefer verwendet. Von jeder Kieferhälfte wurden drei bis vier Schliffe angefertigt. Dabei wurde versucht einen Schliff vor die Hauptfissur zu setzen, einen direkt in die Fissur und einen Schliff hinter die Fissur. Die Schliffe wurden in den unterschiedlichen Ebenen mit basischem Fuchsin angefärbt und wie bei der Plaquefärbung fotografiert und dokumentiert. Um die Läsionen und damit die Kariesprogression beurteilen zu können, wurde das Verfahren nach Keyes (*105*) angewendet. Die Schleifarbeiten wurden von Vera Heinz (ZPP, Universitätsklinikum Aachen) durchgeführt. Die anschließende Auswertung der kariogenen Läsionen erfolgte im Rahmen ihrer zahnmedizinischen Doktorarbeit.

2.9.3.9. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Rattenkiefer

Um den Nachweis zu erbringen, dass die kariogenen Läsionen nur von *S. mutans* hervorgerufen wurden, wurde der letzte Kieferschliff von Ratte 10 unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) betrachtet. Besonderer Dank galt an dieser Stelle Herrn Manfred Bovi, von der Elektronenmikroskopischen Einrichtung (EME) des Universitätsklinikums Aachen, für die Präparation der Probe und die Bedienung des Mikroskops.

2.9.3.10. EDX-Analyse

Während der Untersuchung im REM besteht die Möglichkeit bestimmte Bereiche auf ihre Zusammensetzung hin zu untersuchen. Dies geschieht mit Hilfe der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie, kurz EDX-Analyse (energy dispersive X-ray spectroscopy). Dabei wird der gewünschte Bereich mit Elektronen angeregt. Die emittierte Röntgenstrahlung wird gemessen und liefert charakteristische Werte für die entsprechenden Elemente. In unserem Fall wurde ein Fremdkörper innerhalb der untersuchten Fissur genauer analysiert.

2.9.4. Tierversuch 2: Carolacton als Additiv im Trinkwasser

Der zweite Versuch wurde im Vergleich zum ersten Versuch in mehreren Punkten modifiziert. Dabei wurden folgende Änderungen durchgeführt:

- zusätzlich zur Behandlung mit Carolacton wurde eine Gruppe mit Fluorid behandelt
- das Trinkwasser der Tiere wurde mit den Wirkstoffen bzw. dem Placebo versetzt
- den Tieren wurde (täglich) eine Mundspülung verabreicht, die den Wirkstoff bzw. das Placebo enthielt
- die Versuchsdauer wurde verkürzt
- es wurden mehr Tiere eingesetzt
- das Gewicht der Tiere wurde am Anfang und Ende des Versuchs bestimmt

Zu Beginn des Versuchs wurden zwei Lösungen mit den Bezeichnungen Carolacton A und Carolacton B zur Verfügung gestellt. Diese Bezeichnungen wurden für die Dauer des Versuchs beibehalten. Es war erneut unbekannt welche Lösung den Wirkstoff Carolacton enthielt.

2.9.4.1. Markierung und Gruppierung der Tiere

Insgesamt wurden im zweiten Versuch 45 Tiere eingesetzt, die in drei Gruppen zu je 15 Tieren unterteilt wurden.

Tabelle 7: Einteilung der Versuchstiere während des Tierversuchs 2011 (mit entsprechender Farblegende)

Käfig	Tiere	Gruppe
1	1 bis 5	Fluorid
2	6 bis 10	
3	11 bis 15	
4	16 bis 20	Carolacton A
5	21 bis 25	
6	26 bis 30	
7	31 bis 35	Carolacton B
8	36 bis 40	
9	41 bis 45	

Für die Dauer des Versuchs wurde den Gruppen folgende Farblegende zugewiesen: Fluoridgruppe = dunkelgrau, Carolacton A = pink, Carolacton B = blau. Wie im ersten Versuch wurden die Tiere zur Unterscheidung mit Hilfe einer Lochzange nach bekanntem Schema gekennzeichnet (siehe Punkt 7.2.).

2.9.4.2. Ernährung der Tiere

Die Tiere erhielten dasselbe Futter wie im ersten Versuch (siehe 2.9.3.2.). Die Zubereitung des Trinkwassers wurde etwas abgeändert. Die Endkonzentration von 10% Zucker pro Liter blieb gleich. Allerdings wurde eine 40%tige Stammlösung des Zuckerwassers angesetzt und anschließend autoklaviert. Dadurch sollte eine Verkeimung des Trinkwassers verhindert werden. Das Trinkwasser wurde bei Bedarf frisch angesetzt. Dazu wurden 250ml 40%ige Zuckerlösung mit 750ml Wasser (bzw. dem Vielfachen davon) vermischt. Zusätzlich wurden die entsprechenden Mengen der unterschiedlichen Wirkstoffe dem Trinkwasser hinzugefügt (siehe Punkt 2.9.4.5.).

2.9.4.3. Zeitlicher Ablauf des zweiten Tierversuchs 2011

Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf des ersten Tierversuchs bietet Tabelle 47 (siehe Anhang Punkt 7.5.).

2.9.4.4. Keimzahlreduktion und Ansiedlung mit *S. mutans*

Die Behandlung zur Keimzahlreduktion und die gezielte Inokulation mit *S. mutans* wurden wie im ersten Versuch beschrieben durchgeführt (siehe Punkte 2.9.3.4. und 2.9.3.7).

2.9.4.5. Trinkwasserzusätze

Die Trinkwasserzusätze wurden als Stammlösungen angesetzt und entsprechend aliquotiert.

2.9.4.5.1. Herstellung der Fluorid-Stammlösung

Die Endkonzentration im Trinkwasser sollte 1mg/l Fluorid (F^-) entsprechen. Dazu wurden Fluoridtabletten für Kinder (Fluoretten® 1mg, Sanofi Aventis, Frankfurt) verwendet. Die Tabletten wurden in einem Mörser zerrieben und in Wasser gelöst. Für die Stammlösung wurden pro Tablette ein ml Wasser hinzugefügt, sodass eine Konzentration von 1mg Fluorid pro ml eingestellt wurde. Die gewünschte Endkonzentration ergibt sich wenn man 1ml der Stammlösung mit einem Liter Zuckerlösung (10%) verdünnt. Die Stammlösung wurde bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

2.9.4.5.2. Herstellung der Carolacton-Stammlösungen

Für den Versuch standen zwei Lösungen mit einer Konzentration von 2mg/ml zur Verfügung. Die Endkonzentration des Carolactons im Trinkwasser sollte 0,25µg/ml betragen. Die Stammlösungen wurden 100fach konzentriert angesetzt, sodass eine Konzentration von 25µg/ml vorlag. Für die Stammlösung wurden 12,5µl der jeweiligen Carolacton-Ausgangslösung mit 1ml Milli-Q-Wasser verdünnt, bzw. mit dem entsprechenden Vielfachen davon. Die gewünschte Endkonzentration ergibt sich wenn man 1ml der Stammlösungen mit 100ml Zuckerlösung (10%) verdünnt Die Stammlösungen wurden bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

2.9.4.6. Mundspüllösung

Zusätzlich zu den Trinkwasserzusätzen wurden Mundspüllösungen hergestellt.

Die Wirkstoffkonzentrationen der Mundspüllösungen waren höher als bei den Trinkwasserzusätzen. Hierbei wurden direkt Gebrauchslösungen angesetzt. Mit Hilfe

einer Pipette wurde den Tieren täglich 100µl der entsprechenden Mundspüllösung in die Maulhöhle appliziert.

2.9.4.6.1. Herstellung der Fluoridlösung

Die Gebrauchskonzentration der Fluorid-Mundspüllösung sollte 250mg/l betragen, was 555,5mg Natriumfluorid (NaF) auf 1000ml Wasser entspricht. Als Gebrauchslösung wurden 55,5mg NaF in 100ml Milli-Q-Wasser gelöst, autoklaviert und aliquotiert. Die Lösungen wurden bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

2.9.4.6.2. Herstellung der Carolactonlösungen

Die Gebrauchskonzentration der Carolacton-Mundspüllösung sollte 50µg/ml betragen. 25µl der Ausgangslösung enthalten 50µg Carolacton (bzw. Placebo), sodass 900µl der jeweiligen Carolacton-Ausgangslösung mit 35,1ml Milli-Q-Wasser gemischt wurden. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

2.9.4.7. Festlegung des Versuchsendes

Um den optimalen Zeitpunkt für das Versuchsende festzulegen wurde am 4. Juli 2011 jeweils ein Tier pro Gruppe vorzeitig eingeschläfert. Nach erfolgter Auswertung der kariogenen Läsionen wurde der Versuch abgebrochen.

2.9.4.8. Auswertung

Auch im zweiten Versuch erfolgte die Auswertung mit molekularbiologischen Methoden und unter zahnmedizinischen Gesichtspunkten (siehe Punkte 2.9.3.8.2. bis 2.9.3.8.4.). Zusätzlich wurden die Kieferschliffe nach der Methode von Larson (*106*) und nach einer selbst entwickelten Methode ausgewertet (siehe Doktorarbeit Vera Heinz).

2.10. DNA-Extraktion

Im Laufe der Arbeit wurde DNA aus verschiedenen Proben (Zellsuspensionen, Wattetupfer, Pinsel) extrahiert. Lag die Probe in Form eines Wattetupfers oder Pinsels (im nachfolgenden als Probekörper bezeichnet) vor, so mussten vor der DNA-Extraktion die Zellen aus den Probekörpern eluiert werden.

2.10.1. Zusätzliche Schritte bei der DNA-Extraktion aus Probekörpern

Bei den Wattetupfern und Pinseln wurden die Stiele entfernt und die Probekörper in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Zu den Proben wurden 200µl Aqua bidest. sowie fünf bis sechs Glaskugeln gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden mit einem Vortexer geschüttelt um die Zellen aus den Probenkörpern zu waschen. Danach wurden die Reaktionsgefäße 5min bei 56°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Probekörper in gelochte 0,5ml Reaktionsgefäße überführt, die wiederum in neue 1,5ml Reaktionsgefäße gestellt wurden. So kann die Flüssigkeit aus den Probekörpern entfernt und im größeren Gefäß aufgefangen werden. Dazu wurden die Reaktionsgefäße 2min bei 8.000rpm zentrifugiert, danach konnte das gelochte 0,5ml Reaktionsgefäß mit dem Probekörper verworfen werden. Der Rest aus dem Ursprungsreaktionsgefäß wurde in das neuere Reaktionsgefäß überführt.

Handelte es sich bei den Bakterien um grampositive Bakterien erfolgte zusätzlich ein enzymatischer Zellaufschluss.

2.10.2. Enzymatischer Zellaufschluss bei grampositiven Bakterien

Der enzymatische Aufbruch der mehrschichtigen Zellwand erfolgt durch die Zugabe von 20µl einer Mutanolysin-Lysozym-Mischung mit anschließender Inkubation für 30min bei 37°C (*107*)(*108*). Dieser Schritt ist bei gramnegativen Bakterien nicht erforderlich. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des QIAamp DNA mini Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert.

2.10.3. DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA mini Kit (250)

Zur Pelletierung der Zellen wurde die Zellsuspension für 2min bei 10.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem Qiagen QIAamp DNA mini Kit (250) und wurde in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die nachfolgenden Schritte wurden in chronologischer Reihenfolge ausgeführt:

1. Zugabe von 20µl Proteinase K und 180µl ATL-Puffer zur Probe
2. Inkubation für 30min bei 56°C im Thermomixer
3. Zugabe von 200µl AL-Puffer
4. Inkubation für 10min bei 70°C im Thermomixer
5. Zugabe von 200µl Ethanol (absolut), Überführung der gesamten Flüssigkeitsmenge in ein Filtertube

6. 1min bei 8.000rpm zentrifugieren (Überstand verwerfen)
7. + 500µl Waschpuffer 1
8. 1min bei 8.000rpm zentrifugieren (Überstand verwerfen)
9. + 500µl Waschpuffer 2
10. 1min bei 8.000rpm zentrifugieren (Überstand verwerfen)
11. 1min bei 13.000rpm zentrifugieren
12. Filter in neues 1,5ml Reaktionsgefäß setzen und 100µl AE-Puffer (Elutionspuffer) dazugeben
13. 1min bei 8.000rpm zentrifugieren

Nach Elution der DNA wurde diese bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.11. Polymerase-Kettenreaktion

In dieser Arbeit wurde die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum qualitativen Nachweis sowie die real-time quantitative PCR (qPCR) zur Quantifizierung der Zielorganismen verwendet. Mit Hilfe der PCR können Gene bzw. Genomabschnitte *in vitro* amplifiziert werden. Da manche Gene charakteristisch für bestimmt Organismen sind, impliziert der Nachweis eines bestimmten Gens die Anwesenheit des damit verbundenen Organismus (*1*). Im Rahmen der Arbeit wurden sowohl spezies-spezifische als auch universelle PCR-Systeme auf Basis von funktionellen und 16S rRNA-Genen eingesetzt.

Im Rahmen der Arbeit wurden neue Primersysteme entwickelt. Die dazugehörigen PCR-Programme werden im Ergebnisteil mit aufgeführt. PCR-Programme von bereits publizierten Primern wurden wie beschrieben durchgeführt. Eine Übersicht der verwendeten PCR-Primer befindet sich im Anhang (Punkt 7.8.). Alle verwendeten Primer wurden von Tib Molbiol (Berlin) bezogen.

2.11.1. Durchführung der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion

Die nachfolgende Tabelle zeigt beispielhaft die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die konventionelle PCR, wie er in allen durchgeführten Reaktionen verwendet wurde.

Tabelle 8: Zusammensetzung eines Ansatzes für die konventionelle PCR

Bestandteil	**Volumen pro Ansatz**
10x PCR Puffer (15mM $MgCl_2$)	5,0µl
dNTPs (je 10µmol)	2,5µl
forward-Primer (100µmol)	0,5µl
reverse-Primer (100µmol)	0,5µl
Taq-Polymerase (1U/µl)	0,5µl
H_2O	40,0µl
Template-DNA	1,0µl
∑ Gesamtvolumen	50,0µl

Für alle Reaktionen wurde die Taq DNA Polymerase sowie der dazugehörige 10x PCR Puffer (15mM $MgCl_2$) von Roche (Mannheim) verwendet. Pro PCR wurde jeweils eine Negativkontrolle (Wasser) eingesetzt.

2.11.2. Agarose-Gelelektrophorese

Eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung der PCR-Amplifikate nach Größe. Alle Versuche wurden mit einem Gelelektrophoresesystem von Roth (Karlsruhe) durchgeführt. Für ein Agarosegel wurden 0,45g Agarose (Merck, Darmstadt) in 30ml 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit einem Tropfen Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) versetzt. Nach Auspolymerisation der Gelmatrix wurden je 10µl der entsprechenden Proben mit 2µl Bluemarker vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als DNA-Marker wurde der AmpliSize Molecular Ruler 50-2.000bp von Biorad (Hercules, USA) oder der FastRuler™ DNA Ladder Low-Range 50-1.500bp von Fermentas (Schwerte) verwendet. Anschließend wurde für 40min eine Spannung von 80V angelegt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet. Da Ethidiumbromid mit der Nukleinsäure interkaliert leuchtet diese unter UV-Licht auf, sodass im Gel Bereich mit einer hohen Nukleinsäurekonzentration als Banden sichtbar werden.
Mit Hilfe des Geldokumentationssystems BioDocAnalyze von Biometra (Göttingen) wurden die Gele fotografiert und dokumentiert. Das System besteht aus einem UV-

Transluminator (Ti5) mit Dunkelkammer und eingebauter Kamera sowie der dazugehörigen Software (Version 2.0).

2.11.3. Durchführung der real-time quantitativen PCR

Die real-time quantitativen PCR Experimente wurden alle mit dem Light Cycler® 2.0 System und der dazugehörigen Software (Version 4.05) der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Für die PCR-Reaktionen wurden das LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit sowie die LightCycler® Capillaries (20µl) (beides Roche, Mannheim) verwendet. Der Mastermix für die Durchführung einer qPCR wurde entsprechend den Herstellerangaben angesetzt und für alle Versuche verwendet.

Tabelle 9: Zusammensetzung eines Ansatzes für die qPCR

Bestandteil	**Volumen pro Ansatz**
Premix	4,0µl
Forward-Primer	0,1µl
Reverse-Primer	0,1µl
Nucleasefreies Wasser	14,8µl
DNA-Template	1,0µl
∑ Gesamtvolumen	20,0µl

Ähnlich wie bei der konventionellen PCR mussten für die verschiedenen Primerkombinationen teilweise neue PCR-Protokolle entwickelt und optimiert werden. Die entsprechenden PCR-Programme werden im Ergebnisteil mit aufgeführt. PCR-Programme von bereits puplizierten Primern wurden wie beschrieben durchgeführt (siehe Punkt 7.8.).

2.11.4. Auswertung der quantitativen real-time PCR

Die Auswertung einer qPCR erfolgte mit Hilfe der LightCycler® Software Version 4.05 von Roche. Mit Hilfe bekannter Standardwerte ist es möglich die Zellzahl einer Probe zu ermitteln.

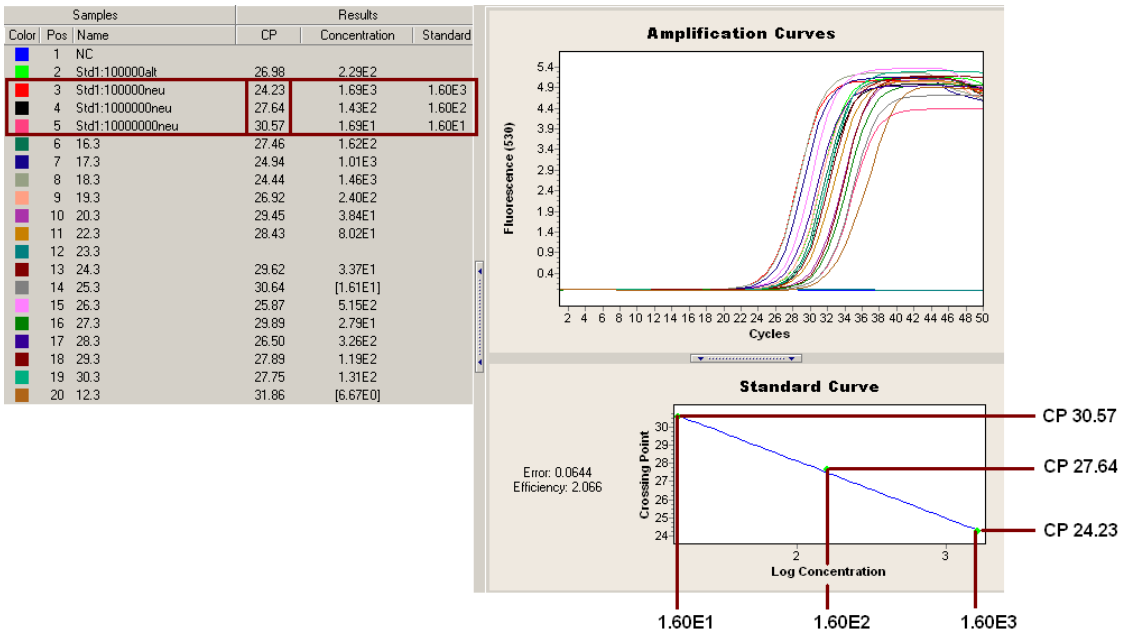


Abbildung 18: Ergebnisausgabe eines LightCycler® Laufs mit Definition der Standardkurve (blau) durch die CP-Werte der verschiedenen Standards (rot markiert)

Die Zellzahlen der Standardwerte wurden im Vorfeld durch Verdünnungsreihen der entsprechenden Keime bestimmt (siehe Punkt 7.10.). Bei der Quantifizierung spielt der crossing point (CP-Wert) eine wichtige Rolle. Bei diesem Wert steigt die Fluoreszenz der Probe über die Hintergrundfluoreszenz exponentiell an. Für die Berechnung einer Standardkurve werden die CP-Werte gegen die Standardwerte aufgetragen. Da durch die Standards bekannt ist bei welchen CP-Werten eine bestimmte Zellzahl erreicht wird, lassen sich die Zellzahlen für die weiteren CP-Werte ebenfalls bestimmen.

2.12. Primerdesign

In dieser Arbeit wurden bereits publizierte und eigens generierte Primer verwendet. Die Entwicklung eigener Primer erfolgte auf Basis der Genomdatenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) und dem Ribosomal Database Project (RDP, http://rdp.cme.msu.edu/). Die Sensitivität und Spezifität wurde mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) und dem Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) überprüft. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Primer sowie die entsprechenden PCR-Programme sind im Anhang unter Punkt 7.8. zusammengefasst.

2.13. Sequenzierung

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene PCR-Produkte sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Didesoxymethode nach Sanger. Um ein bestimmtes Stück DNA sequenzieren zu können müssen verschiedene Schritte durchlaufen werden. Diese werden als Sequenzierungsansatz zusammengefasst:

1. Aufreinigung der PCR-Produkte
2. Ansatz einer Sequenzierungsreaktion
3. Sequenzierung

2.13.1. Aufreinigung der PCR-Produkte

Vor dem Ansetzen der Sequenzierungs-PCR mussten die Proben aus den vorangegangenen PCR-Reaktionen aufgereinigt werden. Die Aufreinigung wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits von Macherey-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.13.2. Sequenzierungsreaktion

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden im Anschluss in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Die Zusammensetzung einer Sequenzierungsreaktion sowie das entsprechende PCR-Programm werden in den folgenden Tabellen beschrieben. Je nach Intensität der Bande in der vorangegangenen Gelelektrophorese wurden 1µl bis 8µl aufgereinigtes PCR-Produkt eingesetzt. Dementsprechend wurde das Volumen an Aqua bidest. angepasst, sodass immer ein Gesamtvolumen von 20µl erreicht wurde.

Tabelle 10: Zusammensetzung einer Sequenzierungsreaktion

Bestandteil	**Volumen pro Ansatz**
Big Dye ™Terminator RR mix	4,0µl
Primer*	2,0µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	1µl bis 8µl
Aqua bidest.	6µl bis 13µl
∑ Gesamtvolumen	20,0µl

*forward- oder revers-Primer (100µmol), 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt

Tabelle 11: PCR Programm der Sequenzierungsreaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	96°C	2min	1x
Denaturierung	96°C	15s	25x
Anlagerung	50°C	15s	
Elongation	60°C	4min	
Kühlung	4°C	∞	1x

2.13.3. Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion

Die Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe des DyeEx™ Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden abschließend in der Vakuumzentrifuge bei 60°C für ca. 30min getrocknet. Danach konnten die aufgereinigten Proben bis zur Sequenzierung bei 4°C gelagert werden.

2.13.4. Sequenzierung

Die aufgereinigten und getrockneten Proben wurden kurz vor der Sequenzierung luftblasenfrei in 20µl HiDi-Puffer (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgenommen und in spezielle Probengefäße überführt. Die Probengefäße wurden mit entsprechenden Septen verschlossen. Die Sequenzierungen wurden mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (alles Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt, dabei wurden folgenden Einstellungen verwendet:

- Injektionszeit 30s
- Kapillare 47µm x 50µm
- Polymer POP-6
- Injektionsspritze
- Autosampler mit 48 Positionen
- Laufzeit pro Sequenz ca. 1h

Nach Abschluss der Sequenzierung können die Ergebnisse als Chromatogramm, z. B. in BioEdit, dargestellt werden.

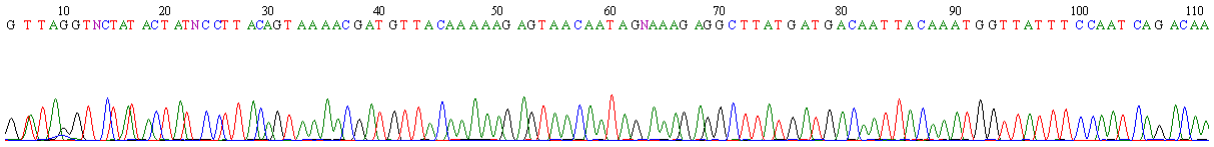


Abbildung 19: Beispiel für ein Chromatogramm einer Sequenzierung (Darstellung mit BioEdit)

2.13.5. Auswertung der Sequenzierungsergebnisse

Mit Hilfe des Programms BioEdit wurden die Rohsequenzen qualitativ überprüft. Bei offensichtlichen Sequenzier-Lesefehlern erfolgte eine manuelle Korrektur. Die Umwandlung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz erfolgte mit Hilfe des „Translate tools“ von Expasy (http://web.expasy.org/translate/). Zur Identifizierung wurden die Sequenzen mit Hilfe des BLAST-Algorithmus gegen die Daten der NCBI-Datenbank oder der BioInSys-Datenbank abgeglichen.

2.14. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl einer Bakterienkultur wurde entweder durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen oder mit Hilfe von Zählkammern (Thoma- oder Bürkerkammer) bestimmt.

2.15. *In silico* Serotypisierung von *S. mutans*

Für eine *in silico* PCR muss man lediglich die Primerpaare (SC, SE und/oder SF, siehe Punkt 7.8.) mit dem Genom des ausgesuchten Stammes vergleichen. Ist das Genom des Stammes bereits veröffentlicht und in der NCBI-Datenbank vorhanden, so ist die Durchführung einer BLAST-Analyse möglich (z. B. gegen die Nucleotide collection oder die Whole-genome shotgun contigs). Verfügt man über eine Genomsequenz die noch nicht öffentlich zugänglich ist kann man ein Analyseprogramm wie GeneDoc oder BioEdit zur Hilfe nehmen. Bei einem positiven Ergebnis wird man jeweils beim Forward- und Reverse-Primer eine 100%tige Übereinstimmung feststellen. Zusätzlich kann der Bereich zwischen den beiden Primer miteinander verglichen werden, was der Größe des „PCR-Produktes“ entspricht.

2.16. Nachweis der Two-Component Systems

Der Nachweis der Two-Component Systems erfolgte mittels konventioneller PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Für die PCR-Experimente wurde

die DNA der *S. mutans*-Stämme UA159 und NCTC11060 sowie die DNA der Stämme *S. ratti* DSM 20564 und *S. sobrinus* DSM 20742 verwendet. Die entsprechenden Primer und PCR-Protokolle werden unter Punkt 7.8. aufgeführt.

2.17. Nachweis chromosomaler TA-Systeme in *S. mutans*

Für den Nachweis der chromosomalen TA-Systeme *mazEF*, *relBE* und *hicBA* in den *S. mutans*-Stämmen UA159, DC09 und NC101 mussten zuerst passend Primer und PCR-Programme entwickelt werden. Für die PCR-Experimente wurde die DNA der entsprechenden Stämme verwendet. Anschließend wurden Sequenzvergleiche der unterschiedlichen TA-Systeme mit Hilfe von GeneDoc auf Nukleotid- und Aminosäureebene durchgeführt. Zusätzlich wurde für das chromosomale und plasmidkodierte *relBE*-System eine Homologieanalyse mittels des Proteinprediction-Programms I-Tasser (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) durchgeführt.

2.18. Nachweis der Laktat-Oxidase in *S. sobrinus*

Der Nachweis der Laktat-Oxidase in *S. sobrinus* wurde mittels konventioneller PCR (Primer Lac-F / Lac-R) durchgeführt. Dazu wurde die DNA der folgenden Stämme verwendet: *S. mutans* NC378 und KK15/95, *S. sobrinus* AC153 und DSM 20742, *S. macacae* und *S. gordonii*. Zusätzlich wurde eine computergestützte Genomanalyse durchgeführt, die die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Enzyme (Laktat Oxidase, Pyruvat Oxidase, Pyruvat Dehydrogenase Komplexes (E1 + E2), Phosphatacetyl-Transferase, Acetat Kinase) des Pyruvatstoffwechsels in der BioInSys-Datenbank (http://134.28.64.65/www/index.php) (insgesamt 57 Stämme) untersuchte.

2.19. Entwicklung einer neuen Karies-PCR

Um die neu entdeckten Karies-Erreger *Scardovia wiggsiae* und *Bifidobacterium dentium* genauer auf ihre Kariogenität hin untersuchen zu können wurden neue Primer und PCR-Programme sowohl für konventionelle PCR als auch für qPCR entwickelt. Für die PCR-Experimente wurden die DNA folgenden Stämme verwendet: *S. wiggsiae*, *B. dentium*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* und *S. mutans* UA159.

2.19.1. Pilot-Studie mit Patientenproben

Nach Entwicklung der neuen „Karies-PCR“ wurde eine Pilot-Studie mit insgesamt 20 Patientenproben durchgeführt. Es wurden 10 Proben von Kariespatienten untersucht sowie 10 Proben von gesunden Probanden, die als Kontrolle dienten.

Die Karies-Proben wurden aus kariogenen Läsionen mit Hilfe eines speziellen Karies-Entnahmebestecks (LCL biokey GmbH, Herzogenrath) entnommen.



Abbildung 20: Karies-Entnahmebesteck besteht aus Wattetampon (links) und Pinsel (rechts)

Dabei wird mit dem Pinsel ein Abstrich der kariogenen Läsion gemacht. Zusätzlich kann der Wattetampon in den Mund genommen werden und so den durch Kauen sezernierten Speichel aufnehmen. Für die Pilotstudie wurden nur die Abstrichpinsel ausgewertet. Auf die Bestimmung der Zellzahlen im Speichel (Wattetampon) wurde verzichtet, da nicht von allen Probanden eine Speichelprobe vorlag.

Nach DNA-Extraktion wurde die Gesamtzellzahl der Proben durch qPCR mit Hilfe universeller Primer (Nadkarni F / Nadkarni R) bestimmt. Zusätzlich wurde die Zellzahl von *S. mutans* (Sm F5 / Sm R4), *S. wiggsiae* (Scar448F / Scar619R) und *B. dentium* (Bifdent846F / Bifdent1011R) ermittelt. Als Kontrolle dienten zehn Proben von gesunden Probanden, bei denen dieselben Werte ermitteln wurden.

Besonderer Dank gilt an dieser Stelle den Patienten bzw. gesunden Probanden für die Bereitstellung der Proben, den Zahnärzten der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde für die Probenentnahme sowie der LCL biokey GmbH für die Bereitstellung der Materialien.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Tierversuche

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Tierversuche untersuchten den Einfluss des neu entdeckten Biofilminhibitors Carolacton *in vivo* auf die Kariesbildung im Rattenmodell. Der Karieserreger *Streptococcus mutans* diente dabei als Marker für die Kariesbildung. Um die Konzentration der Mutans-Streptokokken in der Mundflora zu kontrollieren wurden regelmäßig Abstriche aus der Maulhöhle der Tiere entnommen. Am Ende der jeweiligen Versuchsreihe wurden die Kiefer der Tiere präpariert, um die Kariesprogression beurteilen zu können. Die Auswertung der kariogenen Läsionen bezogen auf deren Vorkommen, Art, Tiefe und Lage werden in der zahnmedizinischen Doktorarbeit von Vera Heinz („Testung des Biofilminhibitors Carolacton im Kariesmodell der Ratte“) eingehender behandelt. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die mikrobiologische und molekularbiologische Auswertung der Abstriche und den Zusammenhang mit den gefundenen Kariesläsionen. Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse pro Versuch zusammengefasst und abschließend unter Abschnitt 4.1. diskutiert.

3.1.1. Ergebnisse Tierversuch 1 – Carolacton als Additiv im Zahnlack

Im ersten Tierversuch wurde ein Zahnlack mit dem Wirkstoff Carolacton verwendet. Dieser Lack wurde speziell von der Firma Voco entwickelt. Um eine ausreichende Wirkstoffkonzentration zu erreichen wurde die Applikation des Zahnlacks zweimal wiederholt. Der Lack fungiert so als eine Art Schutzschicht auf den Zähnen. Das darin enthaltene Carolacton sollte in die Umgebung diffundieren und eine Besiedlung der Zähne durch den Karieserreger *S. mutans* erschweren.

3.1.1.1. Reduktion der natürlichen Rattenflora vor Inokulation

Durch die antiinfektive Behandlung mit Chlorhexidin und Augmentan zu Beginn des Versuchs sollte die physiologische mikrobielle Flora im Maul deutlich reduziert werden. So wurde die gezielte Ansiedlung mit *S. mutans* erleichtert. Chlorhexidin dient in der Zahnmedizin als Antiseptikum, während Augmentan der Handelsname für ein Kombipräparat aus Amoxicillin und Clavulansäure ist. Amoxicillin ist ein Breitspektrumantibiotikum, das zur Klasse der β-Lactam-Antibiotika gehört. In Kombination mit dem β-Lactamase-Inhibitor Clavulansäure wird das Wirkspektrum

erweitert. Die verschiedenen Agarplatten (nicht selektiver Columbia-Agar, MacConkey-Agar für gramnegative Keime, Colistin-Agar für grampositive Keime) aus dem ersten Abstrich vor der antiinfektiven Behandlung wiesen erwartungsgemäß bei allen drei exemplarisch untersuchten Tieren eine hohe Keimzahl und Keimvielfalt auf. Neben den Streptokokken zählen auch Laktobazillen, Aerokokken, Staphylokokken oder coliforme Keime (Fäkalkontamination) zur physiologischen Maulflora der Ratte. Die Zellzahl lag mit mehr als 10^4 Zellen pro Abstrich im Normalbereich. Der Anteil an coliformen Keimen lag bei ca. 1% und entsprach 50 bis 100 CFU auf MacConkey-Agar. Die Platten bzw. die korrespondierenden Abstriche nach der antiinfektiven Therapie wiesen eine deutliche Reduktion der Keimzahl um mehr als zwei Zehnerpotenzen auf. Die gesamte Fraktion grampositiver Keime war nur noch mit maximal 50 CFU pro Abstrich vertreten. Die gramnegative Flora wies maximal 20 CFU Zellen pro Abstrich auf. Auf eine weitergehende Differenzierung und die exakte Zellzahlbestimmung wurde verzichtet. Beispielhaft wird die Auswertung der Abstriche im zweiten Tierversuch, unter Punkt 3.1.2.1. dargestellt.

3.1.1.2. Zellzahlbestimmung des *S. mutans* Inokulums

Durch Ausplattieren einer entsprechenden Verdünnungsreihe wurde die Zellzahl der hoch konzentrierten *S. mutans* Zellsuspension bestimmt.

Tabelle 12: CFU der ausplattierten Verdünnungsstufen 10^{-6}, 10^{-7} und 10^{-8} pro 100µl

Ausplattierte Verdünnungsstufe	CFU
10^{-6} und 10^{-7}	nicht zählbar
10^{-8}	16

Es wurde eine Zellzahl von $1{,}6 \times 10^7$ *S. mutans* Zellen pro µl berechnet (entspricht $1{,}6 \times 10^{10}$ Zellen pro ml). Da pro Inokulation 100µl eingesetzt wurden, lag das Inokulum für eine Ratte bei $1{,}6 \times 10^9$ Zellen pro Tag.

Von den Verdünnungsstufen wurde die DNA präpariert, sodass diese als Standardwerte für die nachfolgenden qPCR-Läufe eingesetzt werden konnte. Dementsprechend wurden die Standardwerte für die weiterführenden qPCRs wie folgt festgelegt:

Tabelle 13: Standardwerte für die qPCR während des ersten Tierversuchs

Verdünnungsstufe	Zellzahl
10^{-2}	$1{,}6x10^{5}$
10^{-3}	$1{,}6x10^{4}$
10^{-4}	$1{,}6x10^{3}$
10^{-5}	$1{,}6x10^{2}$

3.1.1.3. Molekulargenetische Auswertung des ersten Tierversuchs

Um eine umfassende Kontrolle der S. mutans-Population zu gewährleisten, wurden während des ersten Versuchs zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten Abstriche aus den Maulhöhlen der Ratten entnommen. Die ersten Abstriche, am 2. bzw. 11. November 2010, dienten der Kontrolle einer erfolgreichen Ansiedlung von S. mutans. Vor der zweiten Lackierung bzw. eine Woche später wurden die zweiten und dritten Abstriche entnommen (25. November und 03. Dezember 2010). Der dritte Abstrich sollte überprüfen welchen Einfluss die zweite Lackierung auf die Entwicklung der Zellzahlen hatte. Nach Finalisierung der Ratten wurde ein letzter Abstrich zur Bestimmung der Zellzahlen zum Ende des Versuchs entnommen.

Um eine adäquate Zellzahl wiederzugeben wurden alle Ergebnisse der qPCR-Experimente mit Faktor 200 multipliziert. Diese Größe setzt sich aus den folgenden Elementen zusammen: erstens wurde die Gesamt-DNA pro Abstrich mit 100µl Puffer eluiert, davon wurde jedoch nur 1µl DNA als Template bei der qPCR verwendet (Faktor 100). Zweitens kommt es bei der Resuspension der Zellen aus dem Tupfer zu Verlusten, sodass die Ausbeute aus den Abstrichtupfern erfahrungsgemäß nur 50% entspricht (Faktor 2).

Die verwendeten Primer Sm F5 und Sm R4 erfassen pro Genom das Gen für die Glucosyltransferasen–I und –SI. Es werden also theoretisch mindestens zwei Kopien pro Zelle erzeugt, sodass dieser Faktor bei der Umrechnung zwischen Genomäquivalenten und Zellzahl berücksichtigt werden muss. Dieser zusätzliche Faktor wurde hier nicht berücksichtigt, da er sich beim Umrechnen von definierten Zellzahlen zu qPCR-Eichkurve und qPCR-Wert zur abgeleiteten Zellzahl rausrechnet.

Alle Ergebnisse der qPCRs sowie die daraus resultierenden Zellzahlen befinden sich im Anhang (Punkt 7.4.1.).

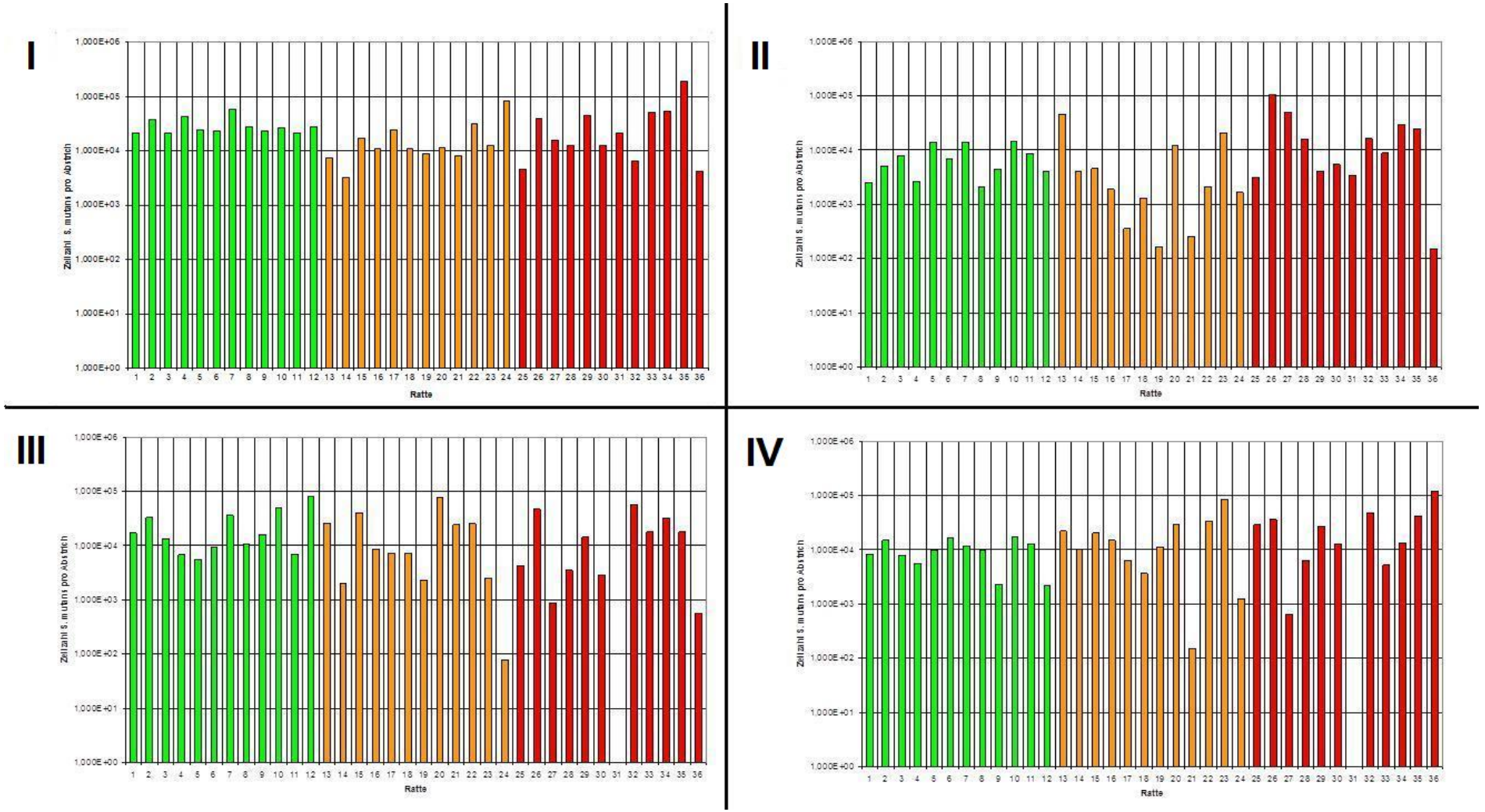


Abbildung 21: Zellzahlen von *S. mutans* pro Abstrich und Ratte (1-36) zu verschiedenen Zeitpunkten (I = erster Abstrich inkl. Kontrollabstrich, II = zweiter Abstrich, III = dritter Abstrich, IV = finaler Abstrich, logarithmische Auftragung; Kontrollgruppe = grün, Lack C = orange, Lack D = rot).
Ratte 31 verstarb zwischen Abstrich zwei und drei, weshalb dort keine Zellzahlen mehr vorliegen.

3.1.1.3.1. Erster Abstrich - Überprüfung auf erfolgreiche Ansiedlung

Fünf Tage nach Inokulation mit *S. mutans* und nach der Lackbehandlung der Gruppen C und D wurden von allen Ratten Abstriche entnommen, um zu kontrollieren ob die Ansiedlung mit *S. mutans* erfolgreich war. Betrachtet man Abbildung 21 dann fällt auf, dass die Ergebnisse in der Kontrollgruppe (grün) im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen wesentlich homogener erscheinen. Die Zellzahlen in der Kontrollgruppe liegen im Bereich von $2{,}10x10^4$ bis $6{,}00x10^4$ Zellen bei einem Mittelwert (MW) von $2{,}98x10^4$ Zellen und einem Standardfehler (SE) von $3{,}41x10^3$. An Hand dieser Ergebnisse konnte man davon ausgehen, dass die Ansiedlung von *S. mutans* innerhalb der Kontrollgruppe in jedem Fall gelungen war.
Die Zellzahlen in den anderen beiden Gruppen fallen teilweise deutlich niedriger aus, was eine heterogenere Verteilung der Zellzahlen zur Folge hat. Bei Lack C schwanken die Werte zwischen $6{,}00x10^1$ und $3{,}20x10^4$ Zellen, während sie in der Lack D Gruppe zwischen $2{,}20x10^2$ und $5{,}20x10^4$ Zellen schwanken. Dieses Ergebnis könnte auf den Einfluss der Lacksubstanz und der damit verbundenen Behandlung zurückzuführen sein. Die dauerhafte Besiedlung der Maulhöhle mit *S. mutans* konnte so noch nicht ausreichend bewiesen werden, sodass eine Woche später bei den Tieren 15, 18, 19, 24, 28, 29, 30, 34 und 35 ein weiterer Kontrollabstrich gemacht wurde. Nach Auswertung der Kontrollabstriche lagen die Zellzahlen nun bei allen getesteten Tieren über $3{,}00x10^3$ Zellen pro Abstrich (Lack C: MW $1{,}94x10^4$, SE $6{,}41x10^3$; Lack D: MW $3{,}86x10^4$, SE $1{,}51x10^4$). Im Vergleich zum ersten Abstrich sah man bei den Tieren 24, 34 und 35 einen besonders starken Anstieg der Zellzahlen. Zwar zeigten die beiden Lack-Gruppen weiterhin eine deutlich höhere Streuung als die Kontrollgruppe, allerdings konnte man nun aufgrund der vorliegenden Zahlen von einer ausreichenden Besiedlung durch *S. mutans* bei allen Tieren ausgehen.

3.1.1.3.2. Zweiter Abstrich - vor der zweiten Lackbehandlung

Der zweite Abstrich wurde unmittelbar vor der zweiten Lackierung der Ratten entnommen und sollte zeigen wie stabil die Entwicklung der *S. mutans*-Population nach einigen Wochen ist. Gleichzeitig konnten so Referenzwerte für die zweite Lackbehandlung erhoben werden. Ähnlich wie beim ersten Abstrich schwankten die Werte innerhalb der einzelnen Gruppen sehr stark. Erneut zeigte die Kontrollgruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen die homogenste Verteilung der Zellzahlen ($2{,}08x10^3$ bis $1{,}44x10^4$ Zellen). Die Werte innerhalb der Lack C Gruppe

schwankten hingegen von $1,64x10^2$ Zellen bei Ratte 19 bis hin zu ca. $4,52x10^4$ Zellen bei Ratte 13. In der Gruppe Lack D ist die Spanne sogar noch größer: hier schwankten die Werte von $1,49x10^2$ Zellen bei Ratte 36 bis hin zu $1,05x10^5$ bei Ratte 26. Insgesamt bleibt eine etwas niedrigere Zellzahl in der Lack C Gruppe anzumerken (MW $7,86x10^3$ gegenüber MW $2,22x10^4$ bei Lack D). Dieser Unterschied ist aber aufgrund der Streuungen nicht signifikant und verschwand mit den nachfolgenden Abstrichergebnissen.
Ratte 31 verstarb während des Narkoseprozesses, weshalb für die letzten beiden Abstriche keine Werte mehr vorliegen.

3.1.1.3.3. Dritter Abstrich - Einfluss der zweiten Lackbehandlung

Der dritte Abstrich erfolgte eine Woche nach der zweiten Lackierung um zu überprüfen, ob die erneute Lackierung der Molaren einen direkten Einfluss auf die Zellpopulation von *S. mutans* hatte. Nach dem dritten Abstrich sieht man, dass die Zellzahlen weiterhin sehr heterogen sind und eine große Streuung aufweisen (Kontrolle $5,58x10^3$ bis $8,04x10^4$ Zellen; Lack C: $7,85x10^1$ bis $7,54x10^4$; Lack D: $5,70x10^2$ bis $5,68x10^4$). Eine direkte Auswirkung der erneuerten Lackbehandlung ist nicht sichtbar.

3.1.1.3.4. Vierter Abstrich - Bestimmung der Zellzahl am Versuchsende

Nach der Finalisierung der Ratten wurde ein letzter Abstrich entnommen, um die abschließenden Zellzahlen zu bestimmen. Die Zellzahlen der Kontrollgruppe erscheinen erneut am Homogensten, sie schwanken von $2,23x10^3$ bis $1,71x10^4$ Zellen (MW $9,90x10^3$, SE $1,39x10^3$). Die Zellzahlen in den beiden Lack-Gruppen schwanken immer noch sehr stark von Tier zu Tier. In der Lack C Gruppe weist Ratte 21 eine Zellzahl von $1,50x10^2$ Zellen auf, während Ratte 23 eine Zellzahl von $8,38x10^4$ Zellen aufweist. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Lack D Gruppe, dort schwanken die Werte von $6,44x10^2$ Zellen bei Ratte 27 bis $1,22x10^5$ Zellen bei Ratte 36. In beiden Gruppen sind die mittleren Zellzahlen jetzt höher als in der Kontrollgruppe (Lack C: MW $1,98x10^4$, SE $6,32x10^3$; Lack D: MW $3,10x10^4$, SE $9,73x10^3$).

3.1.1.3.5. Ergebnisübersicht aller Abstriche

Um eine bessere Übersicht über den gesamten Verlauf der Mutans-Streptokokkenkeimzahl pro Tier zu erhalten, werden nachfolgend noch mal alle Ergebnisse als Liniendiagramme dargestellt. Die Diagramme sollen zeigen, wie sich die Zellzahlen innerhalb einer Gruppe im Verlauf des Versuchs entwickelt haben. Besonders große Schwankungen fallen so besser auf und verdeutlichen individuelle und damit versuchstierspezifische Unterschiede.

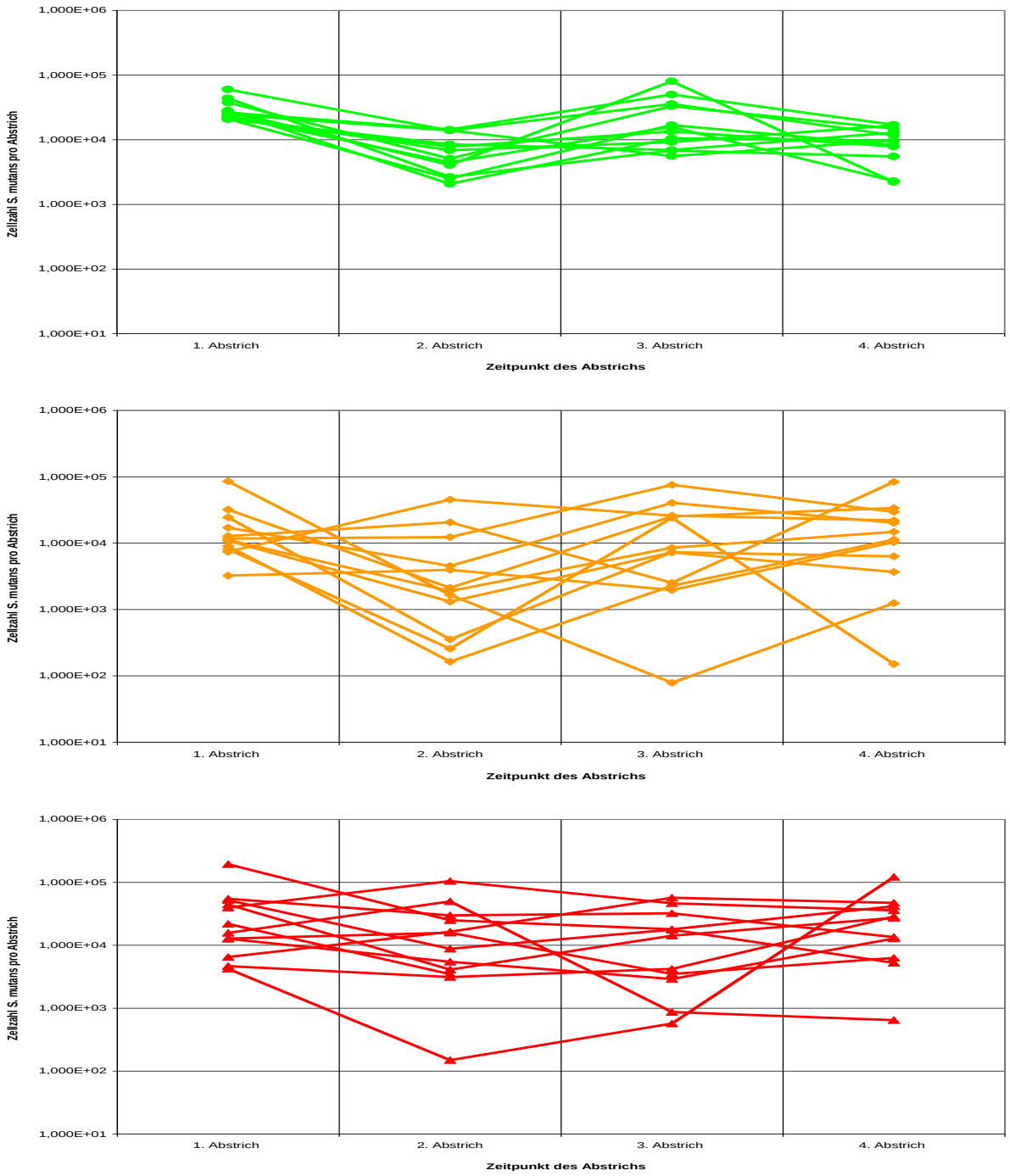


Abbildung 22: Diagramme zur Entwicklung der Zellzahlen pro Abstrich und Tier über den gesamten Versuch (logarithmische Auftragung; Kontrollgruppe = grün, Lack C = orange, Lack D = rot)

Vergleicht man nun die drei Gruppen miteinander, stellt man fest, dass die Kontrollgruppe den homogensten Verlauf zeigt. Die Linien aller Versuchstiere verlaufen sehr ähnlich zu einander. Tendenziell erkennt man einen leichten Abfall in den Zellzahlen zwischen dem ersten und zweiten Abstrich sowie dem dritten und letzten Abstrich. Während zwischen dem zweiten und dritten Abstrich ein leichter Anstieg der Zellzahlen erkennbar ist. Bei den beiden anderen Gruppen ist die Verteilung heterogener, da in beiden Fällen eine deutlichere Streuung sichtbar wird. Es ist schwierig eine einheitliche Tendenz zu erkennen, da immer wieder einzelne Tiere eine gegensätzliche Entwicklung zeigen. Es wird deutlich, dass Narkose und anschließende Behandlung der Ratten mit dem Lack – unabhängig vom Wirkstoff – zu einer, möglicherweise stressbedingten, Verstärkung der individuellen Schwankungen geführt haben. Abbildung 23 zeigt den Verlauf der mittleren Zellzahlen pro Gruppe (mit Standardfehler).

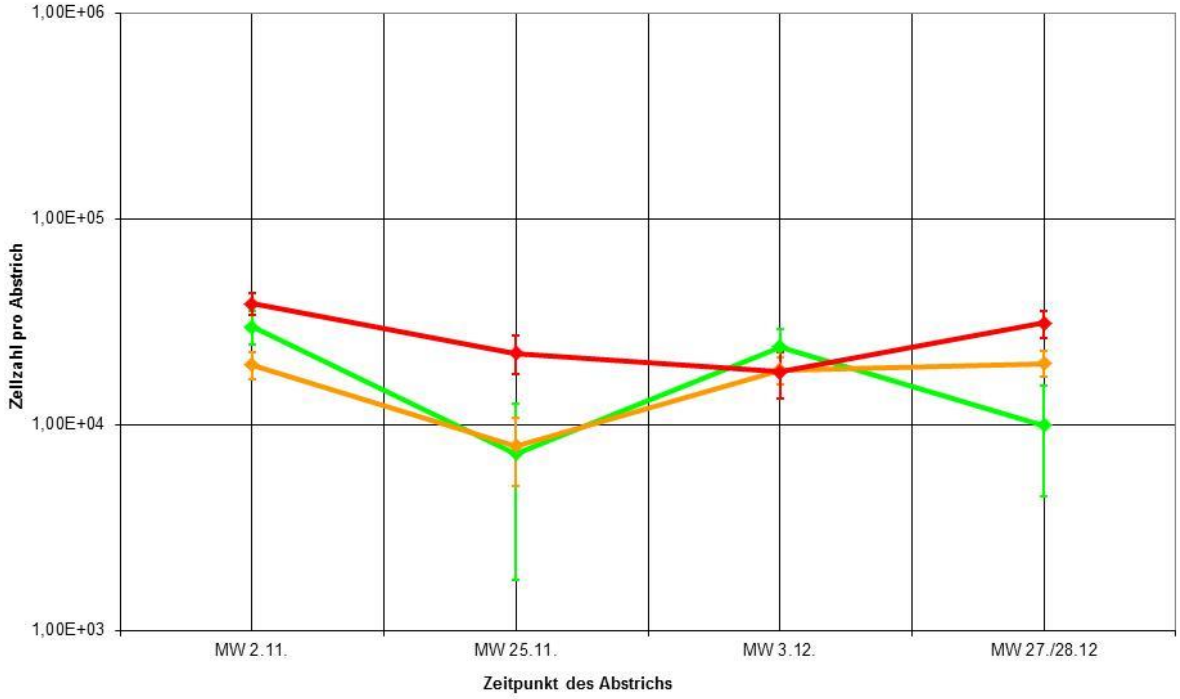


Abbildung 23: Übersicht über die Mittelwerte mit Standardfehler aller vier Abstriche (logarithmische Auftragung; Kontrollgruppe = grün, Lack C = orange, Lack D = rot)

In dieser Darstellung erkennt man, dass im Mittel die Zellzahlen der Gruppe Lack D zu Beginn des Versuchs etwas höher waren, gefolgt von der Kontrollgruppe und Gruppe Lack C. Zwischen dem ersten und zweiten Abstrich erkennt man bei allen drei Gruppen einen Abfall der Zellzahlen. Dieser Abfall ist in der Kontrollgruppe am größten und in der Gruppe Lack D am schwächsten. Diese Tendenz setzt sich bei

Gruppe Lack D zwischen dem zweiten und dritten Abstrich fort, während bei der Kontrollgruppe und Gruppe Lack C ein Anstieg der Zellzahlen zu beobachten ist. Zwischen dem dritten und letzten Abstrich sinken die durchschnittlichen Zellzahlen der Kontrollgruppe leicht unter das Anfangsniveau. Die Zellzahlen der beiden Lack Gruppen steigen zwar leicht, erreichen aber im Endeffekt in etwa wieder ihr Ausgangsniveau.

3.1.1.4. Zahnmedizinische Auswertung des ersten Tierversuchs

Nach dem Einschläfern der Tiere wurden die Kiefer präpariert und aufgearbeitet. Dabei standen der visuelle Nachweis der Plaquebildung sowie der sichtbare Nachweis der Kariesinzidenz und der Kariesprogression im Vordergrund.

3.1.1.4.1. Plaquefärbung

Nach der Färbung war bei allen Kiefern eine deutliche Plaqueschicht auf den Zähnen zu erkennen. Die violette Färbung zeigt, dass es sich um eine Mischung aus frischer und alter Plaque handelt. Je intensiver die Farbe, desto dicker ist die Plaqueschicht. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen beispielhaft je eine Kieferhälfte pro Gruppe.

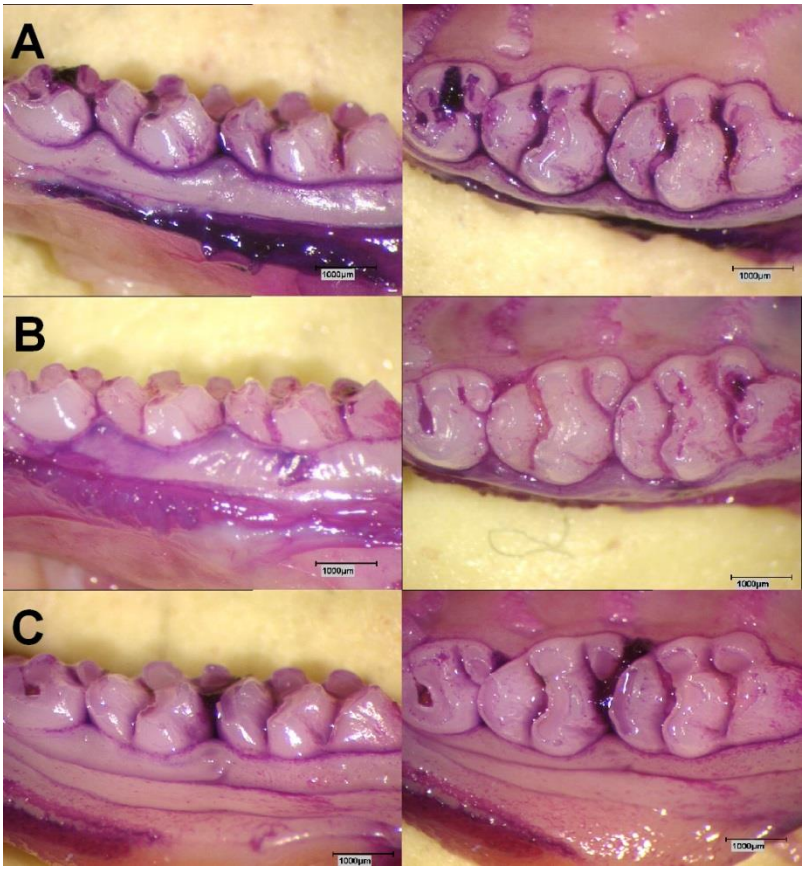


Abbildung 24: Plaquefärbung einer Oberkieferhälfte bukkal (links) und okklusal (rechts)
(A: Kontrollgruppe, B: Lack C Gruppe, C: Lack D Gruppe)

Die deutlichste Plaqueschicht ist vor allem in den tiefen Fissuren und gingival am Übergang zum Zahnfleischrand sichtbar. In der okklusalen Ansicht sind die violett verfärbten Bereiche auf den Zähnen gut erkennbar. Die alleinige Auswertung der Plaquefärbung zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.1.1.4.2. Kariesfärbung und Auswertung

Nach der Aufnahme von Zucker kommt es zum kariogenen Säureangriff, d. h. die in der Nahrung enthaltene Saccharose wird von den Plaquebakterien verstoffwechselt. Das durch die Milchsäuregärung entstandene Laktat bewirkt einen lokalen Abfall des pH-Wertes und demineralisiert das Zahnhartgewebe. Basisches Fuchsin färbt diese sauren Bereiche an und markiert so kariöse Stellen (siehe schwarz eingekreiste Bereiche in Abbildung 25).

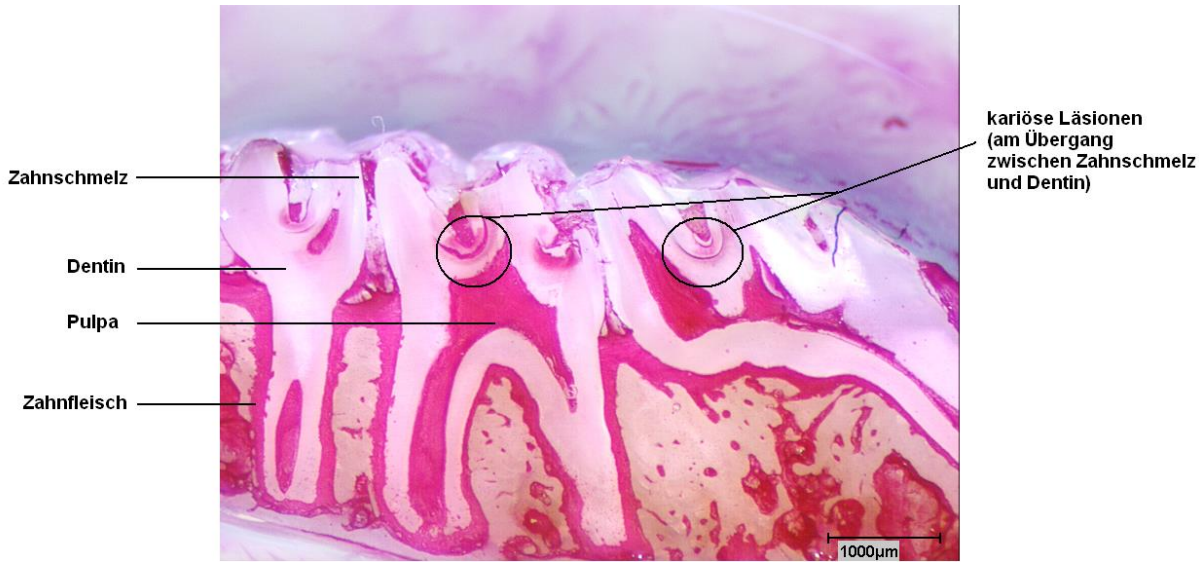


Abbildung 25: Beschriftete Aufnahme eines mit Fuchsin gefärbten Kieferschliffs

Das Fuchsin färbt allerdings auch Gewebe (z. B. die Pulpa oder das Zahnfleisch) an, wie man in Abbildung 25 erkennen kann. Eine exakte Betrachtung der betroffenen Stellen ist daher sehr wichtig. Die Demineralisierung zwischen Zahnschmelz und Dentin wird unter dem Rasterelektronenmikroskop sehr deutlich. Wie man in Abbildung 26 erkennen kann, findet an den demineralisierten Stellen (eingekreiste Bereiche bei B) eine Trennung der beiden Schichten statt. Die dunklen Stellen zeigen deutlich, dass sich an den betroffenen Stellen Spalten gebildet haben und Teile des Zahnhartgewebes bereits aufgelöst wurden. Die Spalten sind genau auf Ebene der Kontaktzone zwischen bakteriellem Biofilm und dem Substrat Saccharose ausgebildet, wo auch die stärkste Säurebildung zu erwarten ist (siehe Abbildung 26,

weißer Pfeil). Ausgehend von den Läsionen kann man nun die Zahnschmelz-Dentin-Grenze gut erkennen, sie wird durch die schwarzen Pfeile (bei B) markiert.

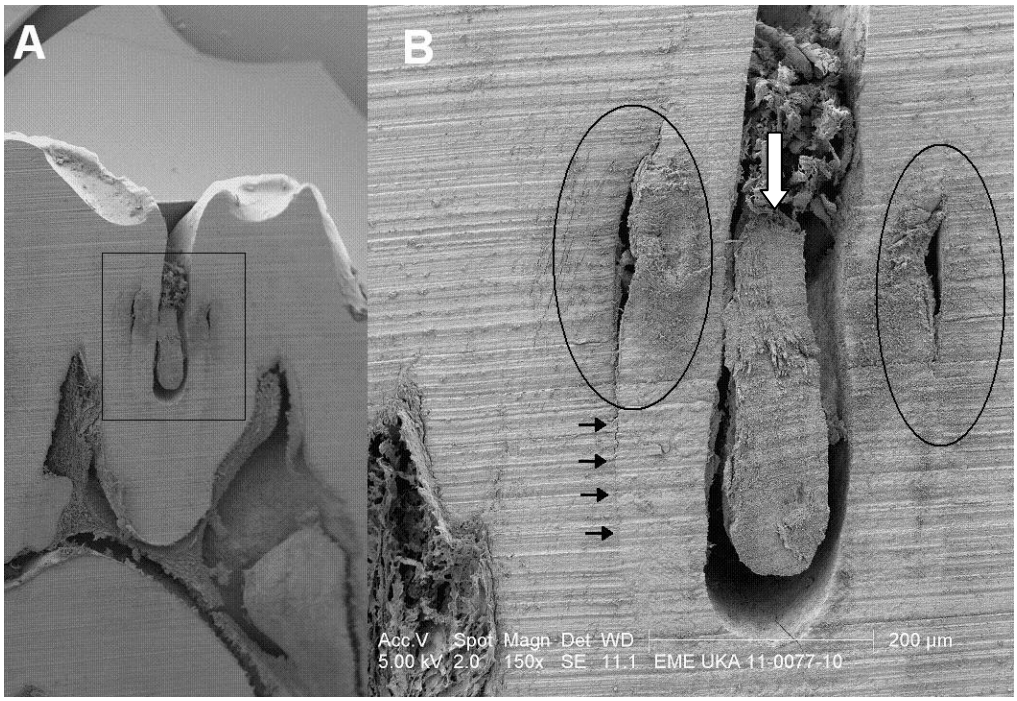


Abbildung 26: REM-Aufnahmen einer fortgeschrittenen kariösen Läsion mit Ablösungen an der Zahnschmelz-Dentin-Grenze (Vergrößerung: A = 36x, B = 150x)

Pro Tier erhielt man 4 Kieferhälften (zweimal Oberkiefer sowie zweimal Unterkiefer), sodass von jeder Kieferhälfte drei bis vier Schliffe in den unterschiedlichen Ebenen – vor, in und nach der Hauptfissur – angefertigt werden konnten. Insgesamt wurden dann die drei besten Schliffe pro Kieferhälfte ausgewertet, sodass bei der Kontrollgruppe und der Lack C Gruppe 144 Aufnahmen der Kariesfärbung ausgewertet wurden. Bei der Lack D Gruppe wurden 132 Aufnahmen ausgewertet, da dort bei Abschluss des Versuches nur noch 11 Tiere vorhanden waren. Die nachfolgende Abbildung zeigt beispielhaft einen Schliff (von mesial nach distal) pro Gruppe.



Abbildung 27: Kariesfärbung eines Kieferschliffs pro Gruppe in der Aufsicht (A: Kontrollgruppe, B: Lack C Gruppe, C: Lack D Gruppe)

Wie man erkennen kann besteht kein offensichtlicher Unterschied in der Kariesaktivität zwischen den Gruppen. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen wurden die Schliffe nach der Methode von Keyes (*105*) analysiert. Keyes unterteilt die kariogenen Läsionen je nach Schweregrad in vier verschiedene Kategorien: Schmelzkaries (Enamel caries, E), oberflächliche Dentinkaries (Dentin surface caries, Ds), mittlere Dentinkaries (Dentin medium caries, Dm) und tiefe Dentinkaries (Dentin deep caries, Dx). Durch ein einheitliches Beurteilungssystem (Karies Scoring) können die kariogenen Läsionen je nach Schweregrad bewertet werden, sodass ein direkter Vergleich der verschiedenen Gruppen möglich ist. Die Ergebnisse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Apel zur Verfügung gestellt. Es wurden folgende Ergebnisse dokumentiert:

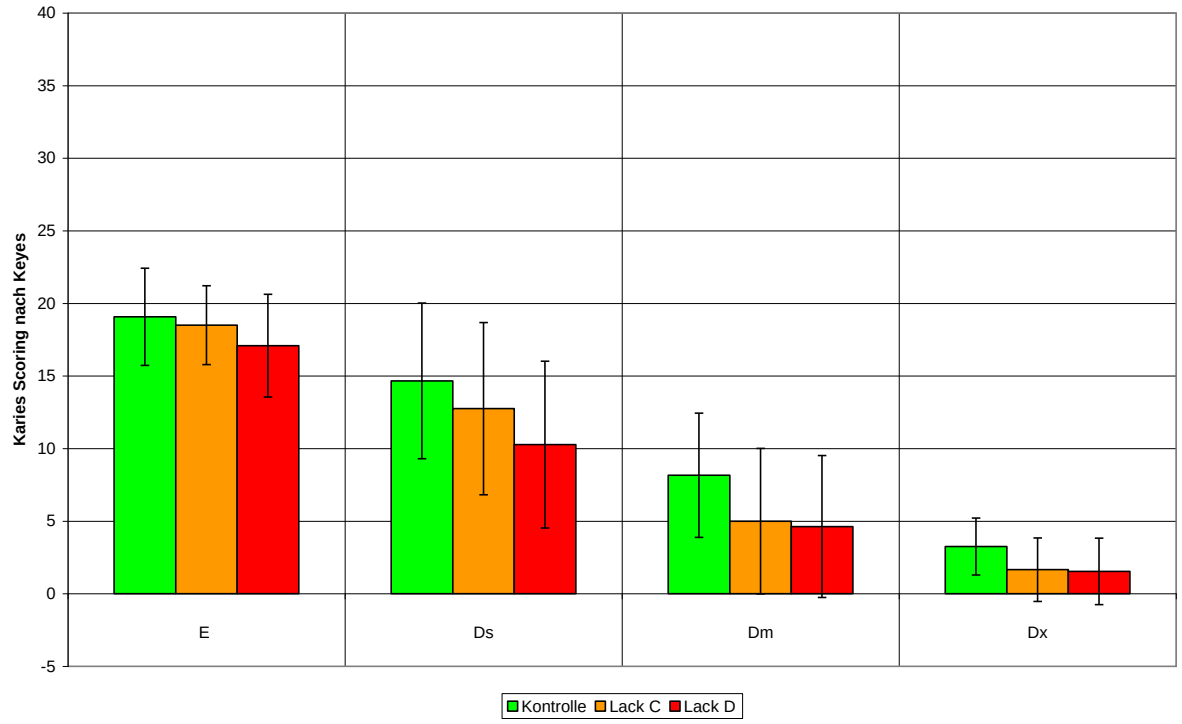


Abbildung 28: Auswertung der Kariesläsionen (MW mit Standardabweichung) der drei Gruppen nach Keyes (E = Enamel caries, Ds = Dentin surface caries, Dm = Dentin medium caries, Dx = Dentin deep caries)

Man kann erkennen, dass in der Kontrollgruppe geringfügig mehr Karies vorhanden war als in den beiden Gruppen mit den lackierten Zähnen. Dies gilt für alle vier Kariesstufen E bis Dx.

In den Kategorien E und Ds ist bei Lack C etwas mehr Karies dokumentiert worden als bei Lack D. Während zwischen den Kategorien Dm und Dx kaum noch Unterschiede erkennbar sind.

3.1.1.5. Nachweis von *S. mutans*-Zellen durch REM-Aufnahmen

Die physiologische Flora der Ratten konnte nicht komplett durch die antiinfektive Therapie unterdrückt werden. Nach der antiinfektiven Behandlung konnte sie sich wieder neben *S. mutans* in der Maulhöhle ausbreiten. Von daher war es wichtig den Erreger der Kariesläsionen möglichst eindeutig als *S. mutans* zu identifizieren. Ein Nachweis der *S. mutans* Zellen direkt in den Fissuren der Rattenzähne ist allerdings schwierig. Rattenzähne haben eine maximale Kantenlänge von 3 mm, die Fissuren sind sehr schmal (maximal 0,1 mm) und dabei vergleichsweise tief (bis 0,8 mm). Dies erschwert eine *in situ* Probenentnahme.

Ein Abstrich mit einem herkömmlichen Wattestäbchen kann somit nur oberflächliche Keime erreichen. Auch ein Auskratzen der Fissuren mit speziellen Sonden, die auch in der Zahnheilkunde verwendet werden, war nicht erfolgreich. Ebenso wenig funktionierte die Markierung der *S. mutans* Zellen durch fluoreszenzmarkierte und (nach Herstellerangaben, antibodies-online, Aachen) spezifische Antikörper. Die starke Eigenfluoreszenz des Dentins stellte dabei ein ebenso großes Problem dar wie die Unspezifität des kommerziellen Antikörpers. Des Weiteren wurde versucht die Zellen im Biofilm mittels Ultraschallbehandlung aus den tiefen Fissuren zu lösen, aber auch dieser Ansatz war praktisch nicht durchführbar. Da keine der oben genannten Methoden den gewünschten Erfolgt zeigte, entschieden wir uns für den visuellen Nachweis durch Rasterelektronenmikroskopie. Das Rasterelektronenmikroskop (REM) ermöglicht Vergrößerungen bis zum 25.000fachen der Originalgröße. Die Bilder sind sehr detailliert und können gut analysiert werden. Für die Aufnahmen wurde der letzte Schliff von Ratte 10 verwendet. Die nachfolgenden Bilder zeigen den Weg des Rasterelektronenmikroskops vom ganzen Zahn bis hin zum Biofilm innerhalb einer Fissur. Die schwarz umrandeten Bereiche markieren jeweils den Ausschnitt für die nächste Vergrößerung.

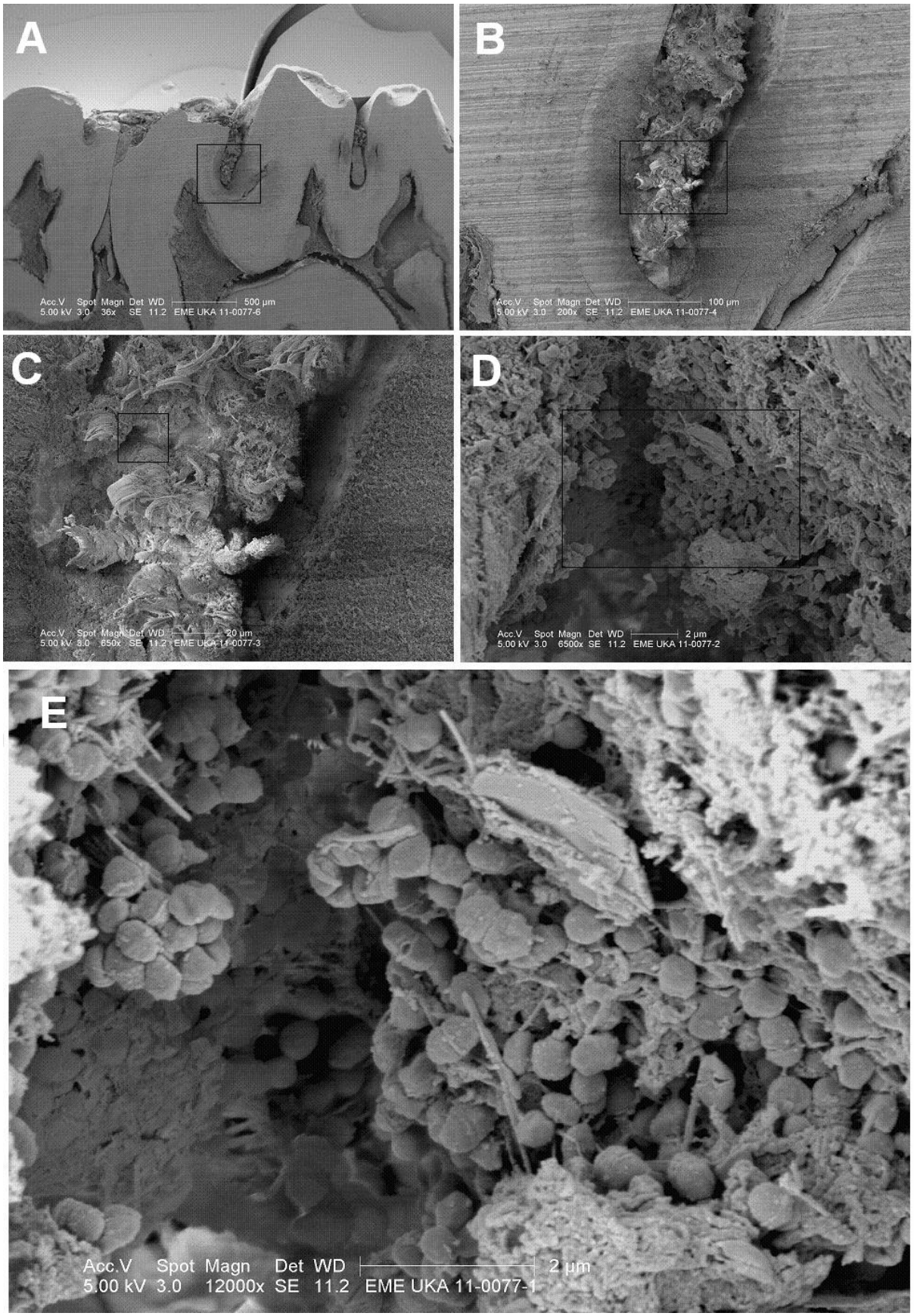


Abbildung 29: REM-Aufnahmen einer kariösen Läsion aus dem letzten Schliff von Ratte 10 (Kontrollgruppe) mit unterschiedlichen Vergrößerungen (A = 36x, B = 200x, C = 650x, D = 6.500x und E = 12.000x)

Wie man auf den Bilder deutlich erkennen kann liegen die *S. mutans* Zellen zu tausenden nebeneinander, untereinander und bilden einen komplexen Biofilm innerhalb der Fissuren. Wenn man die vorliegenden Bilder betrachtet kann man klar erkennen, wie schwierig es ist aussagekräftige Proben zu entnehmen. Mit den vorliegenden Werkzeugen kommt man nicht tief genug in die Fissuren, besonders nicht, wenn die Tiere noch leben.

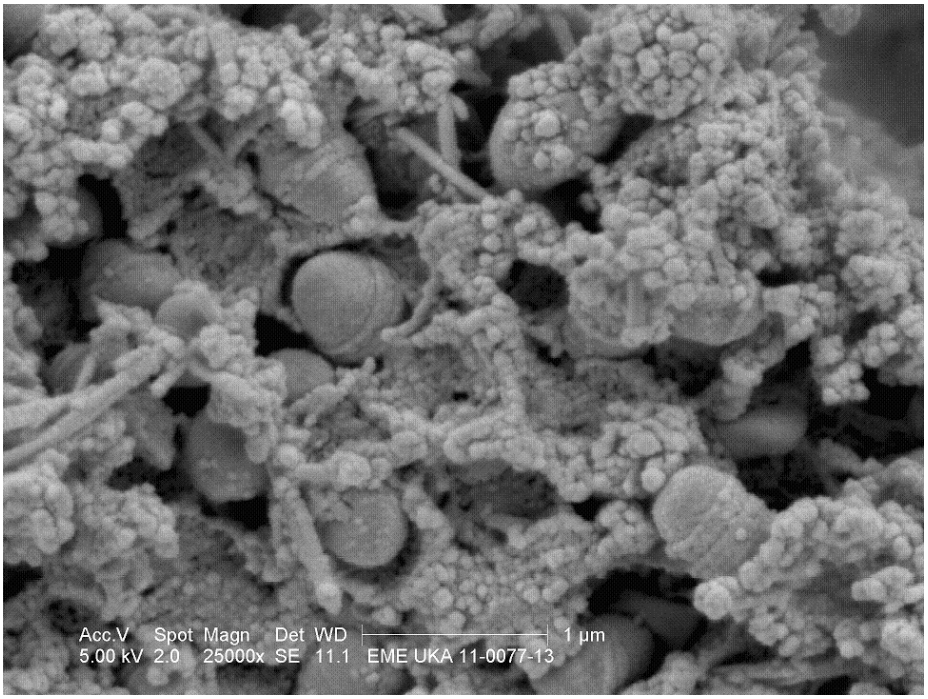


Abbildung 30: REM-Aufnahme der *Streptococcus mutans*-Zellen im Biofilm bei Ratte 10 (25.000fache Vergrößerung)

Mit der 25.000fachen Vergrößerung lassen sich sogar die Zellteilungsebenen der einzelnen Zellen erkennen, die charakteristisch für Streptokokken sind. Die Streptokokken verstoffwechseln die hier erkennbaren Zuckerkristalle extrem gut. Dies ist typisch für die osmotoleranten, acidogenen, acidophilen Streptokokken der Mutans-Gruppe. Bei den kleinen Nanometer-Stäbchenstrukturen handelt es sich nicht um Bakterien sondern wahrscheinlich um Zellulosefasern des gekauten Einstreus. Dieses Bild einer Mutans-Streptokokken-Reinkultur zeigte sich bei Ratte 10 in mehreren Ausschnitten. Die Aufnahmen bestätigen, dass die Kariesaktivität, zumindest bei Ratte 10, eindeutig von *S. mutans* ausging. Da die Kariesaktivität bei allen Tieren ein gleiches Muster zeigte, gehen wir davon aus, dass sie bei allen Tieren hauptsächlich von *S. mutans* verursacht wurde. Negativkontrollen aus Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe die nicht mit *S. mutans* inokuliert wurden bestätigen dies (die Daten dazu sind nicht Teil dieser Doktorarbeit).

3.1.1.6. Ergebnis der EDX-Analyse

Mit Hilfe der EDX-Analyse sollte der Fremdkörper in der rechten Fissur des Zahns untersucht werden. Dadurch sollte bestätigt werden, ob es sich bei dem Fremdkörper um ein Futter- (60% Saccharose) / Streugemisch handelt.

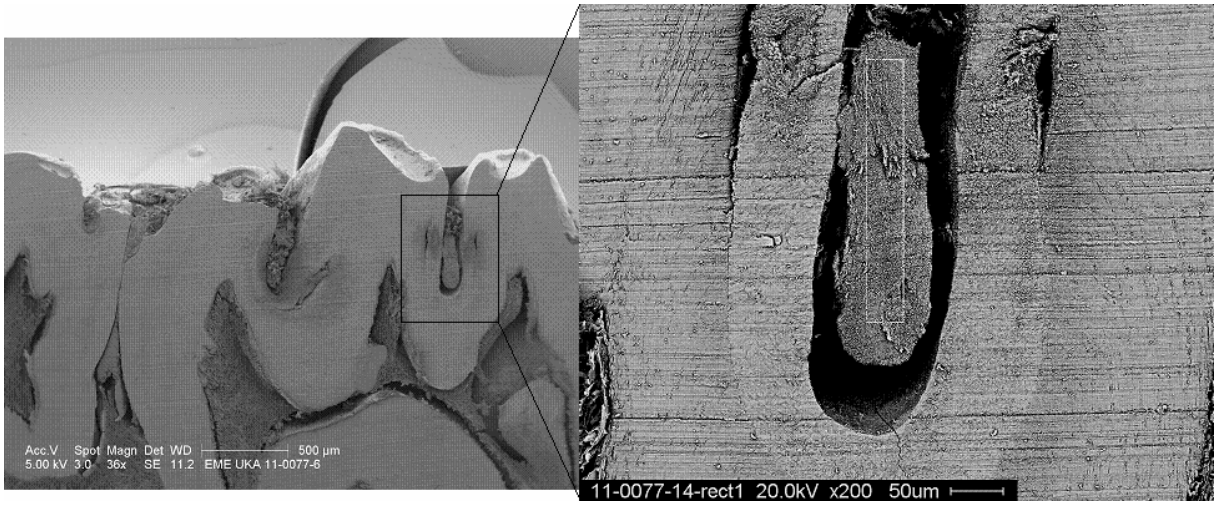


Abbildung 31: Untersuchter Zahn der Ratte 10 im REM-Bild mit Markierung des Fremdkörpers (links), vergrößerte Darstellung des Fremdkörpers und markierter Bereich der EDX-Analyse (rechts, weiß umrandet)

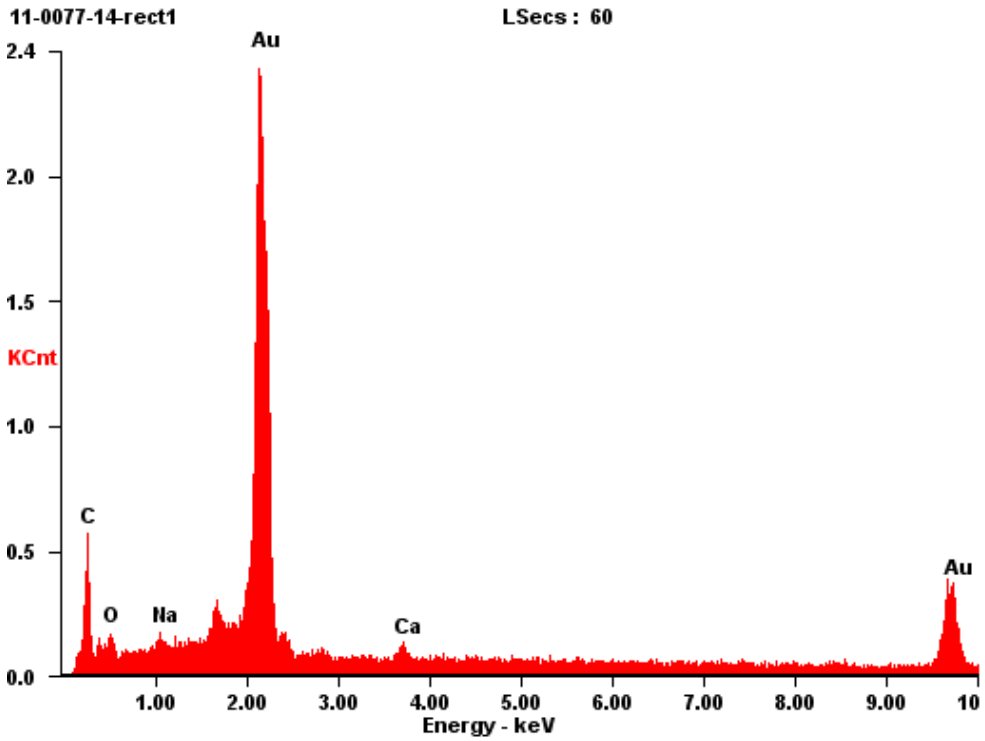


Abbildung 32: Ergebnisdiagramm der EDX-Analyse des Fremdkörpers aus der Fissur bei Ratte 10

Wie man im Ergebnisdiagramm der EDX-Analyse erkennen kann besteht der Fremdkörper aus einem hohen Anteil Kohlenstoff (C), und geringeren Anteilen

Sauerstoff (O), Natrium (Na) und Calcium (Ca). Eine eindeutige Identifizierung des Fremdkörpers ist schwierig, aber insgesamt mit einem Zucker-Streugemisch vereinbar. Der hohe Ausschlag bei Gold (Au) kommt von der routinemäßig aufgetragenen Goldbeschichtung vor der REM-Aufnahme.

3.1.2. Ergebnisse Tierversuch 2 – Carolacton als Additiv im Trinkwasser

Der zweite Tierversuch basiert auf den Ergebnissen des ersten Versuchs. Da im ersten Versuch keine sichtbare Reduktion der Keimzahlen und der kariogenen Läsionen erreicht werden konnte, wurde die Applikationsart der Wirkstoffe verändert. Im zweiten Tierversuch wurden die Wirkstoffe als Zusatz ins Trinkwasser gegeben sowie als (tägliche) Maulspülung den Tieren verabreicht. Diese Behandlung sollte eine kontinuierliche Supplementation mit den Wirkstoffen während des gesamten Versuchs gewährleisten. Neben Carolacton diente Fluorid als Kontrolle, dessen kariesinhibierende Wirkung schon seit langem bekannt ist. Zusätzlich wurde die Anzahl der Tiere von 36 auf 45 erhöht. Auch der zweite Versuch wurde verblindet durchgeführt. Es wurden zwei Lösungen mit den Bezeichnungen Carolacton A und Carolacton B bereitgestellt, diese Bezeichnungen wurden für die Dauer des Versuchs beibehalten. Die Placebogruppe enthielt anstelle des Wirkstoffs Wasser.

3.1.2.1. Kontrolle zur Reduktion der Keimzahl

Die nachfolgende Abbildung zeigt beispielhaft die Ergebnisse vor und nach der initialen Antibiotikabehandlung (Chlorhexidin und Amoxicillin-Clavulansäure) während des zweiten Rattenversuchs. Die Reduktion der Keimzahl wurde stichprobenhaft pro Gruppe bei einem Tier überprüft. In diesem Fall wurden Ratte 10 (Fluoridgruppe), Ratte 25 (Carolacton A Gruppe) und Ratte 40 (Carolacton B Gruppe) ausgewählt. Wie man an Hand der Abbildung 33 erkennen kann, lag bei Ratte 10 nach der Behandlung eine deutliche Reduktion der Keimflora vor. Auch bei den anderen Tieren wurde durch die antiinfektive Behandlung eine deutlich sichtbare Reduktion der Keimzahl im Mund erreicht (nicht abgebildet). In allen Fällen war eine Keimreduktion um mindestens zwei bis drei Zehnerpotenzen erreicht worden.

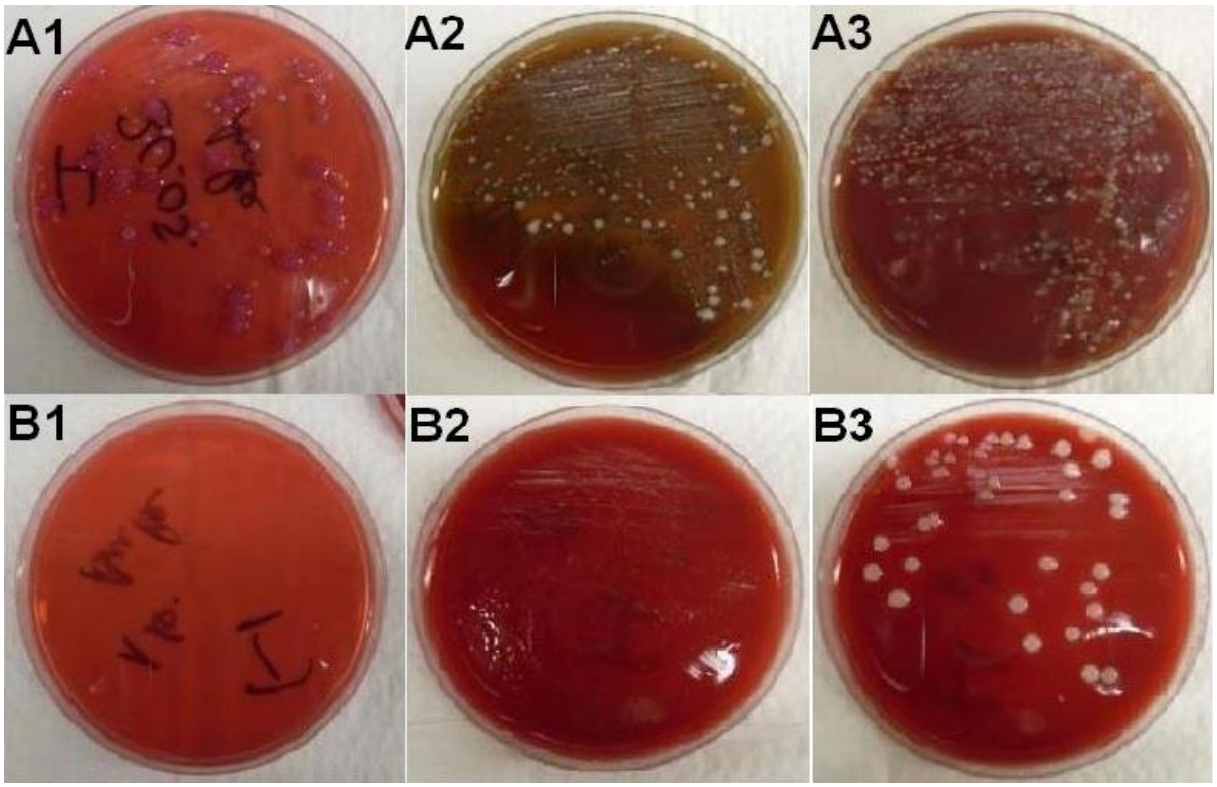


Abbildung 33: Beispielhafte Übersicht über die antiinfektive Behandlung von Ratte 10, A = Abstrich vor Behandlung, B = Abstrich nach Behandlung (1 = MacConkey-Agar, 2 = Blutagar mit Colistin und Nalixinsäure, 3 = Blutagar universell)

3.1.2.2. Gewichtsentwicklung der Tiere im 2. Versuch (2011)

Die Tiere wurden zu Beginn des Versuchs sowie am Ende gewogen. Dadurch sollte eine Beeinträchtigung im Ess- und Trinkverhalten der Tiere durch die verwendeten Zusatzstoffe überwacht werden. Eine verminderte Nahrungsaufnahme würde ein geringeres Körpergewicht zur Folge haben. Wie man anhand des Diagramms erkennen kann, ist die Gewichtsentwicklung der Tiere innerhalb der drei verschiedenen Gruppen sehr homogen. Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Gewichtsentwicklung pro Käfig (mit jeweils fünf Tieren) und Gruppe. Es treten keine großen Schwankungen oder Abweichungen auf, die auf eine Beeinträchtigung der Wirkstoffe auf den Stoffwechsel der Tiere oder das Fressverhalten hindeuten. Das leichteste Tier war zu Beginn des Versuchs 55g schwer und die beiden schwersten Tiere 72g. Am Ende des Versuchs war das leichteste Tier 199g schwer und das Schwerste 266g. Die geringen Unterschiede können durch das unterschiedliche Alter der Tiere bei Versuchsbeginn bedingt sein.

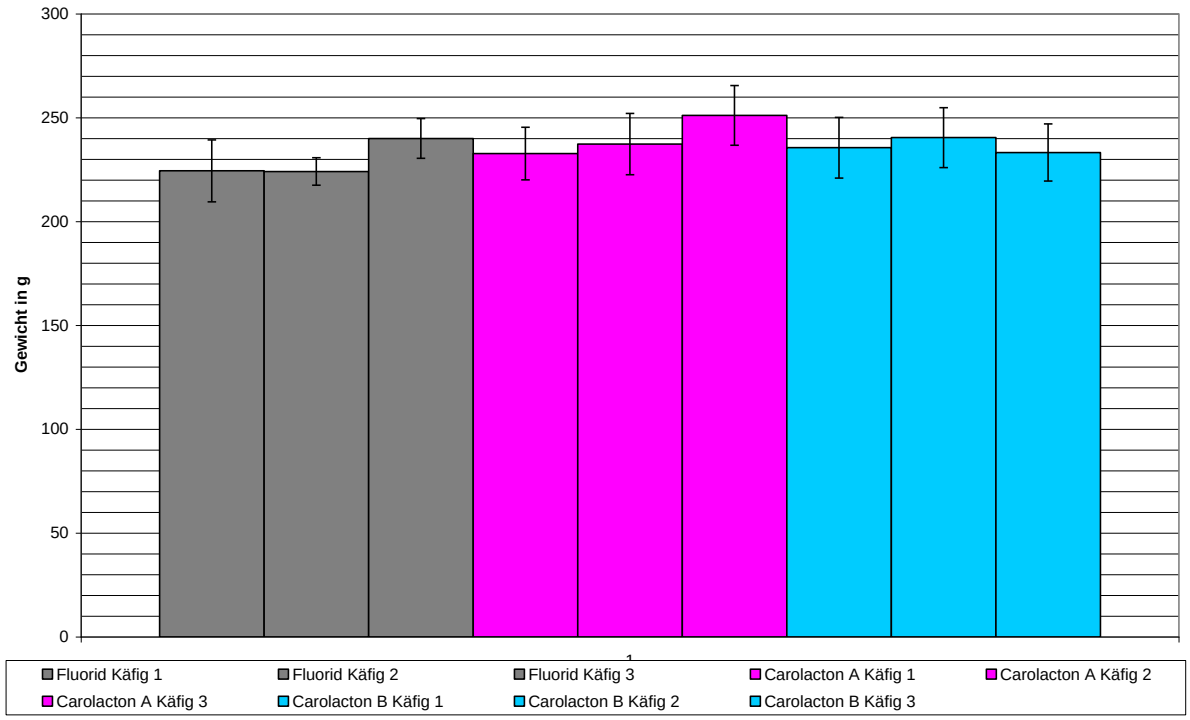


Abbildung 34: Übersicht über das durchschnittliche Gewicht der Ratten pro Käfig und Gruppe bei Versuchsende (Fluoridgruppe = dunkelgrau, Carolacton A Gruppe = pink, Carolacton B Gruppe = blau, mit Standardabweichung)

3.1.2.3. Bestimmung der Zellzahl der *S. mutans* Zellsuspensionen

Für die Zellzahlbestimmung mittels quantitativer PCR wurden die Referenzwerte aus dem ersten Versuch übernommen.

3.1.2.4. Molekulargenetische Auswertung des zweiten Tierversuchs

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Abstriche, die zur Kontrolle der *S. mutans* Population gemacht wurden. Insgesamt wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten Abstriche entnommen. Die ersten Abstriche wurden am 06. Juni 2011 entnommen und dienten als Kontrolle ob die Ansiedlung mit *S. mutans* erfolgreich war. Der zweite Abstrich lag in der Mitte des Versuchs und wurde am 22. Juni 2011 durchgeführt. Nach der Finalisierung der Ratten am 6. Juli 2011 wurde ein letzter Abstrich entnommen, um die Zellzahlen am Ende des Versuchs zu bestimmen. Alle Ergebnisse der qPCRs sowie die daraus resultierenden Zellzahlen befinden sich im Anhang (Punkt 7.6.1.).

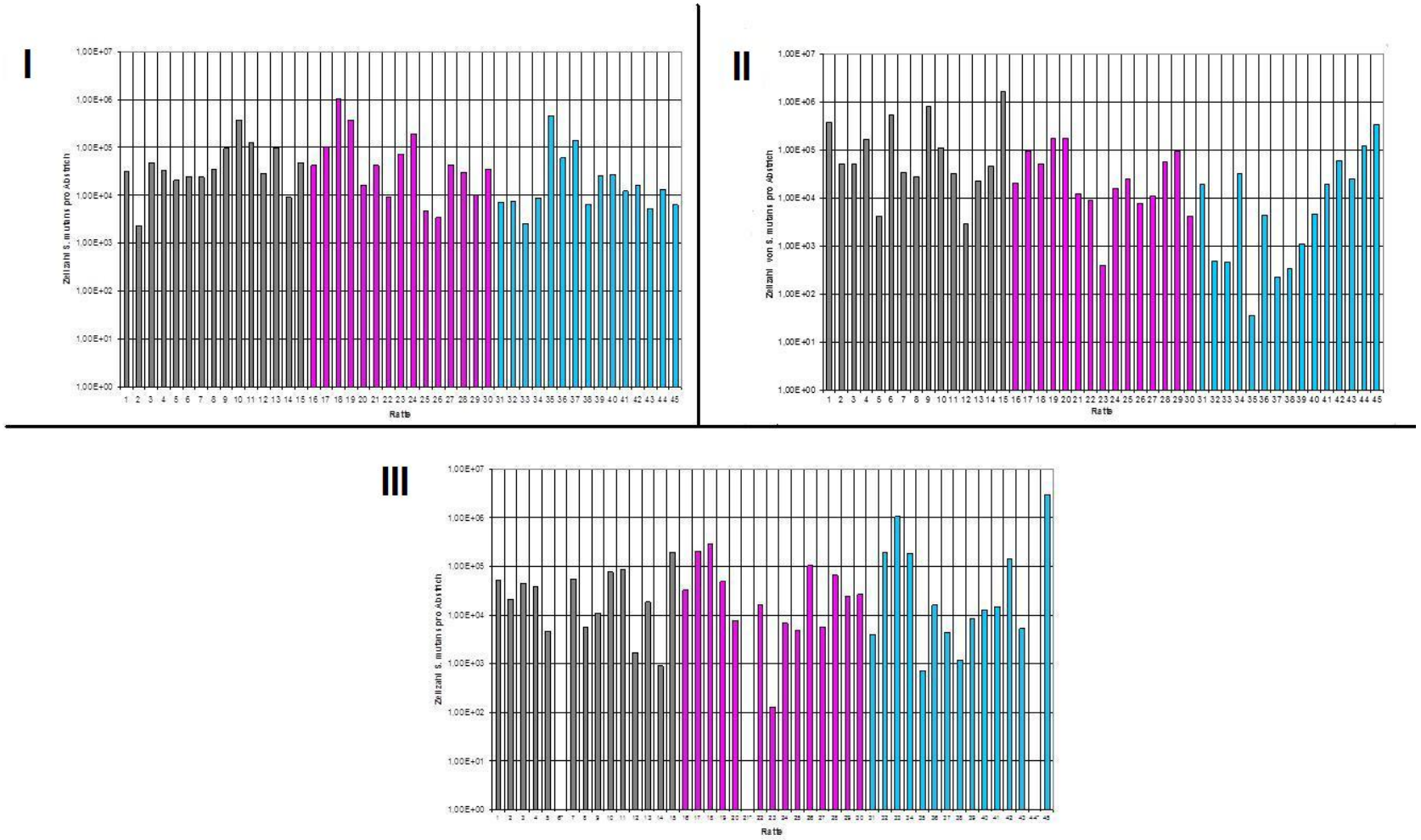


Abbildung 35: Zellzahlen von *S. mutans* pro Abstrich und Ratte (1-45) zu verschiedenen Zeitpunkten (I = erster Abstrich inkl. Kontrollabstrich von Ratte 10, II = zweiter Abstrich, III = finaler Abstrich, logarithmische Auftragung; Fluoridgruppe = dunkelgrau, Carolacton A Gruppe = pink, Carolacton B Gruppe = blau). Jeweils ein Tier pro Versuchsgruppe (Nr. 6, 21, 44) wurde vor dem letzten Abstrich eingeschläfert, um den besten Zeitpunkt der Kariesentwicklung abschätzen zu können.

3.1.2.4.1. Erster Abstrich - Überprüfung auf erfolgreiche Ansiedlung

Fünf Tage nach Inokulation mit *S. mutans* wurden von allen Ratten Abstriche entnommen, um zu kontrollieren ob und in welchem Ausmaß sich der Erreger in der Mundflora angesiedelt hat. Die Ergebnisse waren in allen drei Gruppen heterogen. Die Zellzahlen der Fluoridgruppe schwankten zwischen $2{,}34x10^3$ und $1{,}27x10^5$ Zellen (MW $6{,}70x10^4$, SE $2{,}40x10^4$). Die Zellzahlen der Carolacton A Gruppen lagen zwischen $3{,}44x10^3$ und $1{,}00x10^6$ (MW $1{,}32x10^5$, SE $6{,}72x10^4$). Während die Zellzahlen bei der Carolacton B Gruppe zwischen $2{,}60x10^3$ und $4{,}45x10^5$ lagen (MW $5{,}29x10^4$, SE $3{,}01x10^4$). Auf Grund der Erfahrung aus dem ersten Versuch konnte man allerdings davon ausgehen, dass die gemessenen Zellzahlen ausreichten, um eine Besiedlung mit *S. mutans* zu gewährleisten. Nur bei Ratte 10 war diesmal eine Wiederholung des Abstriches notwendig, dieser wies in der Wiederholung $3{,}78x10^5$ Zellen auf und bestätigte somit die erfolgreiche Inokulation.

3.1.2.4.2. Zweiter Abstrich

Auch im zweiten Abstrich schwankten die Werte innerhalb der einzelnen Gruppen erneut stark, sodass keine Tendenz erkennbar war. Im Vergleich zum ersten Abstrich erkannte man allerdings in der Carolacton B Gruppe eine Verringerung der Keimzahlen bei vielen Tieren (MW $4{,}34x10^4$, SE $2{,}29x10^4$). Während die Fluoridgruppe einen MW von $2{,}67x10^5$ (SE $1{,}14x10^5$) und die Carolacton A Gruppe einen MW von $5{,}16x10^4$ (SE $1{,}52x10^4$) aufwiesen. Insgesamt ist die Verteilung der Zellzahlen in allen Gruppen nicht homogen.

3.1.2.4.3. Dritter Abstrich – Bestimmung der Zellzahl am Versuchsende

Beim letzten Abstrich schwankten die Zellzahlen erneut stark und es war weiterhin kein Trend erkennbar. Für die Ratten 6, 21 und 44 lagen keine Zellzahlen vor, da diese Tiere bereits einige Tage früher eingeschläfert wurden um den optimalen Zeitpunkt für den Versuchsabbruch festzulegen. Auch im letzten Abstrich wies die Carolacton Gruppe B den höchsten Mittelwert auf (MW $3{,}31x10^5$, SE $2{,}02x10^5$), während die Fluoridgruppe mit einem MW von $4{,}36x10^4$ (SE $1{,}28x10^4$) und die Carolacton A Gruppe mit einem MW von $5{,}95x10^4$ (SE $2{,}14x10^4$) niedrigere Werte zeigten.

3.1.2.4.4. Ergebnisübersicht aller Abstriche

Auch hier werden alle Ergebnisse nochmal über den gesamten Verlauf des Versuchs (für jedes Tier einzeln) betrachtet, um individuelle Tendenzen besser sichtbar zu machen.

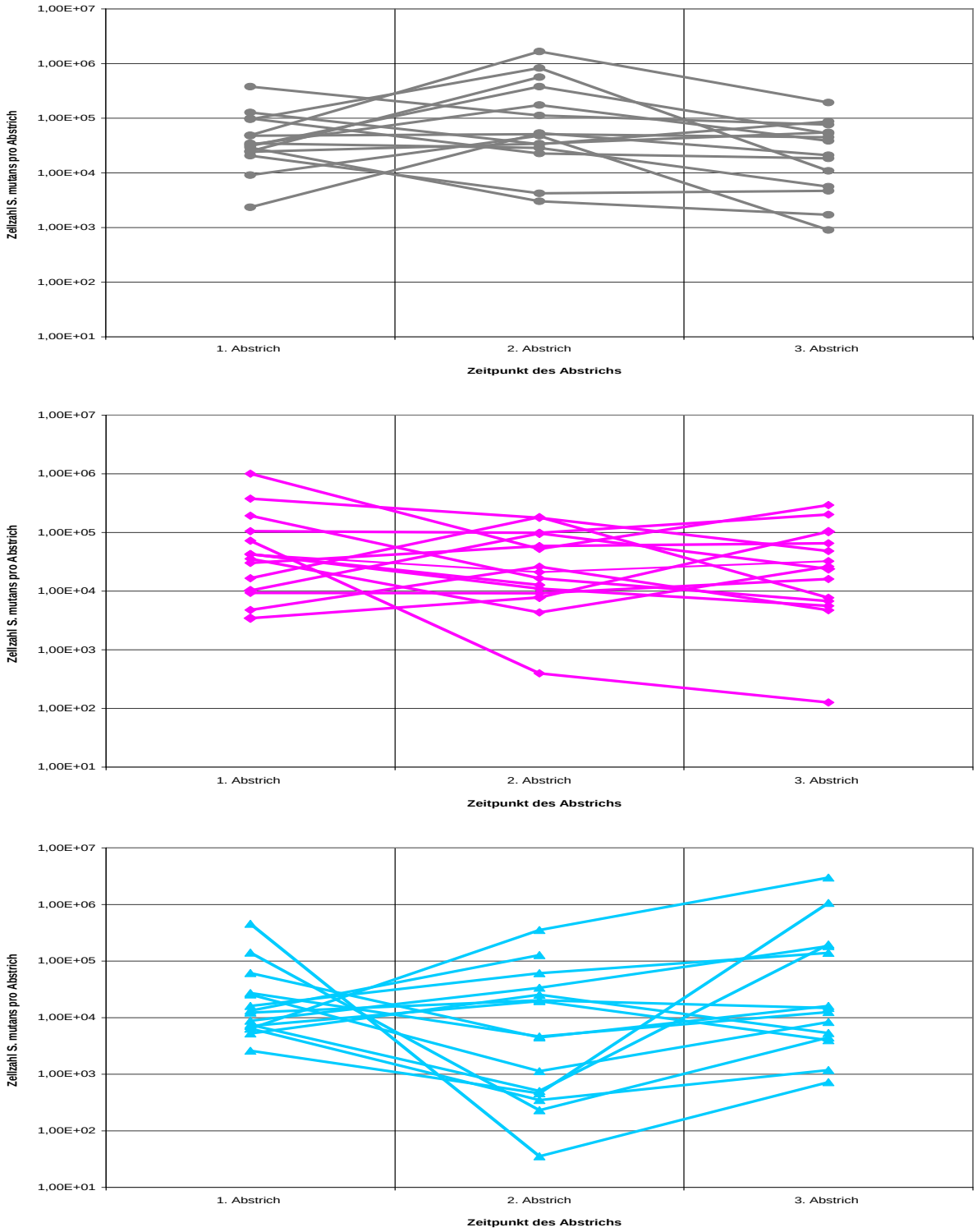


Abbildung 36: Diagramme zur Entwicklung der Zellzahlen pro Abstrich und Tier über den gesamten Versuch (logarithmische Auftragung; Fluoridgruppe = dunkelgrau, Carolacton A = pink, Carolacton B = blau)

In der Fluoridgruppe findet man bei der Hälfte der Tiere einen Anstieg der Zellzahlen zwischen dem ersten und zweiten Abstrich, während man bei der anderen Hälfte einen Abfall erkennen kann. Die Werte der Carolacton A Gruppe streuen, mit Ausnahme eines Ausreißers, am wenigsten. Sie spiegeln allerdings auch keinen eindeutigen Trend wider. Bei der Carolacton B Gruppe sind die Zellzahlen des ersten Abstrichs am homogensten und streuen danach sehr stark. Bei allen Gruppen lässt sich kein sichtbarer Trend in die eine oder andere Richtung erkennen. Betrachtet man nur die Mittelwerte (mit Standardfehler) über den gesamten Versuchsverlauf, so ergibt sich folgendes Bild:

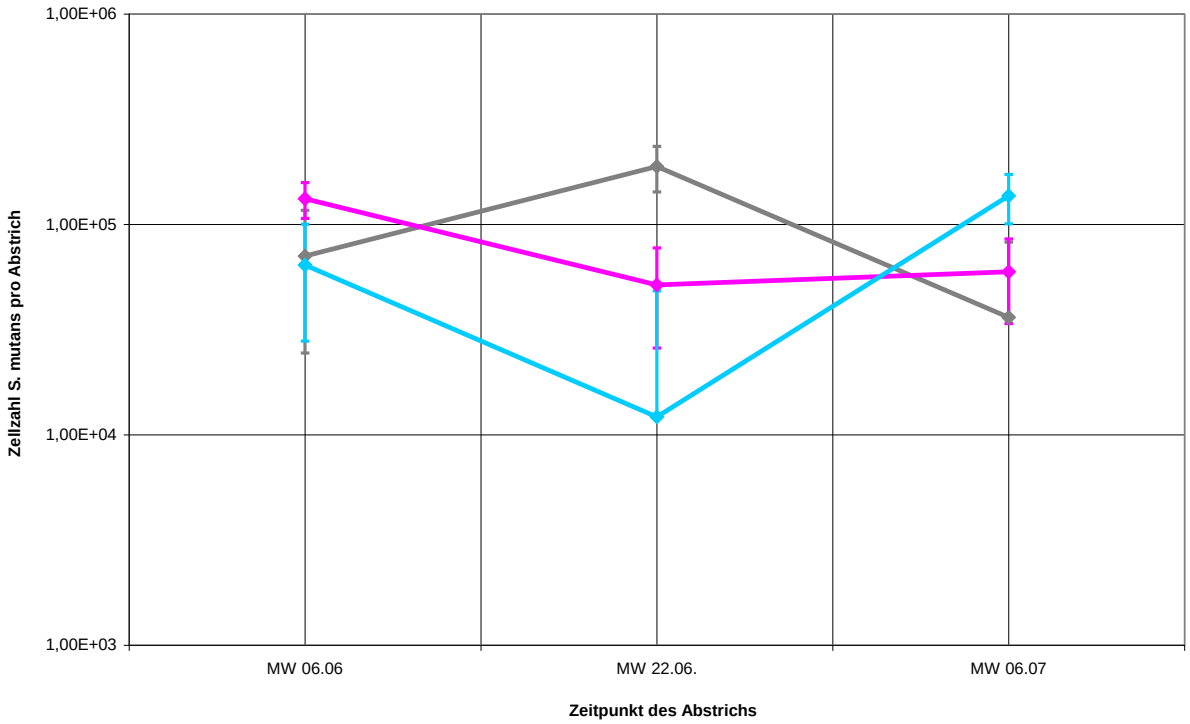


Abbildung 37: Übersicht der Mittelwerte aller drei Abstriche mit Standardfehler (logarithmische Auftragung; Fluoridgruppe = dunkelgrau, Carolacton A = pink, Carolacton B = blau)

In dieser Darstellung kann man erkennen, dass die (durchschnittlichen) Zellzahlen zu Beginn des Versuchs bei der Carolacton A Gruppe am höchsten waren. Die Zellzahlen der Fluoridgruppe und der Carolacton B Gruppe sind zu Beginn fast identisch. Während die Zellzahlen der Fluoridgruppe beim zweiten Abstrich ansteigen, erkennt man bei beiden Carolacton-Gruppen einen Abfall der Zellzahlen. Beim finalen Abstrich hingegen wechselt dieser Trend: die Zellzahlen der Fluoridgruppe fallen ab, während die Zellzahlen der Carolacton A Gruppe leicht und die der Carolacton B Gruppe stark ansteigen.

3.1.2.5. Festlegung des Versuchsendes

Da im ersten Versuch bei Versuchsende die Kariesprogression schon deutlich fortgeschritten war wurden diesmal zu Kontrolle drei Tiere vorzeitig eingeschläfert. Das Ergebnis der Kontrolle zeigte, dass der optimale Zeitpunkt für den Abbruch erreicht worden war, sodass zwei Tage später alle Tiere eingeschläfert wurden.

3.1.2.6. Zahnmedizinische Auswertung des zweiten Tierversuchs

Die Auswertung der Kariesläsionen erfolgte wie im ersten Versuch. Nach dem Einschläfern der Tiere wurden die Kiefer präpariert und aufgearbeitet.

3.1.2.6.1. Plaquefärbung

Ähnlich wie beim ersten Tierversuch war nach der Plaquefärbung bei allen Kiefern eine deutliche Plaqueschicht auf den Zähnen zu erkennen.

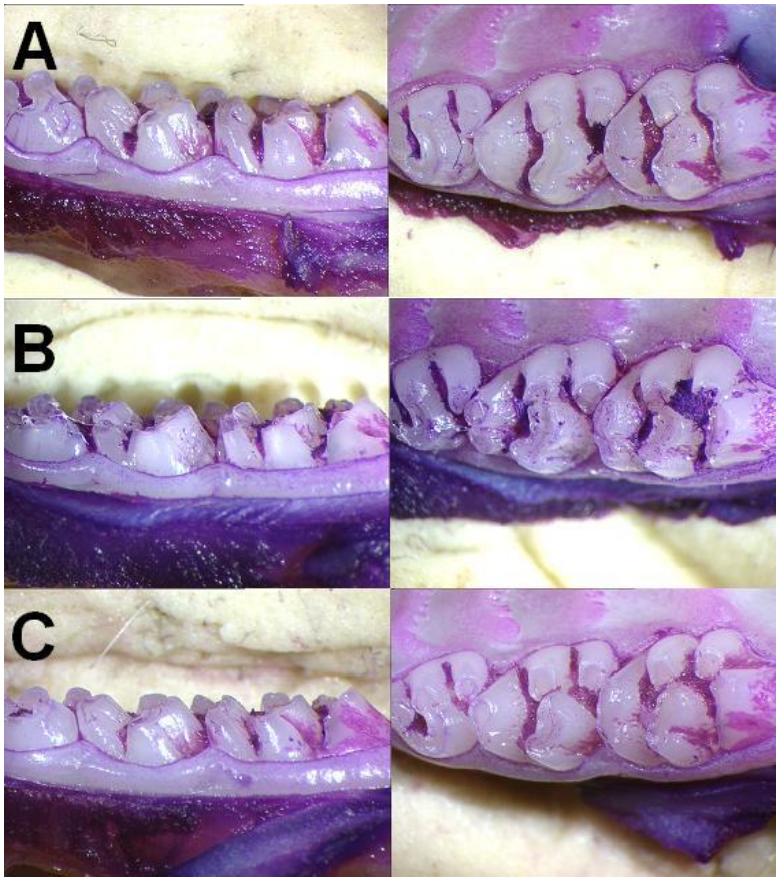


Abbildung 38: Plaquefärbung einer Oberkieferhälfte bukkal (links) und okklusal (rechts), A: Fluoridgruppe (Ratte 15), B: Carolacton A Gruppe (Ratte 22), C: Carolacton B Gruppe (Ratte 45)

Auch hier sind die deutlichsten Schichten vor allem in den tiefen Fissuren und gingival am Übergang zum Zahnfleischrand sichtbar. Die alleinige Analyse der Plaquefärbung zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

3.1.2.6.2. Kariesfärbung und Auswertung

Auch hier erhielt man 4 Kieferhälften, von denen jeweils drei bis vier Schliffe in den unterschiedlichen Ebenen – vor, in und nach der Hauptfissur – angefertigt werden konnten. Insgesamt wurden von allen drei Gruppen je 180 Aufnahmen ausgewertet. Die nachfolgende Abbildung zeigt beispielhaft einen Schliff (von mesial nach distal) pro Gruppe.



Abbildung 39: Kariesfärbung eines Kiefers pro Gruppe in der Aufsicht, A: Fluoridgruppe (Ratte 10), B: Carolacton A Gruppe (Ratte 28), C: Carolacton B Gruppe (Ratte 45)

Auch in diesem Versuch wurden die Schliffe nach der Methode von Keyes (*105*) analysiert. Zusätzlich wurde noch die Methode nach Larson (*106*) sowie ein selbstentwickeltes Verfahren verwendet um die Kariesprogression zu beurteilen. Die Ergebnisse wurden freundlicherweise von Vera Heinz zur Verfügung gestellt und werden in ihrer Arbeit detaillierter analysiert. In dieser Arbeit werden nur die Ergebnisse des Karies-Scoring nach Keyes und nach Larson betrachtet.

Interessanterweise stellt man mit beiden Methoden fest, dass die Fluoridgruppe scheinbar am wenigsten Karies aufweist (siehe Abbildung 40 und 41). Lediglich der Dm-Wert und der Dx-Wert der Carolacton B Gruppe ist nach Larson niedriger bewertet worden als bei der Fluoridgruppe. Während ansonsten die beiden Carolacton-Gruppen jeweils höhere Werte in allen Schweregraden aufweisen. In der Auswertung nach Keyes weist Carolacton B in den Kategorien E und Ds die höchsten Werte auf. Während Carolacton A in der Kategorie Dm den höchsten Wert zeigt. Die Werte in der Dx-Kategorie sind nahezu identisch in beiden Carolacton-Gruppen. Die Bewertung nach Larson hebt hingegen die Dentinkaries (Ds / Dm) und besonders die schwerste Form Dx in der Carolacton A Gruppe hervor.

Folglich scheint der Zusatz von Carolacton zum Trinkwasser in Verbindung mit entsprechenden Mundspülungen keinen deutlichen Einfluss auf die Karies-Inzidenz und –Progression zu haben.

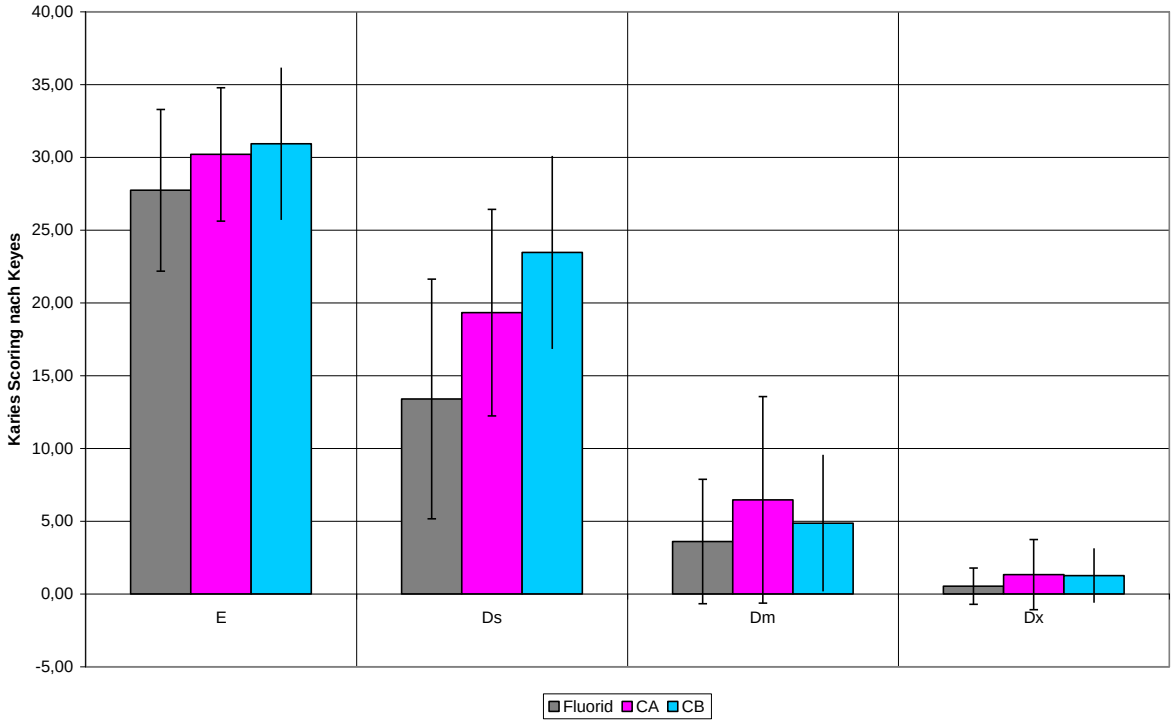


Abbildung 40: Mittelwerte des Karies-Scorings nach Keyes (mit Standardabweichung) der Fluoridgruppe (dunkelgrau), Carolacton A (pink) und Carolacton B (blau) (E = Enamel caries, Ds = Dentin surface caries, Dm = Dentin medium caries, Dx = Dentin deep caries)

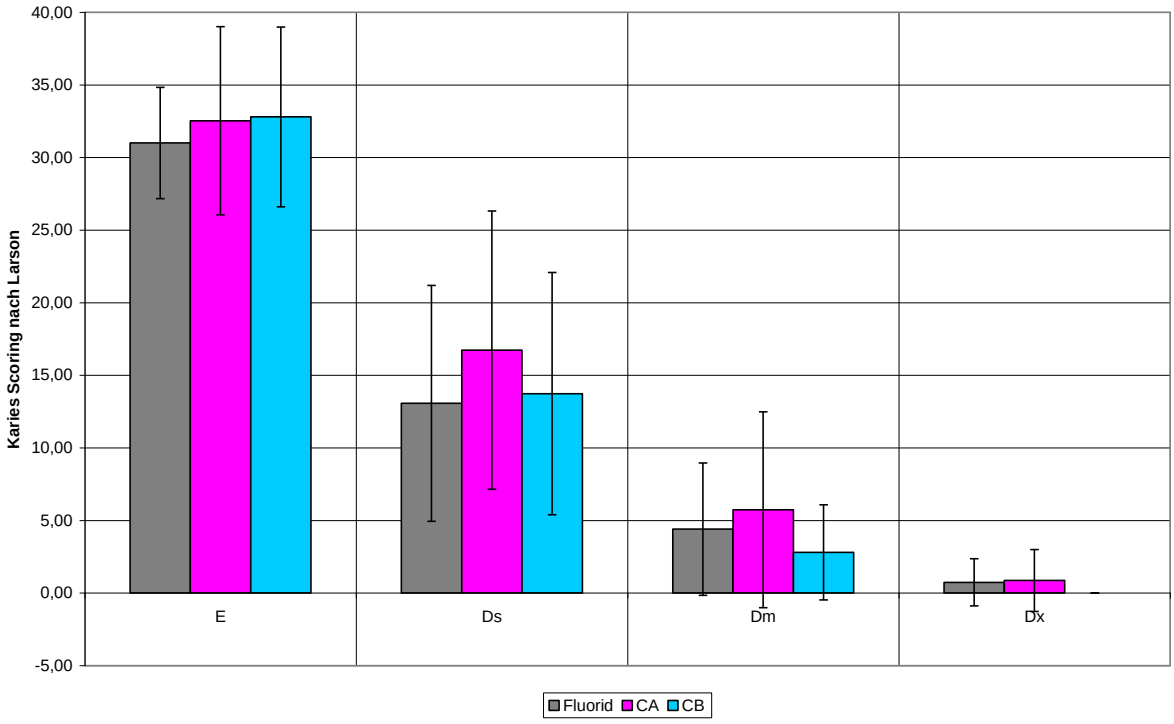


Abbildung 41: Mittelwerte des Karies-Scorings nach Larson (mit Standardabweichung) der Fluoridgruppe (dunkelgrau), Carolacton A (pink) und Carolacton B (blau) (E = Enamel caries, Ds = Dentin surface caries, Dm = Dentin medium caries, Dx = Dentin deep caries)

3.2. *In silico* Serotypisierung von *Streptococcus mutans*

Mit Hilfe bekannter Sequenzdatenbanken und der in Tabelle 66 (siehe Anhang Punkt 7.8.) aufgeführten Primer wurde eine einfache und schnelle *in silico* PCR zur Serotypisierung durchgeführt. So konnte nachgewiesen werden, dass *S. mutans* UA159 den Serotypen c hat. Die neu sequenzierten Stämme *S. mutans* 5DC8, KK21, KK23, AC4446 und ATCC25175 weisen ebenfalls Serotyp c auf. Bei der Darstellung der Sequenzen in GeneDoc kann man erkennen, dass alle Sequenzen identisch sind (siehe Punkt 7.9.1. und Abbildung 42 bzw. 73). Zu Beginn und am Ende des jeweiligen Sequenzabschnittes wurden die Primer rot umrandet. Der forward-Primer SC-F (5' CGGAGTGCTTTTTACAAGTGCTGG 3') lässt sich direkt aus der Sequenz ablesen. Während der reverse-Primer SC-R (5' AACCACGGCCAGCAAACCCTTTAT 3') umgekehrt und komplementär vorliegt, sodass folgende Sequenz abgelesen werden kann: ATAAAGGGTTTGCTGGCCGTGGTT.

Die Gesamtlänge entspricht mit 727 Basen dem potentiellen „PCR-Produkt" und wird am Ende der Anzeige wiedergegeben.

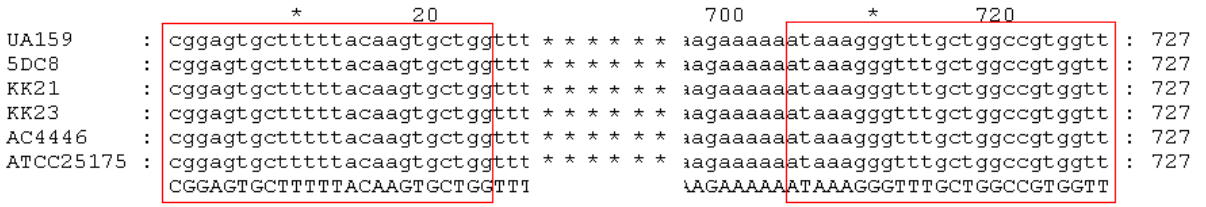


Abbildung 42: Sequenzvergleich der *S. mutans* Stämme UA159, 5DC8, KK21, KK23, AC4446 und ATCC25175 in GeneDoc mit den beiden Primern SC-F und SC-R (rot umrandet), die Sternchen deuten die fehlenden Sequenzbereiche an, der kompletten Sequenzvergleich befindet sich im Anhang unter Punkt 7.9.1.

Der Stamm NCTC11060 weist als Einziger Stamm den Serotyp f auf. Da sich die Primerkombination SF-F / SF-R deutlich von der Lage der Primer sowie der Länge des potentiellen PCR-Produktes von der Primerkombination SC-F / SC-R unterscheidet, wird dieser hier nicht dargestellt, sondern ist im Anhang unter Punkt 7.9.2. aufgeführt.

Das Ergebnis ist in sich stimmig, da Serotyp c der am häufigsten vorkommende Serotyp bei den Mutans-Streptokokken ist, während der Serotyp f nur mit einer sehr geringen Häufigkeit auftritt. Die Bestimmung der Serotypen mit Hilfe dieser Methode funktioniert nicht bei *S. ratti* oder *S. sobrinus*.

3.3. Zwei-Komponenten Signalsysteme

Zwei-Komponenten Signalsysteme (Two-Component Systems, TCS) sind für Bakterien wichtige Sensoren für verschiedene Umweltreize. Außerdem sind sie für die Virulenz des Stammes und damit für die Pathogenität der Spezies wichtig. Mit Hilfe konventioneller PCR und Agarose-Gelelektrophorese wurde der Nachweis der in Tabelle 14 aufgeführten TCS durchgeführt. Der Nachweis der TCS erfolgte in den Stämmen *S. mutans* UA159, *S. ratti*, *S. sobrinus* und partiell in *S. mutans* NCTC11060. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

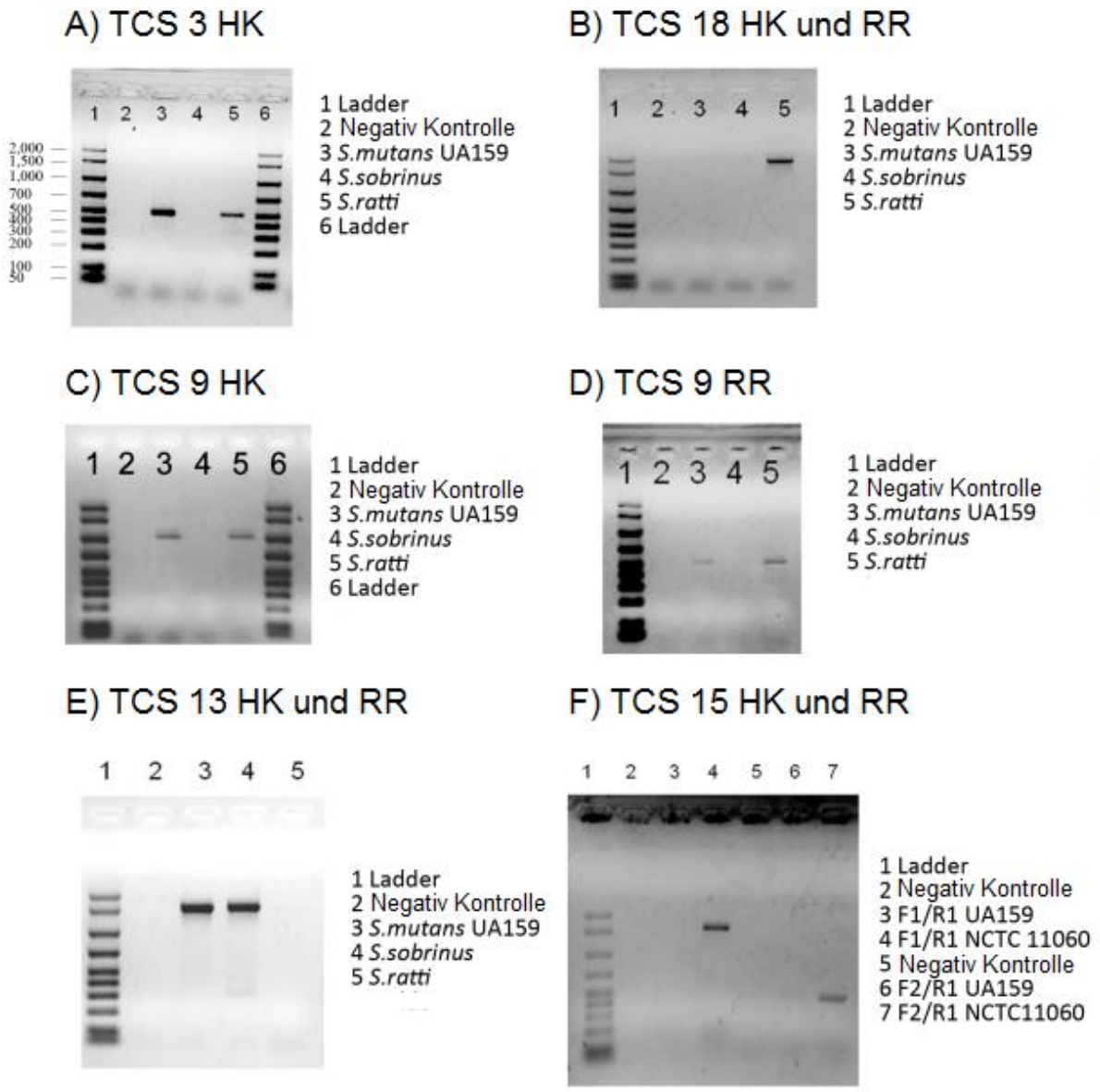


Abbildung 43: Übersicht über die Agarose-Gelbilder der PCR-Amplifikate der verschiedenen Two-Component Systems A bis F (HK = Histidin Kinase, RR = Response Regulator) (*79*)

Tabelle 14: Übersicht über die untersuchten TCS, deren Bedeutung und Vorkommen sowie die verwendeten Primer und das PCR-Temperaturprofil nach unserer gemeinsamen Publikation Song et al., 2012

TCS	TCS Protein	Funktion / Bedeutung	Vorkommen (vorhanden + / nicht vorhanden -)	Primer
3	HK – CovS RR – CovR	Säuretoleranz, Wasserstoffperoxid-Resistenz, „murine macrophage killing“	+ *S. mutans* UA159 + *S. ratti* - *S. sobrinus*	TCS-3 HK P1 TCS-3 HK P2
9	HK – LevS RR – LevR	Biofilmbildung, Säuretoleranz, Fruktanmetabolismus	+ *S. mutans* UA159 + *S. ratti* - *S. sobrinus*	HKP1 (TCS-9 HK-F) HKP2 (TCS-9 HK-R) RRP1 (TCS-9 RR-F) RRP2 (TCS-9 RR-R)
13	HK – ComD RR – ComE	Biofilmbildung, Quorum Sensing, Kompetenzentwicklung, Bacteriocin Produktion	+ *S. mutans* UA159 + *S. sobrinus* - *S. ratti*	TCS-13 P1 TCS-13 P2
15	HK – ComP RR – CmpR	eventuell ein Ortholog zum Quorum Sensing Cluster in *B. subtilis*	+ *S. mutans* NCTC11060 - *S. mutans* UA159	HK-F1 HK-F2 HK-R1
18	HK RR	RNA-Bindung	+ *S. Ratti* - *S. mutans* UA159 - *S. sobrinus*	TCS-18 P1 TCS-18 P2

Die Ergebnisse entsprechen den Erwartungen. Die einzelnen TCS kommen nur in den Spezies respektive Stämmen vor in denen sie auch vermutet wurden, dies ist an Hand der Bandensignale deutlich erkennbar (siehe Abbildung 43 und Tabelle 14) (*79*). Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden alle PCR-Produkte die positive Signale zeigten sequenziert. Die dabei erzielten Sequenzen wurden mit der BioInSys-Datenbank abgeglichen. In allen Fällen stimmten die Sequenzen überein, sodass eine eindeutige Verifizierung der unterschiedlichen TCS gewährleistet werden konnte.

3.4. Toxin-Antitoxin Systeme

Der Nachweis der chromosomalen TA-Systeme erfolgte mittels konventioneller PCR und Agarose-Gelelektrophorese. Bei einem sichtbaren Bandensignal auf richtiger Höhe wurden die entsprechenden PCR-Produkte zur Bestätigung sequenziert. Die vergleichenden Sequenzanalysen wurden mit Hilfe von GeneDoc durchgeführt (siehe auch (*90*)).

3.4.1. Nachweis der chromosomal kodierten TA-Systeme durch PCR

Für den Nachweis der chromosomal kodierten TA-Systeme wurden die Primerkombinationen mazEF-F / mazEF-R, relBE-F / relBE-R und TAS3-F / TAS3-R entwickelt. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen wurde das nachfolgende Programm verwendet.

Tabelle 15: PCR-Programm zum Nachweis der chromosomal kodierten *mazEF*-, *relBE*- und *hicBA*-TA-Systeme in *Streptococcus spp.*

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initialisierung	94°C	2min	1x
Denaturierung	94°C	30s	32x
Annealing	48°C	30s	
Elongation	72°C	90s	
Finale Elongation	72°C	15min	1x
Kühlung	4°C	∞	1x

Die drei chromosomalen TA-Systeme *mazEF*, *hicBA* und *relBE* konnten in den Stämmen *S. mutans* UA159, DC09 und NC101 nachgewiesen werden, was durch ein deutliches Bandensignal erkennbar ist.

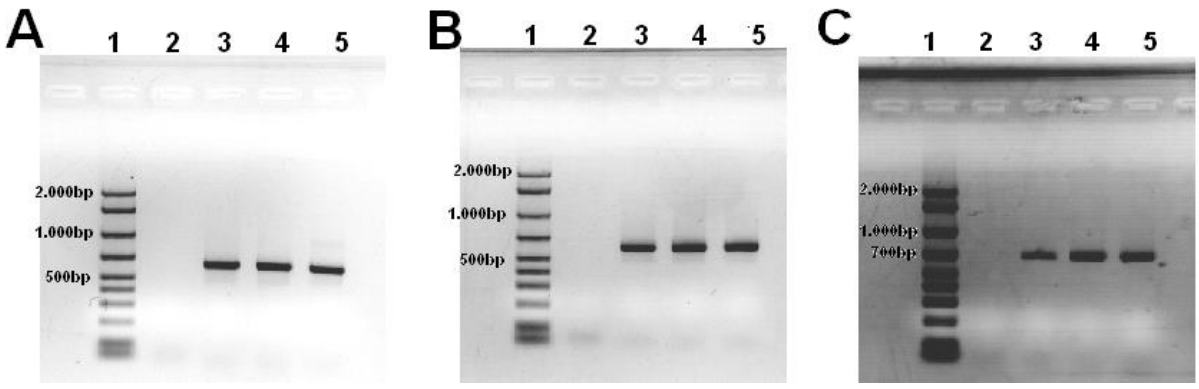


Abbildung 44: Agarosegelbilder der TA-Systeme A = *mazEF* (Amplifikatgröße 640bp), B = *hicBA* (Amplifikatgröße 609bp), C = *relBE* (Amplifikatgröße 703bp, 1 = Ladder, 2 = Negativ Kontrolle, 3 = *S. mutans* UA159, 4 = *S. mutans* DC09, 5 = *S. mutans* NC101)

Die Sequenzen der PCR-Produkte wurden mit der BioInSys-Datenbank (http://134.28.64.65/www/index.php) abgeglichen, sodass eine eindeutige Verifizierung der TA-Systeme möglich war.

3.4.2. Sequenzanalysen der verschiedenen TA-Systeme

Die aus der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des ExPASy Translate tools in die entsprechenden Aminosäuresequenzen umgewandelt. Anschließend wurden die verschiedenen Sequenzen mit Hilfe von GeneDoc miteinander verglichen. Sequenzunterschiede sind in den Abbildungen jeweils dunkel unterlegt.

Der plasmidfreie Stamm UA159 dient bei allen Vergleichen als Referenz. Zusätzlich wurden noch die Sequenzen des ebenfalls plasmidfreien Stammes KK23 verwendet. Dies ist notwendig um Abweichungen zwischen plasmidfreien und den plasmidtragenden Stämmen beurteilen zu können.

3.4.2.1. *mazE* (Antitoxin)

Vergleicht man die Nukleotidsequenzen der vier Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 miteinander erkennt man, dass die Unterschiede zwischen den Stämmen gering sind.

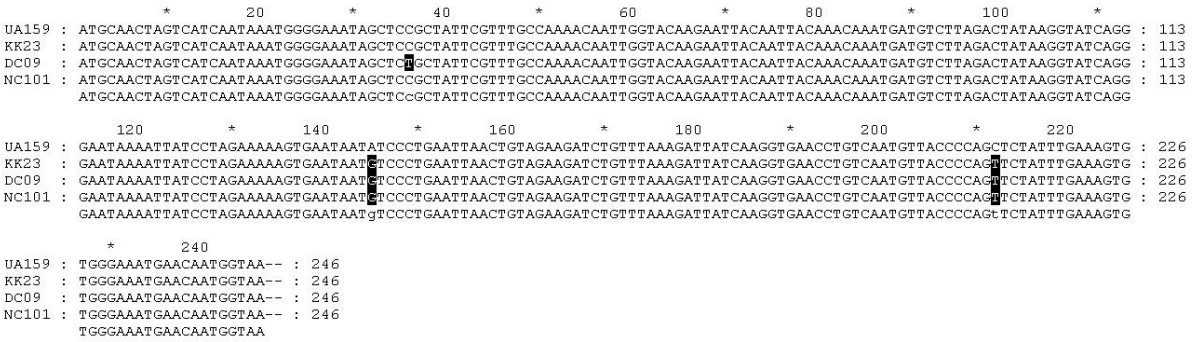


Abbildung 45: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen von *mazE* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101

Zwischen UA159 und den drei anderen Stämmen gibt es zwei (KK23, NC101) bzw. drei (DC09) Sequenzunterschiede. Die Sequenzunterschiede an den Positionen 145 und 212 sind bei allen Stämmen gleich, es handelt sich jeweils um eine Transition (145: Adenin (A) zu Guanin (G); 212: Cytosin (C) zu Thymin (T)). Zusätzlich gibt es beim Stamm DC09 an Position 36 eine weitere Transition von C zu T. Betrachtet man nun die dazugehörigen Aminosäuresequenzen, erkennt man, dass die Transitionen an den Stellen 145 und 212 zu einer veränderten AS-Sequenz im Vergleich zum Stamm UA159 geführt haben. Die Aminosäuren Isoleucin (I) und Alanin (A) wurden in beiden Fällen durch Valin (V) ersetzt.

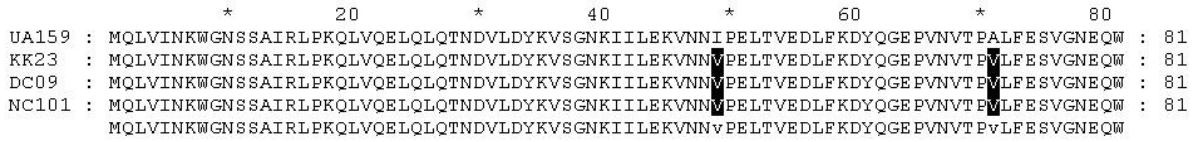


Abbildung 46: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen von *mazE* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 (*109*)

Die Auswirkungen auf die Funktion sind vermutlich geringer Natur, da alle drei AS zur gleichen Gruppe (unpolare, hydrophobe Aminosäuren) gehören und die Strukturunterschiede nur sehr gering sind. Die einzelne Transition bei DC09 zeigt keinerlei Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. Es handelt sich um eine stille Mutation. Die auftretenden Unterschiede in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz sind nicht typisch für die plasmidtragenden Stämme, da sie auch beim plasmidfreien Stamm KK23 vorkommen.

3.4.2.2. *mazF* (Toxin)

Auch beim Toxingen mazF sind die Unterschiede in der Nukleotidsequenz marginal.

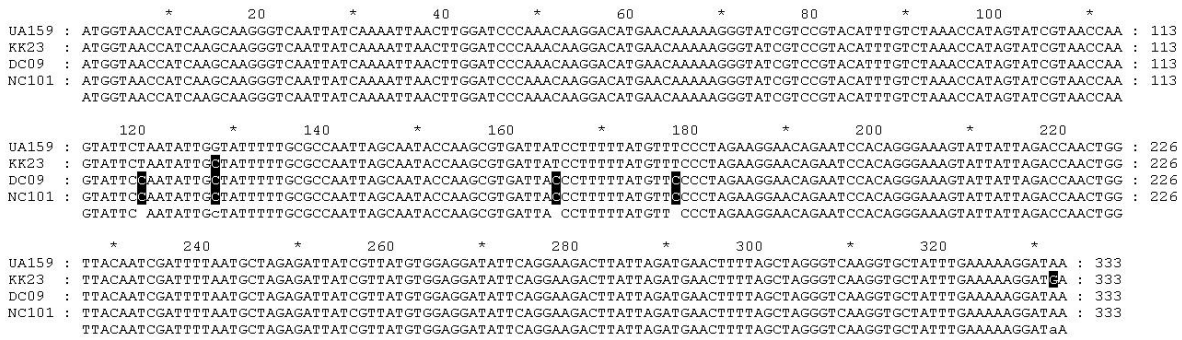


Abbildung 47: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen von *mazF* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101

Der Stamm KK23 unterscheidet sich lediglich in zwei Nukleotiden vom Stamm UA159. An Position 128 erfolgt eine Transversion von G zu C und an Position 332 erfolgt eine Transition von A zu G. Die Stämme DC09 und NC101 weisen insgesamt vier Sequenzunterschiede auf. An den Positionen 120, 165 und 178 findet man jeweils eine Transition von T zu C, während an Position 128 eine Transversion von G zu C stattfindet. Betrachtet man die AS-Sequenz stellt man fest, dass lediglich zwei Mutationen (128 und 178) eine Veränderung in der AS-Sequenz bewirken.

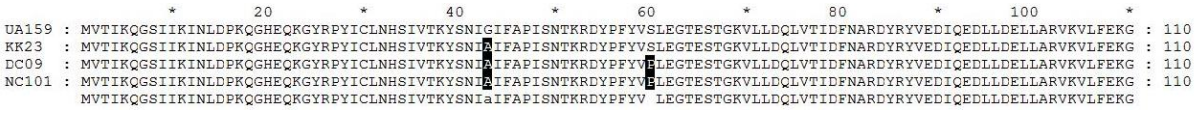


Abbildung 48: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen von *mazF* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 (*109*)

Dabei scheint der Austausch von Glycin (G) zu Alanin plasmidunabhängig zu sein, während der Austausch von Serin (S) nach Prolin (P) möglicherweise plasmidabhängig (bzw. gekoppelt) sein könnte. Bei beiden Substitutionen wurde eine polare, neutrale Aminosäure (G bzw. S) durch eine unpolare, hydrophobe Aminosäure (A bzw. P) ersetzt. Dieser Austausch könnte geringen Einfluss auf die Struktur und Funktion des Toxins haben. Alle anderen Mutationen sind stille Mutationen.

3.4.2.3. *hicB* (Antitoxin)

Beim hicB sind die Unterschiede zwischen den vier Stämmen im Vergleich zum *mazEF*-System größer. Es gibt bis zu 39 Unterschiede zum Referenzstamm UA159. Davon sind 35 Sequenzunterschiede bei allen drei Stämmen gleich, während je zwei

Unterschiede nur bei DC09 (Position 351 und 362, beides Transitionen) bzw. NC101 (Position 10 und 45, Transversion bzw. Transition) vorkommen.

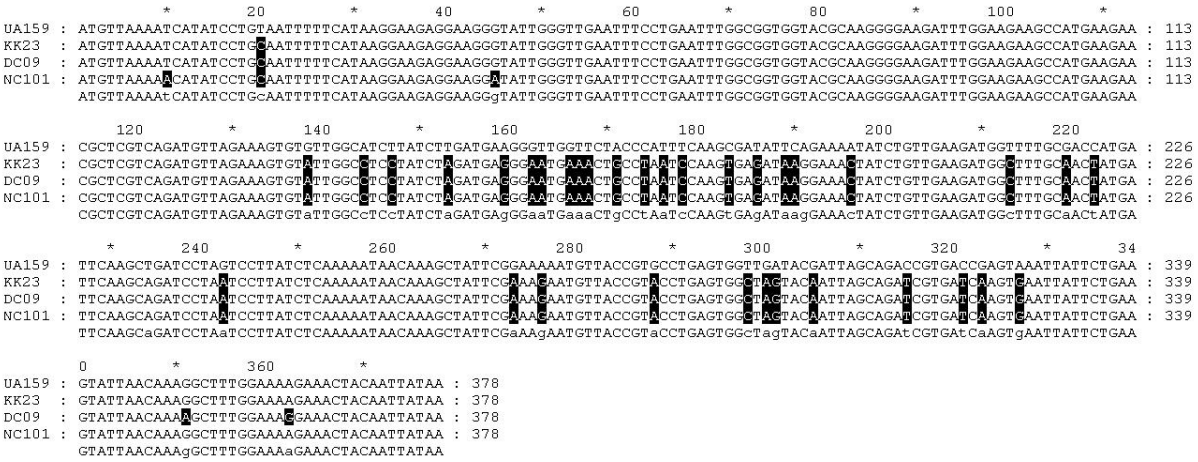


Abbildung 49: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen von *hicB* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23 DC09 und NC101

Betrachtet man nun die dazugehörigen Aminosäuresequenzen, erkennt man, dass es insgesamt 12 gemeinsame Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz gibt. Die Mutationen sind unabhängig vom Plasmidstatus der Wirtszelle.

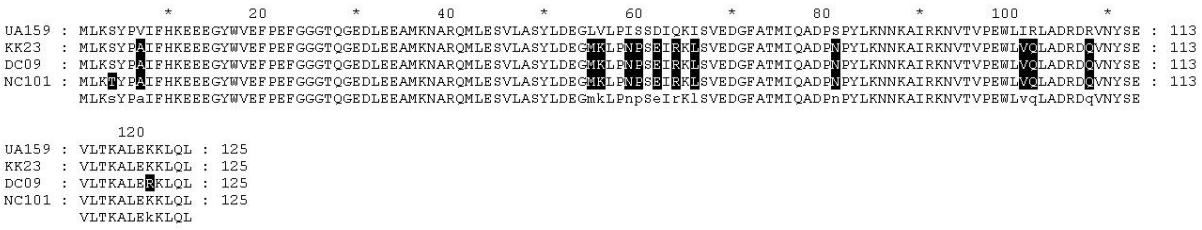


Abbildung 50: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen von *hicB* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 (*109*)

Die spezifischen Mutationen bei DC09 und NC101 bewirken jeweils nur eine Veränderung in der Aminosäure-Sequenz, bei der anderen Mutation handelt es sich um eine stille Mutation ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.

3.4.2.4. *hicA* (Toxin)

Vergleicht man die Nukleotidsequenz der vier Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 erkennt man, dass die Unterschiede zwischen den Stämmen im Vergleich zum *hicB* wesentlich geringer sind. Es gibt drei gemeinsame Transitionen an den Positionen 39, 103 und 123. Und außerdem noch zwei zusätzliche Mutationen bei DC09 an den Positionen 71 (Transition G zu A) und 82 (Transversion C zu G).



Abbildung 51: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen von *hicA* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101

Betrachtet man nun die Aminosäure-Sequenz stellt man fest, dass die Mutationen an den Positionen 39 und 103 zu einem AS-Austausch geführt haben, dabei wurde Lysin (K) durch Arginin (R) ersetzt und Serin durch Prolin.

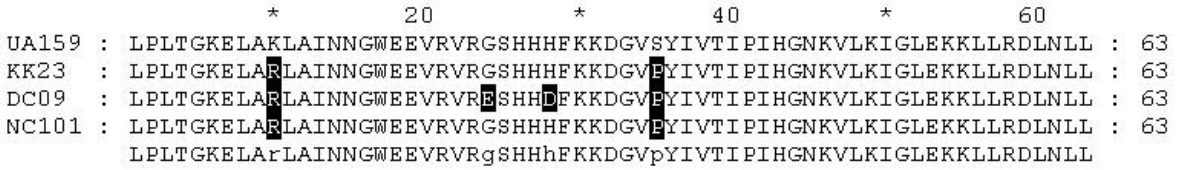


Abbildung 52: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen von *hicA* der Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 von *S. mutans* (*109*)

Beim ersten Austausch wird eine basische Aminosäure durch eine andere ersetzt, sodass dieser Austausch vermutlich keinen Einfluss auf die Proteinstruktur hat. Beim zweiten Austausch wird eine polare, neutrale Aminosäure (S) durch eine unpolare, hydrophobe Aminosäure (P) ersetzt. Dieser Austausch könnte die Proteinstruktur geringfügig beeinflussen. Die zwei einzelnen Mutationen bei DC09 bewirken jeweils eine veränderte Aminosäure-Sequenz. Dabei werden beide Aminosäuren (G und Histidin, H) durch saure Aminosäuren (Glutaminsäure, E und Asparaginsäure, D) ersetzt. Dieser Austausch könnte ebenfalls Einfluss auf die Proteinstruktur haben. Auch hier sind die Alterationen unabhängig vom Plasmidstatus der Wirtszelle. Die Stämme KK23, DC09 und NC101 weisen insgesamt beim *hicBA* System deutlich mehr Sequenzunterschiede auf als beim *mazEF*-System.

3.4.2.5. Chromosomale und plasmidkodierte *relBE*-Systeme

Vergleicht man nun die beiden unterschiedlichen *relBE*-Systeme miteinander, so stellt man folgende Tatsachen fest:

- die chromosomalen *relBE*-Systeme bei UA159, DC09 und NC101 sind fast identisch
- die plasmidkodierten *relBE*-Systeme von pDC09 und pNC101 sind identisch

- beim direkten Vergleich weisen beide *relBE*-Systeme deutliche Sequenzunterschiede auf

Der Stamm KK23 verfügt nicht über das *relBE*-System und konnte deshalb nicht mehr in den Vergleich miteinbezogen werden. Zuerst werden die chromosomal kodierten *relBE*-Systeme miteinander verglichen. Dann folgt der Vergleich der plasmidkodierten *relBE*-Systeme und abschließend der direkte Vergleich beider Systeme. Die Sequenzen des chromosomal kodierten *relB* sind bei den Stämmen UA 159, DC09 und NC101 bis auf fünf Transitionen (Position 21, 45, 48, 63 und 108) identisch.

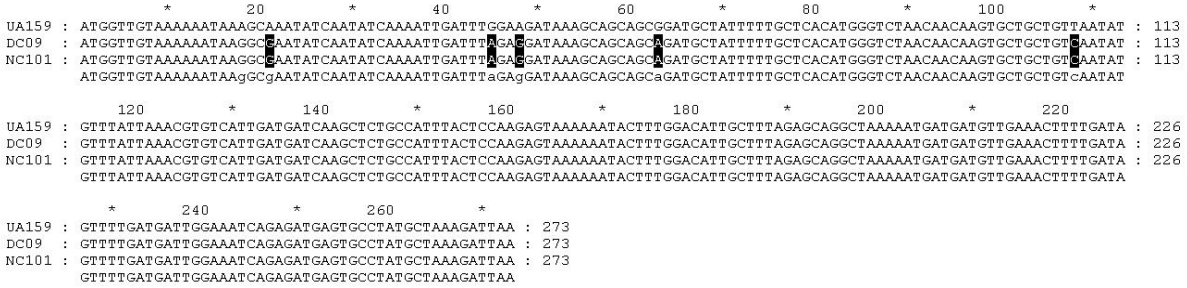


Abbildung 53: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen des chromosomalen *relB* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen stellt man allerdings fest, dass es sich bei allen Mutationen um stille Mutationen handelt.

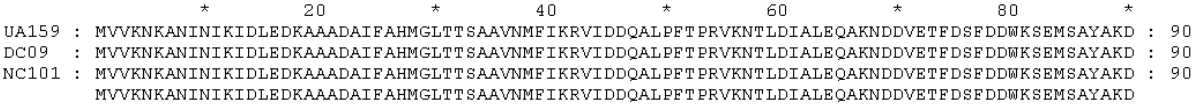


Abbildung 54: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen des chromosomalen *relB* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101

Ein ähnliches Bild zeigt auch der Sequenzvergleich des Toxins *relE*.

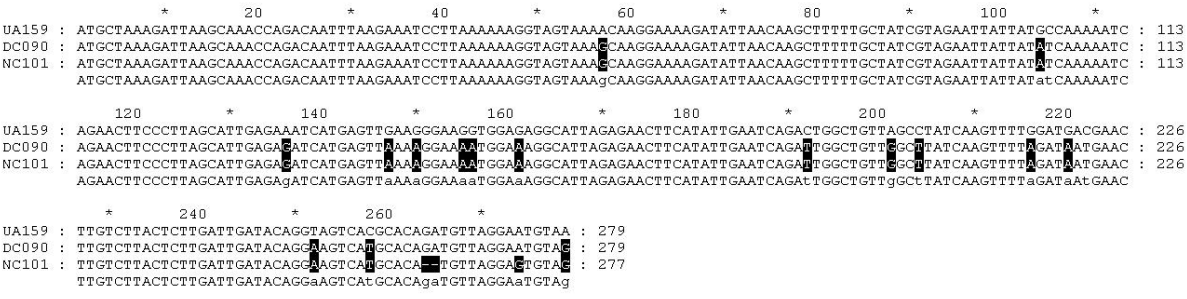


Abbildung 55: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen des chromosomalen *relE* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101

Beim chromosomal kodierten *relE* gibt es 16 Sequenzunterschiede zwischen UA159 und den plasmidtragenden Stämmen DC09 und NC101. Zusätzlich dazu gibt es noch drei Sequenzunterschiede zwischen NC101 und UA159. Diese Unterschiede führen zu fünf gemeinsamen Unterschieden in der Aminosäuresequenz, sowie vier Unterschieden die ausschließlich beim Stamm NC101 auftreten. Bei den gemeinsamen Unterschieden wird dreimal eine Base durch eine Basen mit denselben Eigenschaften ersetzt (Cystein, C, zu Tyrosin, Y, und zweimal Arginin, R zu Lysin, K). Bei den anderen Unterschieden wird einmal Asparagin (N) durch Asparaginsäure (D) ersetzt und einmal genau umgekehrt. Insgesamt haben die Unterschiede aber vermutlich nur einen sehr geringen Einfluss auf die dreidimensionale Struktur.

```
                *        20         *        40         *        60         *        80         *
UA159 : MLKIKQTRQFKKSLKKVVKQGKDINKLFAIVELLCQKSELPLALRNHELKGRWRGIRELHIESDWLLAYQVLDDELVLLLIDTGSHAQMLGM : 92
DC09  : MLKIKQTRQFKKSLKKVVKQGKDINKLFAIVELLYQKSELPLALRDHELKGKWKGIRELHIESDWLLAYQVLDNELVLLLIDTGSHAQMLGM : 92
NC101 : MLKIKQTRQFKKSLKKVVKQGKDINKLFAIVELLYQKSELPLALRDHELKGKWKGIRELHIESDWLLAYQVLDNELVLLLIDTGSHAHVRSV : 92
        MLKIKQTRQFKKSLKKVVKQGKDINKLFAIVELLyQKSELPLALR1HELKG4W4GIRELHIESDWLLAYQVLD1ELVLLLIDTGSHAq6lg6
```

Abbildung 56: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen des chromosomalen *relE* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101

Die beiden Gene des plasmidkodierten TA-Systems der Stämme DC09 und NC101 sind hingegen komplett identisch.

```
                *        20         *        40         *        60         *        80         *       100         *
DC09  : ATGTTGAGGAACAGACAATATAACTTTAGGGTTAATAATGATATGCTTGAACAAGCTAAAGCAGTCTTGGAAGCTCGTAATATTAGCATACCAGATGCTCTAAATTTATTTGT : 113
NC101 : ATGTTGAGGAACAGACAATATAACTTTAGGGTTAATAATGATATGCTTGAACAAGCTAAAGCAGTCTTGGAAGCTCGTAATATTAGCATACCAGATGCTCTAAATTTATTTGT : 113
        ATGTTGAGGAACAGACAATATAACTTTAGGGTTAATAATGATATGCTTGAACAAGCTAAAGCAGTCTTGGAAGCTCGTAATATTAGCATACCAGATGCTCTAAATTTATTTGT

           120         *       140         *       160         *       180         *       200         *       220
DC09  : AGAAACAGTCGTAAAAGAACAAGATTTGCCAATTAAAACAATAGAAGAACGTAGGGCAGAAACATTTTTAGCAGAATTAACGAGTGAACTTGATAAAGGTTATCAAGCTATGT : 226
NC101 : AGAAACAGTCGTAAAAGAACAAGATTTGCCAATTAAAACAATAGAAGAACGTAGGGCAGAAACATTTTTAGCAGAATTAACGAGTGAACTTGATAAAGGTTATCAAGCTATGT : 226
        AGAAACAGTCGTAAAAGAACAAGATTTGCCAATTAAAACAATAGAAGAACGTAGGGCAGAAACATTTTTAGCAGAATTAACGAGTGAACTTGATAAAGGTTATCAAGCTATGT

          *       240         *       260         *
DC09  : TAAGAGGCGAAATGAAGGATGCCGATGAGGTTTTTGCAAAGTATGAATTATAA : 279
NC101 : TAAGAGGCGAAATGAAGGATGCCGATGAGGTTTTTGCAAAGTATGAATTATAA : 279
        TAAGAGGCGAAATGAAGGATGCCGATGAGGTTTTTGCAAAGTATGAATTATAA
```

Abbildung 57: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen des plasmidkodierten *relB* der *S. mutans*-Stämme DC09 und NC101

```
                *        20         *        40         *        60         *        80         *       100         *
DC09  : ATGCCGATGAGGTTTTTGCAAAGTATGAATTATAAAGTGAAATTTACCCAGCCAGCTATTGATGATTTAGATGATATTTATAGTTATTATGAGACTGAACTTTCAAAAACGTC : 113
NC101 : ATGCCGATGAGGTTTTTGCAAAGTATGAATTATAAAGTGAAATTTACCCAGCCAGCTATTGATGATTTAGATGATATTTATAGTTATTATGAGACTGAACTTTCAAAAACGTC : 113
        ATGCCGATGAGGTTTTTGCAAAGTATGAATTATAAAGTGAAATTTACCCAGCCAGCTATTGATGATTTAGATGATATTTATAGTTATTATGAGACTGAACTTTCAAAAACGTC

           120         *       140         *       160         *       180         *       200         *       220
DC09  : TGCCGATAAAGTGATGAAAAGTCTAAGAGAAGCAACTAATTTATTAACTTTTTCACCAGAAGGCGGGATAGATTTCAATAAGAGAATTGGTCAAGAAGTTATTCAAGGACAGT : 226
NC101 : TGCCGATAAAGTGATGAAAAGTCTAAGAGAAGCAACTAATTTATTAACTTTTTCACCAGAAGGCGGGATAGATTTCAATAAGAGAATTGGTCAAGAAGTTATTCAAGGACAGT : 226
        TGCCGATAAAGTGATGAAAAGTCTAAGAGAAGCAACTAATTTATTAACTTTTTCACCAGAAGGCGGGATAGATTTCAATAAGAGAATTGGTCAAGAAGTTATTCAAGGACAGT

          *       240         *       260         *       280         *       300         *       320         *       34
DC09  : CTCTTAGAATGTTTGTAGCTCAGCAATATCTCATATTCTATATTGTAGTTCATTCAGAAGTCCGTATTATGCGAATTATCAGCACTAAAACAAACTATATGAACGAATTGGAA : 339
NC101 : CTCTTAGAATGTTTGTAGCTCAGCAATATCTCATATTCTATATTGTAGTTCATTCAGAAGTCCGTATTATGCGAATTATCAGCACTAAAACAAACTATATGAACGAATTGGAA : 339
        CTCTTAGAATGTTTGTAGCTCAGCAATATCTCATATTCTATATTGTAGTTCATTCAGAAGTCCGTATTATGCGAATTATCAGCACTAAAACAAACTATATGAACGAATTGGAA

        0         *       360
DC09  : AATTTATTTAAGAATTTTAAATAG : 363
NC101 : AATTTATTTAAGAATTTTAAATAG : 363
        AATTTATTTAAGAATTTTAAATAG
```

Abbildung 58: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen des plasmidkodierten *relE* der *S. mutans*-Stämme DC09 und NC101

Vergleicht man nun die chromosomal kodierten *relBE*-Systeme mit dem plasmidkodierten *relBE*-System so zeigt sich folgendes Bild:
Bei beiden Genen werden deutliche Sequenzunterschiede in der Nukleotidsequenz sowie auch in der Aminosäuresequenz sichtbar. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen erkennt man, dass es deutlich mehr Unterschiede als Gemeinsamkeiten gibt.

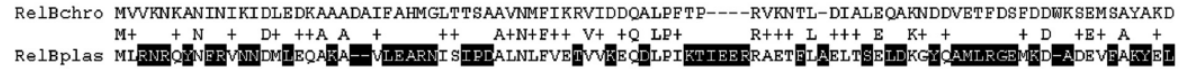


Abbildung 59: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen des chromosomalen und plasmidkodierten *relB* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101 (*109*)

Das plasmidkodierte RelB weist eine komplett andere Aminosäure-Sequenz auf als das chromosomal kodierte RelB. Trotzdem werden beide korrespondierenden Gene bei der BLAST-Suche einer Familie zugeordnet. Ein ähnliches Phänomen findet man bei RelE. Auch hier erkennt man, dass sich die beiden Aminosäure-Sequenzen deutlich voneinander unterscheiden.

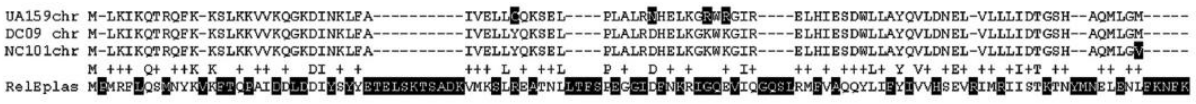


Abbildung 60: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen des chromosomalen und plasmidkodierten *relE* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101 (*109*)

Zusammenfassend kann man sagen, dass die chromosomalen und die plasmidkodierten *relBE*-Systeme einzeln betrachtet zueinander sehr ähnlich sind. Beide Systeme gehören zur Familie der *relBE*-Systeme, weisen aber im direkten Vergleich deutliche Sequenzunterschiede auf (siehe auch (*90*)).
Da in der Literatur allerdings auch ein homologer Aufbau der Proteine als Familienmerkmal genannt wird (*110*) wurde mit den Proteinen eine dreidimensionale Homologieanalyse durchgeführt.

3.4.3. Homologieanalyse des *relBE*-Systems mittels I-Tasser

Die Homologieanalyse mittels I-Tasser ermöglicht eine Vorhersage der Tertiärstruktur („protein prediction“) auf Grund der Aminosäuresequenz. Nach der Analyse erkennt man deutlich die Strukturhomologie bei beiden Proteinen. Das RelE besitzt sowohl chromosomal, als auch plasmidkodiert, drei Helixstrukturen und fünf

Faltblattstrukturen, die sehr ähnlich zu einander angeordnet sind. Nur die Orientierung der rot markierten Helices weichen etwas voneinander ab.

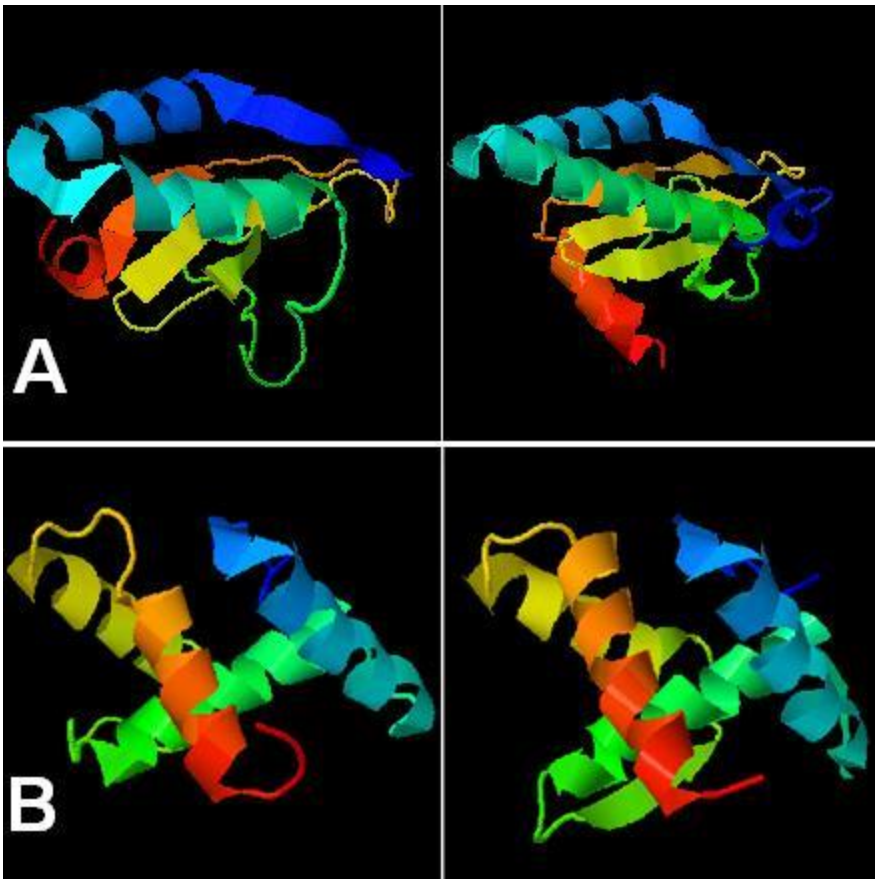


Abbildung 61: Proteinprediction Modelle von A) $RelE_{chromosomal}$ UA159 (links) und $RelE_{plasmid}$ DC09/NC101 (rechts) sowie B) $RelB_{chromosomal}$ UA159 (links) und $RelB_{plasmid}$ DC09/NC101 (rechts)

Beim RelB fallen die Unterschiede noch geringer aus. Beide Proteine weisen vier Helixstrukturen auf, deren Anordnung fast identisch ist. Das plasmidkodierte RelB weist allerdings noch eine einzelne Faltblattstruktur (grün markiert; unterhalb der grünen Helix) auf, die das chromosomale RelB nicht hat. Insgesamt kann man aber durchaus von einer hohen Ähnlichkeit im prinzipiellen Aufbau beider Proteine sprechen, so dass trotz der Unterschiede in der Primärstruktur die Einordnung in gleiche Familien gerechtfertigt erscheint.

3.5. Laktat-Oxidase

Der Nachweis der Laktat-Oxidase in *S. sobrinus* wurde auf zwei Wegen durchgeführt: zum einen durch den direkten Nachweis mittels PCR, zum anderen durch computergestützte Genomanalysen von verschiedenen Stämmen.

3.5.1. Nachweis der Laktat-Oxidase in *S. sobrinus* durch PCR

Um zu überprüfen, ob die Laktat-Oxidase nur in *Streptococcus sobrinus* vorhanden ist, wurden mehrere Streptokokken-Stämme und –Spezies überprüft. Dazu wurde eine konventionelle PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde die Primerkombination Lac-F / Lac-R verwendet. Nach Optimierung wurde das folgende PCR-Programm entwickelt:

Tabelle 16: PCR-Programm zum Nachweis der Laktat-Oxidase in *S. sobrinus*

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initialisierung	94°C	2min	1x
Denaturierung	94°C	30s	32x
Annealing	48°C	30s	
Elongation	72°C	90s	
Finale Elongation	72°C	15min	1x
Kühlung	4°C	∞	1x

Die anschließende Agarose-Gelelektrophorese zeigte folgendes Ergebnis:

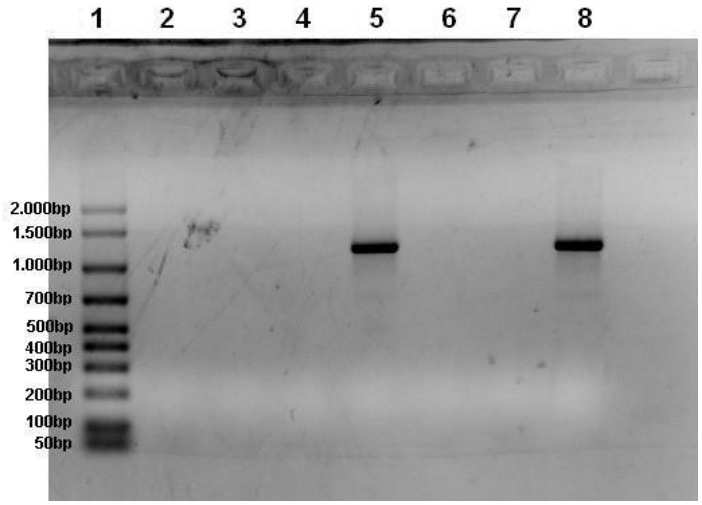


Abbildung 62: PCR-Nachweis des Laktat-Oxidase Gens mit Hilfe der Primerkombination Lac-F / Lac-R (Amplifikatgröße 1175bp, 1 = Ladder, 2 = Negativ Kontrolle, 3 = *S. mutans* NC378, 4 = *S. mutans* KK15/95, 5 = *S. sobrinus* AC153, 6 = *S. macacae* GH395, 7 = *S. gordonii* GH355, 8 = *S. sobrinus* DSM20742)

Das Laktat-Oxidase-Gen ist nur in den *S. sobrinus* Stämmen AC153 und DSM20742 vorhanden. Im Gelbild ist dies an den Banden in Spur 4 und 7 zu erkennen. Zur Kontrollen wurden die PCR-Produkte sequenziert und die

Sequenzierungsergebnisse mit der BioInSys-Datenbank verglichen. Beide Sequenzen stimmten mit den bekannten Genominformationen überein.

3.5.2. Computergestützte Genomanalysen

Die von unserer Projektgruppe erstellte BioInSys-Datenbank, beheimatet an der TU Hamburg-Harburg, stellt eine große Anzahl an Streptokokken-Genomen zur Verfügung. Neben den neu sequenzierten *S. mutans*-Stämmen 5DC8, AC4446, KK21, KK23, ATCC25175 und NCTC11060 stehen einige weitere eng verwandte Spezies zur Verfügung. Mit Hilfe dieser Datenbank und den Daten in Pubmed wurden umfangreiche BLAST-Analysen durchgeführt. Dabei wurde die Anwesenheit der Laktat Oxidase, der Pyruvat Oxidase, des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes (E1 + E2), der Phosphatacetyl-Transferase und der Acetat Kinase genauer untersucht. Alle fünf Enzyme katalysieren wichtige Schritte im Pyruvat-Stoffwechsel (siehe Abbildung 12). Die Analyse zeigte, dass die Pyruvat-Oxidase in allen untersuchten Spezies und Stämmen der Mitis-Gruppe vorhanden ist, während die Pyruvat-Oxidase in der Mutans-, der Suis-, der Bovis- und der Pyogenes-Gruppe gar nicht vorkommt. In der Salivarius- und Anginosus-Gruppe wurde zwar bei einzelnen Spezies eine Pyruvat-Oxidase gefunden, allerdings lagen zu den entsprechenden Spezies keine kompletten Genominformationen vor, sodass kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden konnte. Gleiches gilt für die Suis- und Bovis-Gruppe, da auch dort nur eine sehr geringe Anzahl an Genomen bislang untersucht wurden. Die Laktat-Oxidase wurde neben *S. sobrinus* noch unter anderem bei den Spezies *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. mitis* und *S. oralis* gefunden. Der Pyruvat Dehydrogenase Komplex (E1 + E2), die Phosphatacetyl-Transferase und die Acetat Kinase konnten in allen Stämmen mit kompletten Genomdaten nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der computergestützten Genomanalysen finden sich im Anhang (Punkt 7.11.).

3.6. Entwicklung einer neuen Karies PCR

Ein weiterer Punkt der Arbeit war der Nachweis von *Scardovia wiggsiae* und *Bifidobacterium spp.* durch die Entwicklung einer neuen Karies-PCR. Ziel war es neu Primer zu entwerfen und entsprechende PCR-Programme zu etablieren.

3.6.1. *Scardovia wiggsiae*

Für den spezies-spezifischen Nachweis wurde bereits 2011 von Tanner ein entsprechendes PCR-Protokoll für die qPCR entwickelt (*111*). Das entsprechende qPCR-Programm musste lediglich für die konventionelle PCR angepasst werden.

Tabelle 17: Optimiertes PCR-Programm für den spezies-spezifischen Nachweis von *S. wiggsiae* in der konventionellen PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initialisierung	94°C	2min	1x
Denaturierung	94°C	30s	32x
Annealing	55°C	30s	
Elongation	72°C	90s	
Finale Elongation	72°C	15min	1x
Kühlung	4°C	∞	1x

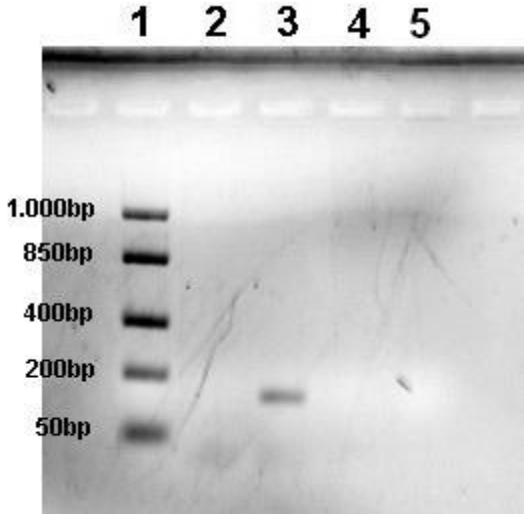


Abbildung 63: PCR-Nachweis der 16S rRNA-Sequenz von *S. wiggsiae* mit Hilfe der Primer Scar448F und Scar619R (Amplifikatgröße 145bp, 1 = Ladder, 2 = Negativ Kontrolle, 3 = *S. wiggsiae*, 4 = *B. dentium*, 5 = *S. mutans* UA159)

Durch die Anpassung des PCR-Programms gelang der spezifische Nachweis von *S. wiggsiae* auch mit Hilfe der konventionellen PCR. Es ist eine klare Bande (Amplifikatgröße 145bp) auf dem Gelbild in Spur 2 zu erkennen. Die anschließende Sequenzierung bestätigt das Ergebnis.

3.6.2. Nachweis der Gattung *Bifidobacterium*

Ähnlich wie *S. wiggsiae* ist auch *B. dentium* in den letzten Jahren in den Fokus potentieller Karieserreger gerückt. Für den Nachweis von *B. dentium* sollte ein spezies-spezifisches PCR-Protokoll entworfen werden. Zusätzlich sollte ein Protokoll für den genus-spezifischen Nachweis der Bifidobakterien entwickelt werden.

3.6.2.1. Genus-spezifische PCR

Um passende Primer zu entwerfen wurden die 16S rRNA Daten aus der RDP-Datenbank verwendet. Zu diesem Zeitpunkt standen 39 Typstämme der Gattung *Bifidobacterium* zur Verfügung. Die 16S RNA-Sequenzen der Bifidobakterien sind sehr heterogen. Um alle Typstämme zu erfassen mussten zwei Primerkombinationen verwendet werden. Dazu wurden ein Forward-Primer und zwei Reverse-Primer entworfen. Der Primer Bifgsp846R1 umfasst den Großteil der Typstämme (30/39, ohne mismatch), während Bifgsp846R2 die restlichen neun Stämme erfasst. Allerdings konnte nur die Kombination Bifgsp628F und Bifgsp846R1 getestet werden, da für den zweiten Primer keine Referenzstämme vorlagen. Die Primer Bifgsp628F und Bifgsp846R1 bilden zusammen ein Produkt mit der Größe von 241 bp. Für die qPCR sowie für die konventionelle PCR wurden folgende Programme optimiert:

Tabelle 18: qPCR Programm für den Nachweis der Gattung *Bifidobacterium*

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	94°C	2min	1x
Amplifizierung	94°C	20s	40x
	68°C	20s	
	72°C	20s	
	72°C	0s	
Schmelzkurve	95°C	0s	1x
	65°C	15s	
	95°C	0s	
Kühlen	4°C	30s	1x → ∞

Tabelle 19: Konventionelles PCR-Programm für den Nachweis der Gattung *Bifidobacterium*

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initialisierung	94°C	2min	1x
Denaturierung	94°C	30s	32x
Annealing	68°C	30s	
Elongation	72°C	90s	
Finale Elongation	72°C	15min	1x
Kühlung	4°C	∞	1x

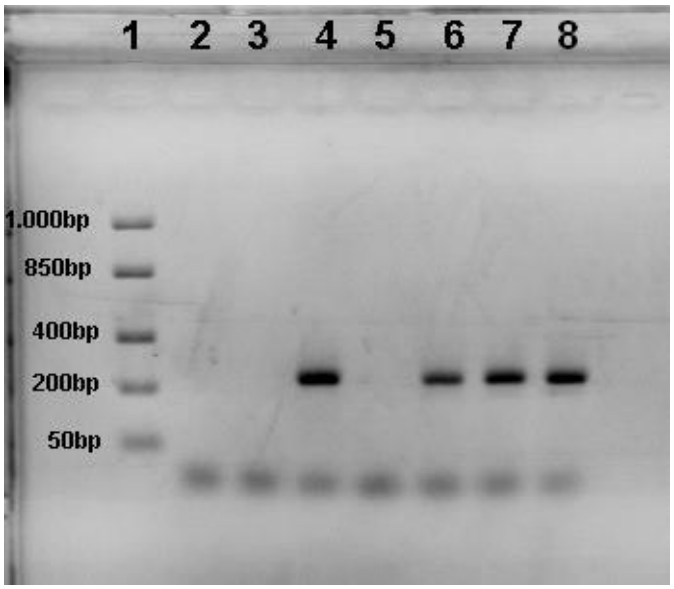


Abbildung 64: PCR-Nachweis der 16S rRNA-Sequenz der Gattung *Bifidobacterium* mit Hilfe der Primer Bifgsp628F und Bifgsp846R (241bp) (1 = Ladder, 2 = Negativ Kontrolle, 3 = *S. wiggsiae*, 4 = *B. dentium*, 5 = *S. mutans* UA159, 6 = *B. bifidum*, 7 = *B. breve*, 8 = *B. adolescentis*)

Wie man erkennen kann, sind die Banden nur bei den verschiedenen Bifidobakterien sichtbar. Bei den nah verwandten Vertretern der Gattung *Scardovia* und bei *S. mutans* sind keine Banden erkennbar. Daher kann man davon ausgehen, dass die Primerkombination für die getesteten Stämme spezifisch ist.

3.6.2.2. Spezies-spezifische PCR

Für den spezies-spezifischen Nachweis von *B. dentium* wurden die Primer Bifdent846F und Bifdent1011R ausgewählt. Beide Primer bilden zusammen ein Produkt mit der Größe von 184bp. Für die qPCR sowie für die konventionelle PCR wurden folgende Programme optimiert:

Tabelle 20: qPCR Programm für den Nachweis von *B. dentium*

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	2min	1x
Amplifizierung	95°C	20s	40x
	62°C	20s	
	72°C	20s	
	72°C	0s	
Schmelzkurve	95°C	0s	1x
	65°C	15s	
	95°C	0s	
Kühlen	4°C	30s	1x → ∞

Tabelle 21: Konventinelles PCR-Programm für den spezies-spezifischen Nachweis von *B. dentium*

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initialisierung	94°C	2min	1x
Denaturierung	94°C	30s	32x
Annealing	60°C	30s	
Elongation	72°C	60s	
Finale Elongation	72°C	15min	1x
Kühlung	4°C	∞	1x

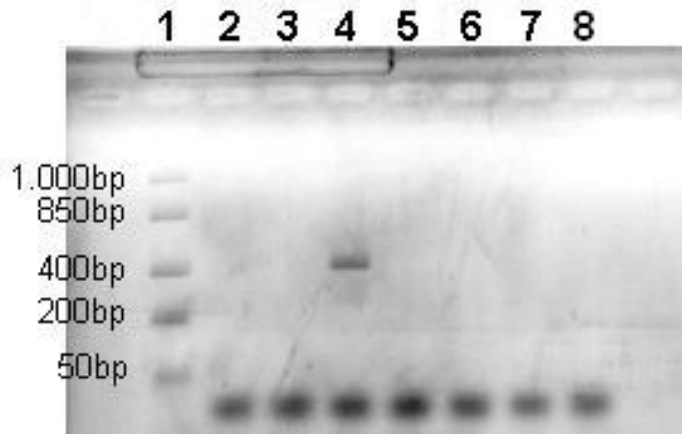


Abbildung 65: PCR-Nachweis der 16S rRNA-Sequenz von *B. dentium* mit Hilfe der Primer Bifdent846F und Bifdent1011R (Amplifikatgröße 184bp) (1 = Ladder, 2 = NC, 3 = *S. wiggsiae*, 4 = *B. dentium*, 5 = *S. mutans* UA159, 6 = *B. bifidum*, 7 = *B. breve*, 8 = *B. adolescentis*)

Wie man an Hand des Gelbildes erkennen kann, sind die Primer sehr spezifisch, da man nur bei *B. dentium* eine Bande mit der richtigen Amplifikatgröße erkennen kann.

3.7. Pilot-Studie zum Nachweis von *S. wiggsiae* und *B. dentium*

Nach der Entwicklung der PCR-Programme zum Nachweis von *S. wiggsiae* und *B. dentium* sollten nun Patientenproben auf die Anwesenheit der Keime getestet werden. Die Identität der Amplifikate wurde durch Spot-Check-Sequenzierung bestätigt. Nach dem Einverständnis der Ethik-Kommission und der Patienten erfolgte die Probenentnahme durch die behandelnden Zahnärzte der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde (ZPP). Nach der DNA-Extraktion wurden mehrere Taxa in den Proben bestimmt: zum Einen die Gesamtzellzahl (Bacteria) um eine Aussage über das Verhältnis der verschiedenen Keime machen zu können, zum Anderen die Zellzahl von *S. mutans* als „Hauptkaries“-Erreger, sowie die Zellzahlen der neuen Erreger *S. wiggsiae* und *B. dentium*. Es wurden insgesamt 10 Kariesproben und zur Kontrolle 10 Proben von gesunden Probanden untersucht. Dabei konnte folgende Verteilung der Zellzahlen beobachtet werden (die absoluten Zellzahlen finden sich im Anhang unter Punkt 7.12.):

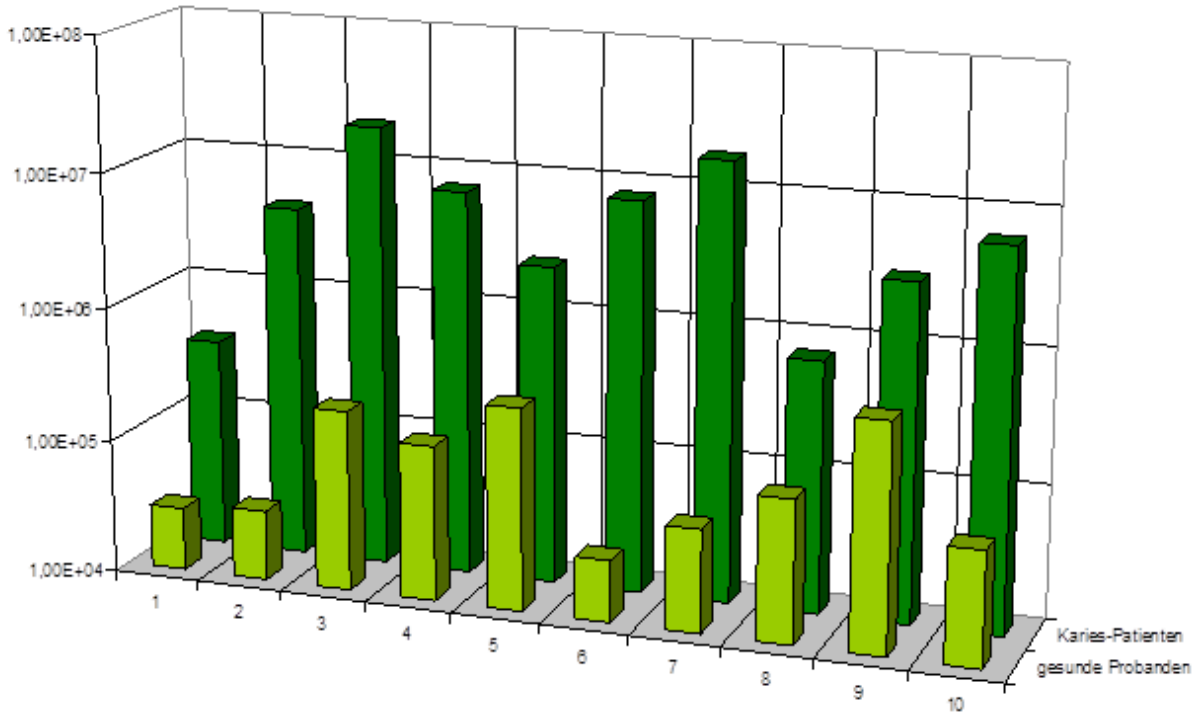


Abbildung 66: Gesamtzellzahlen pro Probe (jeweils 1 bis 10) im Vergleich zwischen der gesunden Kontrollgruppe (hellgrün) und den Kariespatienten (dunkelgrün), logarithmische Skalierung

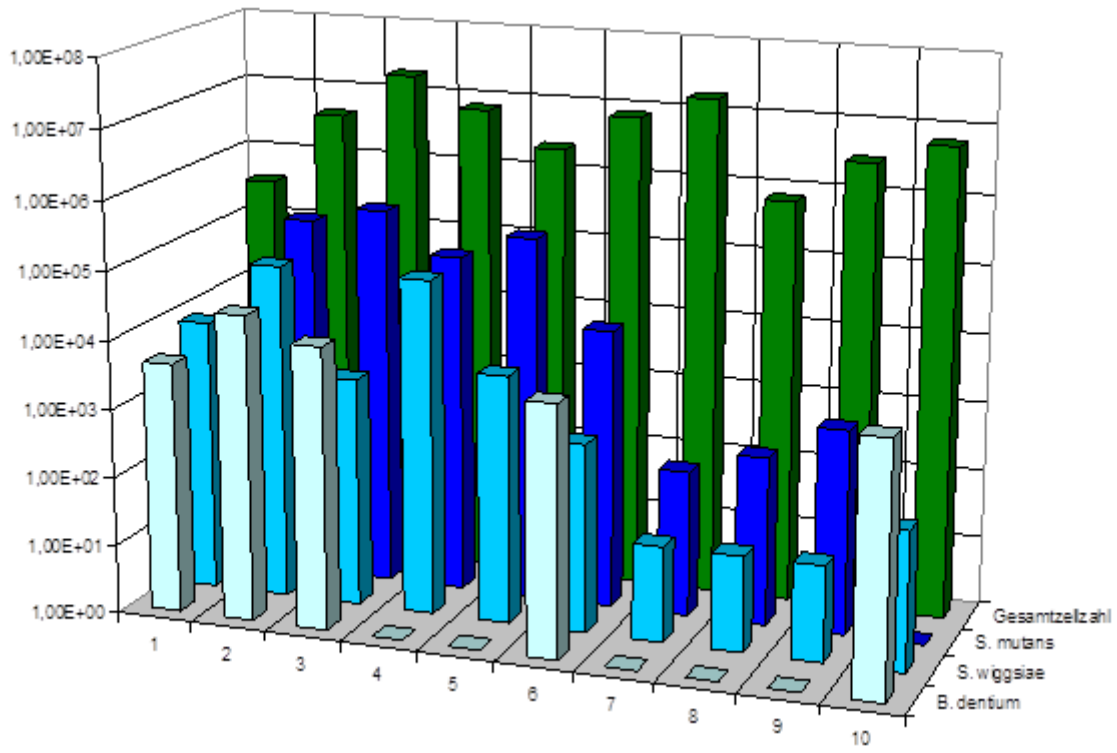


Abbildung 67: Zellzahlen der Karieserreger *S. mutans*, *S. wiggsiae*, *B. dentium* und Gesamtzellzahl pro Probe bei zehn Patientenproben aus kariösen Läsionen (logarithmische Skalierung)

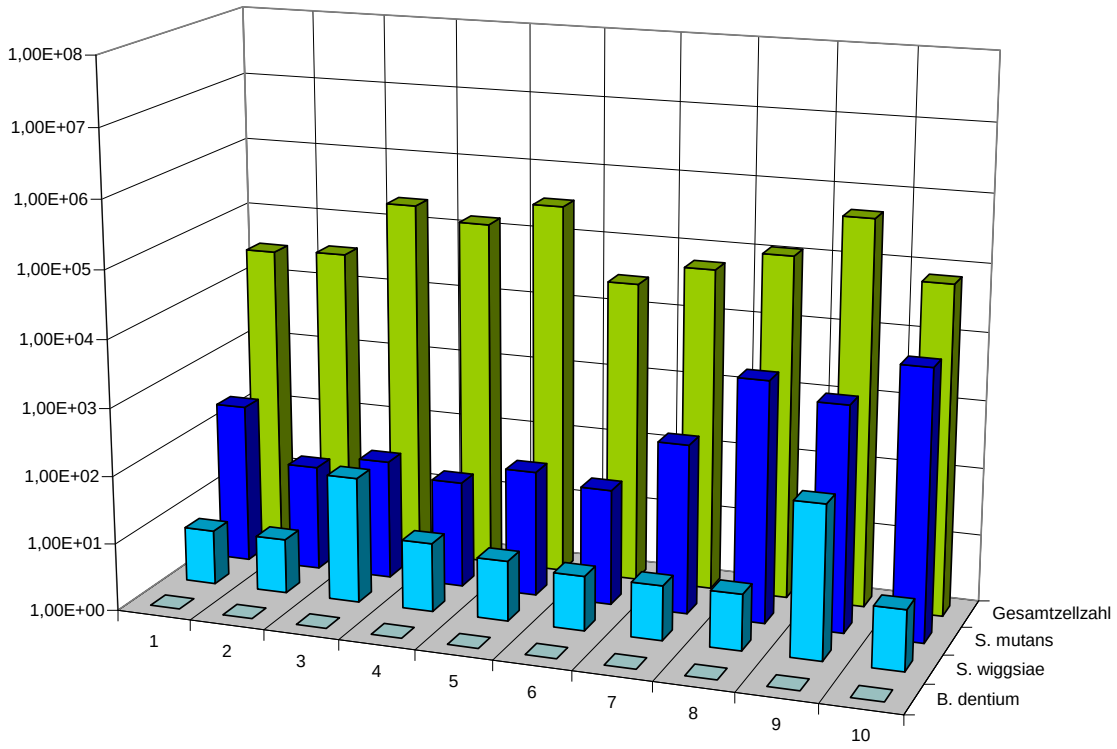
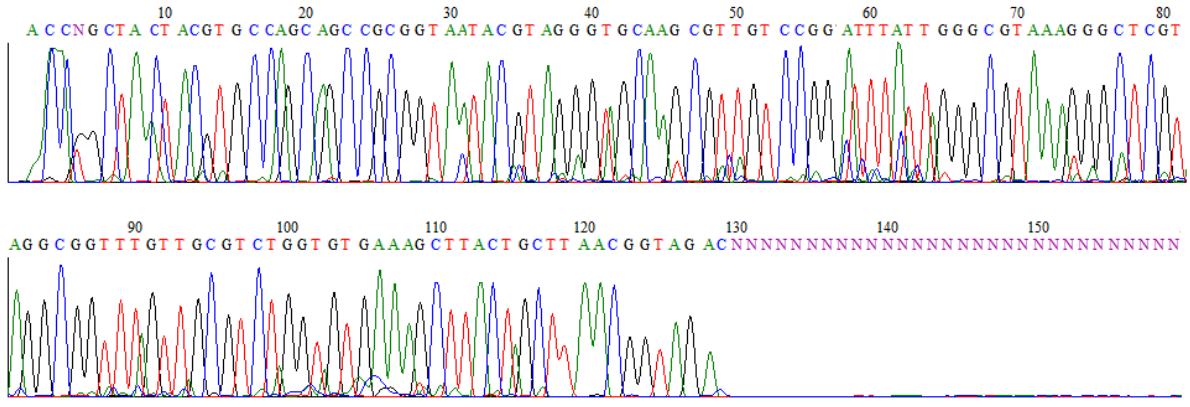


Abbildung 68: Zellzahlen von *S. mutans*, *S. wiggsiae*, *B. dentium* und Gesamtzellzahl pro Probe bei zehn Proben von gesunden Probanden (Kontrolle), logarithmische Skalierung

Man kann erkennen, dass die Gesamtzellzahlen innerhalb der Kontrollgruppe deutlich niedriger sind, als bei den Kariespatienten (weniger Plaque bei kariesfreien Flächen). Die Gesamtzellzahlen der Kontrollgruppe schwanken zwischen $2{,}90x10^4$ und $4{,}92x10^5$ Zellen (MW: $1{,}52x10^5$, SE: $4{,}84x10^4$), während bei der Kariesgruppe die Zellzahlen um jeweils eine Zehnerpotenz höher liegen und zwischen $3{,}71x10^5$ und $1{,}97x10^7$ Zellen schwanken (MW: $7{,}01x10^6$, SE: $2{,}12x10^6$).

Wie man deutlich erkennen kann, ist die Prävalenz der Karieserreger bei Patienten mit kariösen Läsionen deutlich höher als bei den gesunden Probanden. Die Werte für den Karies-Marker *S. mutans* liegen bei den Karies-Proben im Schnitt bei $8{,}10x10^4$ (SE: $3{,}54x10^4$) Zellen. Bei den gesunden Probanden sind die Werte hingegen um eine Zehnerpotenz niedriger mit einem durchschnittlichen Mittelwert von nur $1{,}57x10^3$ (SE: $9{,}29x10^2$) Zellen. *Scardovia wiggsiae* konnte in allen Proben nachgewiesen werden. Aber auch hier ist die Prävalenz mit einem Mittelwert von $1{,}71x10^4$ (SE: $1{,}01x10^4$) Zellen bei den Karies-Proben deutlich höher als bei den gesunden Probanden. Die Zellzahlen der gesunden Probanden bewegen sich hier mit einem Mittelwert von $3{,}10x10^1$ (SE: $1{,}77x10^1$) Zellen an der Nachweisgrenze. Am interessantesten ist jedoch der Nachweis von *B. dentium*. In den Proben der gesunden Probanden konnte der Keim gar nicht nachgewiesen werden, während er bei den Kariespatienten zu 50% vorhanden war. In den Proben wo *B. dentium* nachweisbar war lag die durchschnittliche Zellzahl bei $5{,}51x10^3$ Zellen (SE: $2{,}88x10^3$).

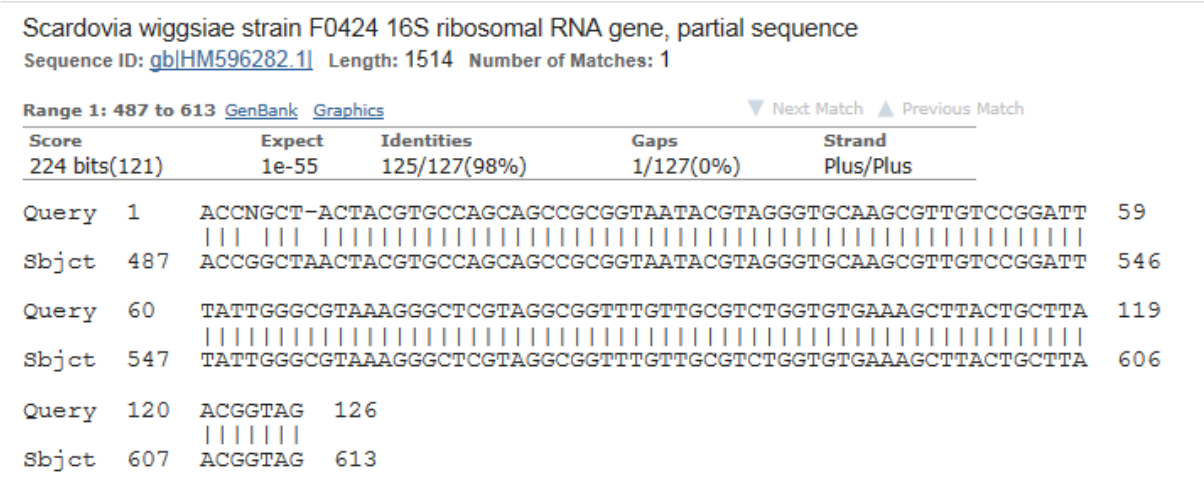
Zur Kontrolle wurden Spot-check Sequenzierungen ausgewählter Amplifikate aller Erreger in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Die erzielten Sequenzen wurden wie beschrieben ausgewertet und an BLAST übermittelt. Am Beispiel der nachfolgenden Sequenz wird einmal der Identifizierungsprozess veranschaulicht.


10 20 30 40 50 60 70 80
A C CNG CT A CT ACGT G C CAGC AGC CGC G G T AAT AC GT AG G G T G CAAG CGT T GT C C G G ATTT AT T G G G C GT AAAG G G C T C GT
90 100 110 120 130 140 150
AG G C G G TT T GT T GC GT CT G G T GT GAAAG CTT ACT GCTT AAC G G T AG ACNNN

Die folgende Sequenz wurde an BLAST übermittelt:

ACCNGCTACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTC
CGGCATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTGTTGCGTCTGGTGTGA
AAGCTTACTGCTTAACGGTAGAC

Dabei wurde folgendes Ergebnis erhalten:



Scardovia wiggsiae strain F0424 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|HM596282.1| Length: 1514 Number of Matches: 1

Range 1: 487 to 613 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
224 bits(121)	1e-55	125/127(98%)	1/127(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    ACCNGCT-ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGATT  59
           ||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  487  ACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGATT  546

Query  60   TATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTGTTGCGTCTGGTGTGAAAGCTTACTGCTTA  119
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  547  TATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTGTTGCGTCTGGTGTGAAAGCTTACTGCTTA  606

Query  120  ACGGTAG  126
           |||||||
Sbjct  607  ACGGTAG  613
```

Abbildung 70: BLAST-Ergebnis Vergleich der eingegebenen Sequenz (oben „Query“) mit der Referenzsequenz aus der Datenbank (unten „Sbjct“)

Wie man sehen kann ist die eindeutige Identifizierung des Erregers, in diesem Fall *S. wiggsiae*, möglich. Die Sequenzierungsergebnisse bestätigten die Identität der Amplifikate in allen Fällen, was die Spezifität der neuen PCR-Protokolle beweist.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden einige interessante Ergebnisse erzielt, die helfen verschiedene systembiologische Aspekte von *Streptococcus mutans* und einigen nahen Verwandten besser zu verstehen. Der kürzlich neu entdeckte Biofilminhibitor Carolacton wurde erstmals im Tierversuch eingesetzt. Die Funktion mehrerer Two-Component Systems konnte durch computergestützte Genomanalysen und mit Hilfe von *in vitro* Experimenten genauer untersucht werden. Die Bedeutung der Toxin-Antitoxin-Systeme auf plasmid- und chromosomaler Ebene bei verschiedenen *S. mutans*-Stämmen wurde umfassend untersucht. Außerdem konnte die Bedeutung der Laktat-Oxidase für den Stoffwechsel bei *Streptococcus sobrinus* eingehender analysiert werden. Des Weiteren wurde eine neue Karies-PCR etabliert, die speziell die Keime *Scardovia wiggsiae* und *Bifidobacterium dentium* miterfasst.

4.1. Einsatz von Carolacton *in vivo*

Nach mehreren erfolgreichen *in vitro* Versuchen zur Reduktion der Biofilmbildung bei *S. mutans* (*54*)(*58*)(*78*) sollte die inhibitorische Wirkung von Carolacton erstmals im Tierversuch untersucht werden. Die Arbeitshypothese dazu war, dass eine Inhibition der Biofilmbildung beim Karieserreger *S. mutans* zu einer Verminderung der Kariesinzidenz und Kariesprogression beim Versuchstier führen sollte. Teil der Arbeit war es ein neues Tiermodell für die Kariesentstehung zu etablieren. Als Versuchstiere für die Entwicklung eines solchen Modells eignen sich am besten Ratten und Hamster (*112*). Viele der etablierten Rattenmodelle basieren auf der Verwendung von keimfreien bzw. gnotobiotischen Tieren, darunter die Linien Osborne-Mendel (specific pathogen free Osborne-Mendel, SPFOM), Wistar und Fisher (*113*)(*114*)(*115*)(*116*)(*117*). Aufzucht und Haltung dieser Tiere sind sehr kostspielig und aufwendig, da die sterilen Bedingungen über die gesamte Versuchsdauer aufrechterhalten werden müssen. Für unser Tier-Modell haben wir Sprague-Dawley Ratten verwendet, die normal und damit unsteril aufgezogen wurden. Durch die Kombination einer antiinfektiven Behandlung mit anschließender gezielter Inokulation von *S. mutans* in hoher Keimzahl (an drei aufeinanderfolgenden Tagen) konnten effektive Voraussetzungen für die Etablierung des Karieserregers in der Maulhöhle geschaffen werden. Ähnliche Ansätze wurden bereits früher von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich angewandt (*118*)(*119*)(*120*)(*121*).

Bei unserem Ansatz wurde speziell die grampositive Mundflora der Tiere durch Chlorhexidin und Augmentan stark reduziert. So konnte die Kolonisation mit *S. mutans* erfolgreich durchgeführt werden. Bei diesem Ansatz musste aber sichergestellt sein, dass die Kariesläsionen auch tatsächlich durch *S. mutans* und nicht durch verbliebene Begleitbakterien hervorgerufen wurden. Dies konnte exemplarisch durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen aus den Läsionen sichergestellt werden. In zwei Tierversuchen wurde Carolacton in unterschiedlichen Darreichungsformen getestet. Während der Versuche wurden in regelmäßigen Abstrichen die *S. mutans*-Zellzahlen kontrolliert. Nach Versuchsende wurden die Kiefer der Tiere histologisch untersucht. Dabei wurden die Kariesläsionen nach Inzidenz und Progression nach Keyes (*105*), bzw. Larson (*106*), bewertet.

4.1.1. Carolacton als Additiv im Zahnlack

Im ersten Versuch wurde als Ausgangssubstanz ein Zahnlack verwendet, der einmal in seiner gewöhnlichen Form angewandt wurde und einmal Carolacton als Additiv enthielt. Der Zahnlack wurde insgesamt zweimal auf die Molaren der Tiere aufgetragen. Als Kontrolle diente eine Gruppe von Tieren deren Molaren nicht lackiert wurden. Nach Abschluss des ersten Tierversuchs wurden folgende Ergebnisse erwartet:

- die unbehandelte Kontrollgruppe weist die höchsten Zellzahlen und die höchsten Karieswerte auf
- beide Lackgruppen weisen auf Grund der protektiven Wirkung des Zahnlacks weniger Zellzahlen und niedrigere Karieswerte auf, als die unbehandelte Kontrollgruppe
- die Lackgruppe ohne Wirkstoff weist niedrigere Zellzahlen und weniger Kariesläsionen als die Kontrollgruppe auf, aber höhere Zellzahlen und mehr Kariesläsionen als die Lackgruppe mit dem Carolacton

Nach Auswertung der Ergebnisse stellten wir fest, dass unsere Erwartungen nur zum Teil bestätigt werden konnten. Betrachtet man nur die Entwicklung der Zellzahlen so lassen sich folgende Aussagen machen:

- über den gesamten Versuchszeitraum gibt es weder eine Gruppe die konstant niedrige Zellzahlen aufweist, noch eine Gruppe die konstant hohe Zellzahlen aufweist

- die unbehandelte Kontrollgruppe weist nicht die höchsten Zellzahlen in der Maulhöhle auf, sondern am Ende des Versuchs sogar durchschnittlich die niedrigsten Zellzahlen
- der Verlauf der Zellzahlen ist bei der Kontrollgruppe homogen
- beide Lackgruppen zeigen teilweise starke Schwankungen im Verlauf der Zellzahlen

Beim Karies-Scoring nach Keyes werden die Läsionen in die Kategorien Schmelzkaries (E, Enamel caries) bis tiefe Dentinkaries (Dx, Dentine deep caries) eingeteilt. Durch das Bewertungssystem lässt sich die Schwere der entstandenen Kariesläsionen abschätzen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass die Induktion der Karies erfolgreich war. Bei fast allen Tieren konnten kariöse Läsionen bewertet werden, lediglich ein Tier (Ratte 36) wies nur oberflächliche Schmelzkaries (E) auf. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- die unbehandelte Kontrollgruppe weist in allen vier bewerteten Kategorien (E bis Dx) die höchsten Karieswerte auf
- die Lack D Gruppe weist die niedrigsten Werte auf
- die Lack C Gruppe liegt genau zwischen den beiden anderen Gruppen

Die Ergebnisse für die unterschiedlichen Schweregrade (E bis Dx) entsprechen den Erwartungen. Am häufigsten wurde Schmelzkaries gefunden, am wenigsten die schwere Form der tiefen Dentinkaries. Diese Ergebnisse sind in sich stimmig, da sich Karies immer von außen (Zahnschmelz) nach innen (tiefe Dentinschichten) entwickelt. Besonders auffällig sind die hohen Werte bei der Dx-Form. Auf Grund der langen Versuchsdauer war genügend Zeit vorhanden um die Entwicklung dieser besonders schweren Form zu ermöglichen. Die Unterschiede beim Karies-Scoring zwischen den einzelnen Gruppen fallen allerdings gering aus, sodass keine statistische Signifikanz erkennbar ist.
Kombiniert man die *S. mutans*-Zellzahlen und das Karies-Scoring miteinander, so verhalten sich diese Ergebnisse unerwarteter Weise reziprok zueinander (Kontrollgruppe niedrigste Zellzahlen – höchste Karieswerte; Lack D höchste Zellzahlen – niedrigste Karieswerte). Ein Grund für die Unstimmigkeit zwischen erwarteten und tatsächlich gemessenen Zellzahlen liegt vermutlich in der lokalen Verteilung der Bakterienzellen. Wie man auf den REM-Bildern deutlich erkennen

kann, lagen die *S. mutans*-Nester sehr tief in den Fissuren. Außerdem waren die Bakterien großflächig von einer Biofilmmatrix umgeben und so regelrecht eingeschlossen. Je mehr Kariesläsionen vorhanden sind, desto besser sind die Zellen durch den Biofilm geschützt. Dadurch konnte nur eine geringe Erregerzahl in die Maulhöhle gelangen, wo sie bei den Abstrichen mit dem Tupfer aufgenommen wurden. Möglicherweise reichern die Kariesläsionen sogar *S. mutans*-Zellen an, sodass sie vornehmlich in der kariösen Läsion vorkommen. Dadurch würden sie aus der Maulhöhle verschwinden und damit aus dem Bereich den der Abstrichtupfer erfassen kann. Vergleicht man die Ergebnisse der Lackgruppen mit der Kontrollgruppe so wird dieser Effekt sichtbar. In der unbehandelten Kontrollgruppe sind erwartungsgemäß die höchsten Karieswerte gemessen worden, es sind also viele Kariesläsionen vorhanden. Die Zellzahlen der Kontrollgruppe liegen hingegen im Schnitt unter den Zellzahlen der Lackgruppen. Der Biofilm in den Läsionen bindet offensichtlich die Karieserreger, z. B. indem sie sich im Dextrannetz verfangen oder an Plaque-Agglutinin-Glykoproteine über ihr Surface-AntigenI/II (SpaP) binden, sodass die messbaren freien Zellzahlen geringer ausfielen als erwartet (*122*)(*123*). Umgekehrt gilt: je weniger Kariesläsionen vorhanden sind, desto geringer ist der Biofilm und desto mehr Zellen befinden sich im planktonischen Zustand. Daher ist der Zusammenhang zwischen Zellzahlen und Kariesläsionen umgekehrt proportional und nicht wie vermutet direkt proportional. Beim Menschen ist diese Reziprozität allerdings nicht gegeben, wodurch man den Nachweis von *S. mutans* als Kariesrisiko- und Progressionstest nutzen kann (*124*)(*125*)(*126*). Möglicherweise erklärt sich dieser Unterschied durch das Verhältnis zwischen Zahngröße / Zahnanzahl zum Volumen der Mundhöhle, was beim Menschen wesentlich größer ist. Zudem sind die Fissuren beim Menschen nicht so tief und schmal wie bei der Ratte, womit der Austritt einer hohen Erregerzahl und ihr Nachweis in der Mundhöhle wahrscheinlicher werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine verbesserte Wirkung durch einen der Zahnlacke. Nach Versuchsende und nach abgeschlossener Auswertung aller Daten (Abstriche und histologische Schliffe) wurde die Studie entblindet. Dabei wurde bekanntgegeben, dass Lack C das Carolacton enthielt, also die Gruppe mit der tendenziell schlechteren Wirkung. Diese Tatsache wurde so nicht erwartet und wirft die Frage auf, wieso der Effekt von Carolacton im Tierversuch nicht nachweisbar war. Dafür kann es mehrere Gründe geben: für die Wirkung des Carolactons ist ein

optimales Timing der Applikation essentiell, da es am besten in den ersten 12 Stunden auf einen wachsenden Biofilms wirkt (*127*). Da die Lackierung der Zähne bereits vor der Inokulation mit *S. mutans* durchgeführt wurde könnte dieser Zeitpunkt im ersten Versuch verpasst worden sein, sodass der inhibitorische Effekt von Carolacton nicht sichtbar wurde. Auch die exakte Art der Wirkstoffapplikation könnte von Bedeutung sein. Betrachtet man einen Rattenzahn genauer (siehe Abb. 17), kann man erkennen, dass die Zähne von sehr tiefen Fissuren durchzogen sind. Es ist schwer vorstellbar, dass ein viskoser Zahnlack bis in die Tiefe dieser Fissuren vordringen kann. Es ist wahrscheinlicher, dass nur eine oberflächliche Versiegelung bewirkt wird. Da die Lackierung ca. 24h vor der ersten Inokulation mit *S. mutans* stattgefunden hat, könnte in diesem Zeitraum bereits eine Zerstörung der Lackschicht durch aufgenommene Nahrung oder Einstreu erfolgt sein. Die Wirkung des Carolactons in der noch vorhandenen Lackschicht wäre dann bereits stark eingeschränkt und somit ineffektiv gewesen. Zusätzlich musste sich der Biofilm dann noch entwickeln, sodass keine optimalen Bedingungen für die Wirkung von Carolacton vorlagen. Daher wurde im zweiten Versuch die Art der Wirkstoffapplikation abgeändert, mit dem Ziel eine kontinuierliche Supplementation der Wirkstoffe zu gewährleisten. Zusätzlich zum Carolacton wurde im zweiten Versuch Fluorid als Kontrolle eingesetzt, dessen antikariogene Wirkung ist seit langem bekannt (*6*)(*128*)(*129*)(*130*).

4.1.2. Carolacton als Trinkwasserzusatz

Im zweiten Versuch wurden einige Änderungen durchgeführt: zur Verbesserung der statistischen Aussagekraft wurden mehr Tiere eingesetzt, die Versuchsdauer wurde verkürzt um die Frühphasen der Kariogenese zu erfassen und die Art der Wirkstoffapplikation wurde abgeändert. Durch die kontinuierliche Supplementation des Trinkwassers mit den Wirkstoffen sollte eine verbesserte Biofilm-Inhibition erzielt werden. Die zusätzlich durchgeführten Spülungen der Maulhöhle mit den Wirkstoff-Konzentraten sollten den Effekt noch verstärken. Für den Versuch standen zwei Lösungen zur Verfügung, die zum einen Carolacton und zum anderen ein Placebo (Wasser) enthielten. Durch vorangegangene *in vitro* Experimente war bekannt, welche Carolacton-Konzentrationen prinzipiell ausreichen, um eine Biofilmbildung zu unterbinden (*58*)(*78*). Dementsprechend wurden die Konzentrationen für das Trinkwasser (0,25µg/ml) und die Mundspülung (50µg/ml) gewählt. Für die

Fluoridgruppe wurden die Konzentrationen (1mg/l und 250mg/ml) ebenfalls so gewählt, dass der protektive Effekt des Fluorids sichtbar werden konnte (*6*)(*131*).

Im zweiten Versuch wurde neben dem Carolacton noch zusätzlich Fluorid eingesetzt. Das Fluorid diente dabei als Positivkontrolle, da die protektive Wirkung von Fluorid seit langem bekannt ist und Fluoridpräparate in der Zahnheilkunde zur Kariesprophylaxe eingesetzt werden (*6*). Zu Versuchsbeginn wurde das Trinkwasser mit Natriumfluorid (Merck, Darmstadt) versetzt. Da die Tiere jedoch nur sehr widerwillig tranken wurde das reine NaF durch Fluoridtabletten mit Himbeergeschmack für Kinder ersetzt. Eine Tablette enthält 1mg reines Fluorid. Nach dem Austausch der Fluoridquelle war das Trinkverhalten der Tiere ähnlich wie in den anderen Gruppen.
Betrachtet man die Gewichtsentwicklung der Tiere am Ende des Versuchs konnte man zwischen den drei Gruppen keinen großen Unterschied erkennen. Daraus konnte man schließen, dass die Tiere keine Entwicklungs- oder Wachstumsstörungen aufweisen, die durch die Zusätze bedingt sein könnten.
Diesmal wurde aufgrund der kontinuierlichen Wirkstoffsupplementation mit einem stärkeren Effekt gerechnet, der sich wie folgt zeigen sollte:

- die Gruppe mit Carolacton sollte die niedrigsten Karieswerte aufweisen
- die Placebo-Gruppe sollte als Kontrolle fungieren und die höchsten Karieswerte aufweisen
- die Fluoridgruppe diente als Behandlungskontrolle und sollte von den Karieswerten her die mittlere Gruppe bilden

Die Zellzahlen für *S. mutans* wurden weiterhin erfasst, lassen sich aber aufgrund der Erkenntnisse aus dem ersten Versuch nur schwer interpretieren. Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- die Fluoridgruppe zeigte zuerst steigende Zellzahlen und am Versuchsende die niedrigsten Zellzahlen
- die Gruppen mit dem Carolacton bzw. dem Placebo zeigten beide zuerst fallende Zellzahlen, die zum Schluss wieder anstiegen

Das Karies-Scoring wurde diesmal mit Hilfe von drei verschiedenen Bewertungssystemen durchgeführt. Das System nach Keyes wurde erneut

angewandt, zum zweiten wurde das Bewertungssystem nach Larson eingesetzt und als drittes wurde ein selbstentwickeltes System eingesetzt. Die Auswertung mit dem dritten System ist Teil der Doktorarbeit von Vera Heinz und wird hier nicht berücksichtigt.

Das Bewertungssystem nach Larson teilt die Kariesläsionen genauso wie das System nach Keyes in die vier Kategorien E bis Dx ein. Ähnlich wie im ersten Versuch konnten bei allen Tieren kariogene Läsionen gemessen werden. Nach Abschluss der Auswertung wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- die Fluoridgruppe zeigte im Bewertungssystem nach Keyes die niedrigsten Werte in allen vier Kategorien (E bis Dx)
- die Fluoridgruppe zeigte im Bewertungssystem nach Larson die niedrigsten Werte in den Kategorien E und Ds
- im Bewertungssystem nach Keyes zeigte die Carolacton B Gruppe die höchsten Werte in den Kategorien E und Ds, während die Carolacton A Gruppe den höchsten Wert in der Kategorien Dm zeigte (beide Gruppe weisen ähnliche Werte für Dx auf)
- im Bewertungssystem nach Larson zeigte die Carolacton A Gruppe die höchsten Werte in den Kategorien Ds bis Dx, während die Carolacton B Gruppe den höchsten Wert für E zeigte
- in der Carolacton B Gruppe wurden nach Larson keine Läsionen in der Kategorie Dx bewertet
- nach beiden Methoden ist der Dm-Wert der Gruppe B niedriger als bei der Gruppe A (bei Larson sogar niedriger als in der Fluoridgruppe)

Allerdings sind auch in dieser Auswertung die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sehr gering. Ähnlich wie im ersten Versuch wurde auch hier erst nach Abschluss aller Auswertungen – Abstriche und Histologie – eröffnet, dass Gruppe B das Carolacton enthielt. Bei den Gruppen A (Placebo) und B (Carolacton) unterscheiden sich die Karies-Werte je nach Auswertungsverfahren. In der Auswertung nach Keyes weist die Gruppe B in den Kategorien E und Ds die höchsten Werte auf. Während in der Auswertung nach Larson die Dentinkaries (Ds, Dm, Dx) und besonders die schwerste Form (Dx) in der Gruppe A hervorsticht. Bei Gruppe B sind hingegen für die Kategorie Dx gar keine Läsionen bewertet worden.

Nach beiden Auswertungen, aber wesentlich deutlicher nach Larson, könnte das Carolacton also tendenziell die schweren Karies-Progressionsformen Dm und Dx reduziert haben. Damit wäre eine Reduktion der Kariesprogression erreicht worden. Allerdings sind die Werte für die oberflächliche Schmelz- und Dentin-Karies (E und Ds) – besonders nach Keyes – bei der Carolacton Gruppe B höher sind als bei den beiden anderen Gruppen. Somit wäre auch denkbar, dass die Reduktion der schweren Kariesformen auf die verkürzte Versuchsdauer zurückzuführen ist. Da auch bei Gruppe A lediglich bei drei Tieren überhaupt die schwere Form Dx bewertet wurde (siehe Anhang Punkt 7.6.2.2.).

Insgesamt scheint der Zusatz von Carolacton zum Trinkwasser in Verbindung mit Mundspülungen keinen deutlichen Einfluss auf die Karies-Initiation und –Progression zu haben. Lediglich die Fluoridgruppe hebt sich mit ihren durchgängig niedrigen Werten von den beiden Carolacton Gruppen ab. Dadurch werden die Qualität des Tiermodells und die Effizienz des Fluorids als Wirkstoff unterstrichen.

Die Fluoridbehandlung vermindert die Löslichkeit des Zahnhartgewebes (*6*), wodurch die Zähne für *S. mutans* unattraktiver werden. Der Karieserreger verbleibt eher im Speichel, was zu einem Anstieg der Zellzahlen führt. Zum dritten Abstrich hin machte sich dann aber die protektive Wirkung des Fluorids bemerkbar, die Zellzahlen sinken. Da beim Fluorid auch weniger Kariesläsionen entstanden sind, waren damit auch weniger Nachwuchsquellen für *S. mutans* vorhanden. Zusätzlich werden die nicht an den Zahn gebundenen Bakterien mit der Zeit durch Verschlucken aus der Maulhöhle entfernt.

4.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vivo* Experimente

Die Entwicklung eines neuen Tiermodells zur Kariesentstehung in der Ratte war erfolgreich. Durch die antiinfektive Behandlung mit Chlorhexidin und Augmentan konnte die natürliche Rattenflora in beiden Versuchen effektiv reduziert werden. Die anschließende gezielte Ansiedlung mit *S. mutans* gelang in beiden Versuchen. Die Kombination aus einer stark zuckerhaltigen Ernährung (gezuckertes Futter und Trinkwasser) und einer gezielten Ansiedlung mit dem Karieserreger *S. mutans* ermöglicht die Bildung von kariösen Läsionen binnen weniger Wochen. Der Nachweis von *S. mutans* innerhalb der tiefen kariösen Fissuren konnte eindrucksvoll durch REM-Aufnahmen bestätigt werden. In beiden Versuchen zeigten die Tiere keine offensichtlichen Entwicklungsstörungen. Das von uns entwickelte Karies-

Modell in der Ratte eignet sich prinzipiell zur Überprüfung von inhibitorischen Substanzen auf die Kariesbildung, was durch die Ergebnisse der Fluoridgruppe belegt werden konnte. Allerdings konnte die inhibitorische Wirkung von Carolacton *in vivo* nicht wie erwartet bestätigt werden. Möglicherweise ist der Effekt des eingesetzten Carolactons nicht stark genug, da die Tierversuche sehr komplexe Zusammenhänge auf einen begrenzten Zeitraum komprimieren. Im offenen System der Mundhöhle wirken viele Einflussfaktoren – wie Verschlucken, Trink- und Fressverhalten der Tiere, Abrieb durch gekautes Futter und Einstreu, die Begleitflora etc. – der kontinuierlichen Wirkung einer Substanz entgegen. Unser Tiermodell ist sehr komplex und kommt damit der Wirklichkeit näher als ein Einzelspezies-Idealmodell. Ein durchschlagender Effekt von Carolacton war zwar wünschenswert aber nicht besonders wahrscheinlich.

Weiterhin muss erwähnt werden, dass uns für beide Versuchsreihen nur grenzwertige Konzentrationen von dem bis dato rein biotechnologisch hergestellten Carolacton (Weltjahresproduktion 50 mg) zur Verfügung standen. Beim zweiten Versuch konnte den Mundspüllösungen nicht ausreichend Wirkstoff beigemischt werden. Auf Grund der hohen Temperaturen im Juni 2011 tranken die Ratten deutlich mehr als geplant. Es war absehbar, dass die bereitgestellte Menge an Carolacton bzw. Placebo nicht bis zum Ende des Versuchs reichen würde. Wir entschieden uns daher dafür die Konzentration der Trinkwasserzusätze aufrecht zu erhalten und die Konzentration der Spüllösungen gegen Ende des Versuches zu halbieren. Ob und wie weit diese Tatsache den Versuch beeinflusst hat ist rein spekulativ. Für nachfolgende Versuche sollten allerdings folgende Punkte beachtet bzw. optimiert werden:

- die minimale inhibitorische Konzentration wird *in vivo* (deutlich) höher liegen als *in vitro*; es muss mit mehr Wirkstoff (oder Derivaten) gearbeitet werden
- um eine Verzerrungen der Daten zu vermeiden ist die Einhaltung einer gleichbleibenden Wirkstoffkonzentration bis Versuchsende essentiell
- der Zeitpunkt für den Einsatz von Carolacton muss sorgfältiger gewählt werden
- die Supplementation von Trinkwasser und Spüllösungen mit dem Wirkstoff erscheint prinzipiell sinnvoll
- ein Lack ist für die Applikation bei Ratten aufgrund der Zahnanatomie wenig sinnvoll, beim Menschen aber weiterhin eine Option

- der lokale Einsatz von Carolacton in zahnmedizinischen Füllungsmaterialen könnte sinnvoll sein und muss umfangreich geprüft werden

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Effekt von Carolacton unter gleichbleibenden, kontrollierbaren *in-vitro*-Bedingungen deutlich besser sichtbar ist, als bei schwankenden, multifaktoriellen *in-vivo*-Voraussetzungen. In keinem der beiden Tierversuche konnte die Wirkung des Biofilminhibitors Carolacton eindeutig bestätigt werden. Durch die weiterhin angestrebte (und durch das BMBF im e:Bio Folgeprojekt finanziell unterstützte) Synthese des Wirkstoffes können höherkonzentrierte Produkte erzeugt werden, die eine bessere Karies-protektive Wirkung versprechen.

4.2. *In silico* Serotypisierung von *Streptococcus mutans*

Die stetig wachsende Zahl neuer Genominformationen ermöglicht eine schnelle und treffsichere *in silico* Serotypisierung von Bakterien ohne teure Herstellung von Antiseren. Die *in silico* Serotypisierung von *S. mutans*-Stämmen ist sehr zuverlässig. Mit Hilfe der angegebenen Primer (*102*) ließen sich die Serotypen einfach und schnell bestimmen. In der Arbeit wurde bei sechs Stämmen (UA159, 5DC8, KK21, KK23, AC4446 und ATCC25175) Serotyp c bestimmt. Der Stamm NCTC11060 wies als Einziger den Serotypen f auf. Non-c Serotypen treten in der Regel deutlich seltener auf, dafür sind diese Stämme jedoch meistens invasiv (*41*). Der c-Serotyp ist mit Abstand der dominierende Serotyp bei *S. mutans*-Stämmen (*41*)(*102*)(*9*). Die Ergebnisse sind somit in sich stimmig.
Interessant wäre die Option entsprechende Primer-Paare auch für die Stämme *S. sobrinus* und *S. ratti* zu entwickeln.

4.3. Zwei-Komponenten Signalsysteme (TCS)

TCS sind für Bakterien wichtige Signaltransduktionssysteme, um auf externe (oder interne) Reize zu reagieren. Sie spielen nicht nur eine Rolle bei der Pathogenität und Virulenz, sondern sind auch wichtig für die ökologische Anpassung und die physiologische Homöostase der Bakterien (*132*). Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Stresstoleranz (*133*). Die Anwesenheit bestimmter TCS kann damit positiven Einfluss auf regulatorische Systeme der Bakterien haben. In einer vergleichenden Genomanalyse konnten insgesamt 18 TCS-Cluster identifiziert

werden. Dazu wurden die Genome der bereits bekannten *S. mutans*-Stämme UA159 und NN2025 sowie die Genome der 8 neu sequenzierten Stämme 5DC8, AC4446, KK21, KK23, ATCC25175, NCTC11060, *S. ratti* DSM20564 und *S. sobrinus* DSM20742 verwendet. Ein TCS-Cluster besteht jeweils aus einer Histidinkinase (HK) und einem Response Regulator (RR) (*82*), zusätzlich wurden jeweils zwei alleinstehende Orphan-HKs und -RRs gefunden (*79*). Die Verifizierung der verschiedenen TCS, mit Hilfe von PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese, gelang nach Optimierung der Primer und der PCR-Konditionen. Die mittels PCR nachgewiesenen TCS sind entweder in einem Stamm vorhanden oder abwesend.

Bei *S. sobrinus* fehlt das TCS-3 (*covSR*) und das TCS-9 (*levRS*). Beide Systeme sind beim Referenzstamm *S. mutans* UA159 an der Säuretoleranz beteiligt (*134*). Durch die Abwesenheit der beiden Systeme könnte *S. sobrinus* einen entscheidenden Nachteil beim Wachstum unter sauren Bedingungen haben und im direkten Konkurrenzkampf gegen *S. mutans* um Nahrung und Lebensraum beeinträchtig sein. Bei *S. mutans* UA159 ist das *levRS*-Cluster Teil eines größeren Regulationssystems, das den Fructanmetabolismus reguliert (*132*). Zusammen mit den extrazellulären Zucker-Bindeproteinen LevQ und LevT bildet es ein vier Komponenten Signaltransduktionssystem (*levQRST*), das die Transkription des Fructanase-Operons (*fruAB*) und des Fructose-Mannose-Phosphotransferase-system-Operons (*levDEFG*) steuert (*135*)(*132*). Bei *S. sobrinus* fehlen neben dem *levRS*-Cluster auch die *levQ*- und *levT*-Gene. Man kann daher davon ausgehen, dass sich der Fructanmetabolism bei *S. sobrinus* deutlich von *S. mutans* UA159 unterscheidet (*79*).

Bei *S. ratti* fehlt das TCS-13 (*comDE*), das bei *S. mutans* UA159 am Quorum Sensing, der Kompetenzentwicklung und der Bakteriozinproduktion beteiligt ist (*136*)(*137*). Ein Fehlen dieses TCS könnte deutliche Auswirkungen auf die Kompetenzentwicklung von *S. ratti* haben. Die TCS-Cluster 16, 17 und 18 hingegen kommen ausschließlich in *S. ratti* vor. Ihre Funktion ist allerdings noch nicht komplett geklärt. TCS-16 könnte an der Regulation der D-Alanyl-Lipoteichonsäure-Biosynthese beteiligt sein. Während TCS-18 hingegen eine PAS-Domäne aufweist, die typischerweise an der cytoplasmatischen Signaltransduktion beteiligt ist. Die Funktion des TCS-17 konnte bislang noch nicht geklärt werden (*79*).

Das TCS-15 (*comP*/*cmpR*) hingegen konnte nur im *S. mutans* Stamm NCTC11060 nachgewiesen werden. Es könnte sich um ein Ortholog des vier Komponentensystems *comQXPA* aus *Bacillus subtilis* handeln, wobei ComP die HK und ComA der RR ist. Allerdings verfügt NCTC11060 weder über ein homologes *comX*, noch über ein homologes *comQ*. Daher bleibt die exakte Bedeutung des TCS-15 weiterhin ungeklärt. In Kombination mit der Tatsache, dass NCTC11060 mutmaßlich invasiver ist als die anderen Stämme, könnte das TCS-15 auch ein zusätzlicher Virulenzfaktor sein (*79*).

Die ungleichmäßige Verteilung der TCS in den drei Spezies *S. mutans*, *S. ratti* und *S. sobrinus* deutet auf unterschiedliche Wege in der Signalerkennung und Verarbeitung hin. Die An- bzw. Abwesenheit bestimmter TCS kann *S. mutans* Vorteile gegenüber den weniger virulenten Stämmen *S. sobrinus* und *S. ratti* verschaffen. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Ergebnisse waren Teil des BioInSys-Projektes. Die Ergebnisse wurden 2012 bei BMC Genomics von unserer Arbeitsgruppe unter folgendem Titel veröffentlicht: Song et al. 2012, A genome-wide study of two-component signal transduction systems in eight newly sequenced mutans streptococci strains (*79*).

4.4. Toxin-Antitoxin-Systeme

TA-Systeme gehören zu den verbreitetsten Systemen innerhalb der Bakterien. Man geht davon aus, dass sie durch horizontalen Gentransfer verbreitet werden (*98*). In unseren Versuchen konnten wir nachweisen, dass die drei chromosomal vermuteten TA-Systeme - *mazEF*, *relBE* und *hicBA* - in allen drei untersuchten *S. mutans*-Stämmen vorhanden sind. Alle drei untersuchten Systeme gehören zur Gruppe der Typ II TA-Systeme, d. h. es handelt sich bei Toxin und Antitoxin um Proteine (*139*). Bei allen drei Toxinen (RelE, MazF und HicA) handelt es sich um mRNA-Endonukleasen (*139*). *RelE* spaltet die mRNA wenn sie sich an der ribosomalen Aminoacyl-Stelle befindet (*95*)(*140*). Während *mazF* und *hicA* die RNA unabhängig vom Ribosom spalten (*139*)(*141*). Eine Übersicht über die Typ II TA-Systeme bietet die Toxin-Antitoxin Database (http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB/). Mit Hilfe von PCR-Experimenten und daran anschließenden Sequenzierungen der PCR-Produkte gelang eine einwandfreie Verifizierung der verschiedenen TA-Systeme in dieser Arbeit. Im Anschluss daran wurden mit Hilfe von Genedoc umfangreiche Homologieanalysen auf Nukleotid- und Aminosäureebene durchgeführt. Dabei

konnte festgestellt werden, dass alle chromosomal kodierten TA-Systeme auf Nukleotid- sowie auf Aminosäureebene eine große Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Wie man an Hand der Tabelle 22 erkennen kann, weisen alle chromosomal kodierten TA-Systeme auf Nukleotidebene über 90% Ähnlichkeit zum Referenzstamm UA159 auf.

Tabelle 22: Homologievergleich der unterschiedlichen TA-Systeme auf Nukleotidebene zwischen UA159 (als Referenzstamm) DC09 bzw. NC101 (Übereinstimmung in Prozentangaben)

Gen	DC09	NC101
mazE	98,78%	99,19%
mazF	98,80%	98,80%
$relB_{chrom}$	98,17%	98,17%
$relE_{chrom}$	94,27%	93,20%
hicB	90,21%	90,48%
hicA	97,40%	98,44%

Bereits im Vorfeld konnte unsere Arbeitsgruppe die Plasmide pDC09 und pNC101 der entsprechenden Stämme DC09 und NC101 sequenzieren (*91*). Bei der Analyse der Plasmide wurde ein *relBE*-System (ORF 5 und ORF 6) entdeckt. Da die genaue Bedeutung von plasmidkodierten TA-Systemen in der Literatur immer noch umstritten ist wollten wir überprüfen, ob das $relBE_{plas}$ eventuell als Ersatz für ein defektes $relBE_{chrom}$ dient. Vergleicht man jedoch die plasmidkodierten *relBE*-Systeme der Stämme DC09 und NC101 mit den chromosomal kodierten *relBE*-Systemen, so erkennt man deutliche Sequenzunterschiede. Obwohl ein BLAST-Vergleich das plasmidkodierte *relBE*-System eindeutig der RelB – bzw. der RelE - Familie zuordnet (Conserved Domain Structures, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml) sind die Sequenzähnlichkeiten auf Ebene der Nukleotidsequenz sehr gering. Guglielmini und Van Melderen weisen jedoch darauf hin, dass trotz massiver Sequenzunterschiede eine homologe dreidimensionale Struktur möglich ist (*110*). Dies konnte durch die „Protein predicton“-Analyse mittels I-Tasser eindrucksvoll bestätigt werden. Die RelB-Proteine - genauso wie die RelE-Proteine - beider TA-Systeme weisen hohe strukturelle dreidimensionale Ähnlichkeit zueinander auf. So lassen sich beide Systeme aufgrund ihrer Tertiärstruktur eindeutig derselben Familie zuordnen. Durch diese enge Verwandtschaft könnte es zu Kreuzreaktionen -

$Antoxin_{plas}$ inhibiert $Toxin_{chro}$ bzw. $Antitoxin_{chro}$ inhibiert $Toxin_{plas}$ - zwischen den beiden Systemen kommen (*90*). Yang et al. konnten 2010 zeigen, dass es bei den drei *relBE*-Systeme (RelBE, RelFG und RelJK) von *Mycobacterium tuberculosis* zu genau solchen Kreuzreaktionen kommt (*142*). Bis jetzt wurde diese Fragestellung noch nicht in *S. mutans* untersucht. Auf Grund der vorliegen Ergebnisse sind Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Systemen jedoch durchaus möglich. Infolge der hohen Übereinstimmung der TA-Komponenten ist zu erwarten, dass alle vorhandenen *relBE*-Systeme funktionsfähig sind. Damit wäre unsere Theorie widerlegt, dass die chromosomalen TA-Systeme bei DC09 und NC101 defekt sind und das plasmidkodierte *relBE* als Komplementation dazu dient.

Eine weitere These besagt, dass TA-Systeme unter Stress (z. B. Hungerbedingungen, Antibiotika) das Zellwachstum stoppen und sogenannte „persister cells“ bilden. Bei diesen Zellen handelt es sich um Zellen im Ruhezustand, die gar nicht bzw. nur sehr langsam wachsen und so ungünstige Bedingungen überstehen können (*143*)(*139*). Leung und Lévesque konnten 2012 zeigen, dass die ektopische Expression von RelBE bzw. MazEF das Zellwachstum zum Stillstand bringt und persistente Zellen bildet (*143*). Diese Hypothese wird in der Literatur allerdings durchaus kontrovers diskutiert (*144*). Magnuson stellte 2007 in seinem Review-Artikel neun mögliche Funktionen chromosomaler TA-Systemen vor (*99*). Allerdings konnte bislang noch keine dieser Theorien eindeutig bestätigt bzw. widerlegt werden, sodass die tatsächliche Funktion von chromosomalen TA-Systemen bis zu diesem Zeitpunkt weiterhin ungeklärt bleibt.

Was jedoch die Funktion plasmidkodierter Systeme betrifft ist man sich einig: plasmidkodierte TA-Systeme agieren als „addiction modules“ in dem sie die Prävalenz der Plasmide innerhalb der Bakterienpopulation erhöhen und so die Überlebensfähigkeit ihrer Wirte steigern (*145*)(*98*)(*146*)(*147*). Zellen die ein Plasmid erhalten überleben, während Zellen ohne Plasmid sterben (post-segregational killing). So wird verhindert, dass sich plasmidfreie Zellen ausbreiten, was zur „Abhängigkeit“ der Zellen vom Plasmid führt (addiction modules) (*148*)(*92*). Außerdem werden innerhalb einer Bakterienpopulation Plasmide ohne TA-System, die zur gleichen Inkompatibilitätsgruppe gehören, verdrängt (*110*). Damit erhöhen Plasmide mit TA-System auch die relative Fitness ihrer Träger und verschaffen ihnen einen Vorteil gegenüber Zellen ohne TA-Plasmide. Allerdings kann dieses

„Verhalten“ auch als Beweis für die selfish-Theorie betrachtet werden, wonach die Plasmide sich quasi Wirte heranziehen und plasmid-abhängig machen.
Insgesamt sprechen die gegenwärtigen sowie unsere Ergebnisse eher für die „selfish“-Theorie, da ein klarer Vorteil des Wirtsbakteriums nicht beobachtet werden konnte (*110*). Die Ergebnisse wurden 2013 im Journal of Oral Microbiology veröffentlicht (*90*) und wurden als Poster auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2013 in Rostock präsentiert (PWP06).

4.5. Laktat-Oxidase

Im Rahmen der Arbeit konnte durch PCR-Verifikation nachgewiesen werden, dass *S. sobrinus* über eine L-Laktat-Oxidase und eine Laktat-Oxidase verfügt. In den anderen getesteten Mutans-Streptokokken sind beide Enzyme nicht vorhanden. Diese Ergebnisse unterstützten die vergleichenden Genomanalysen von Song und wurden im gemeinsamen Paper veröffentlicht (*41*).

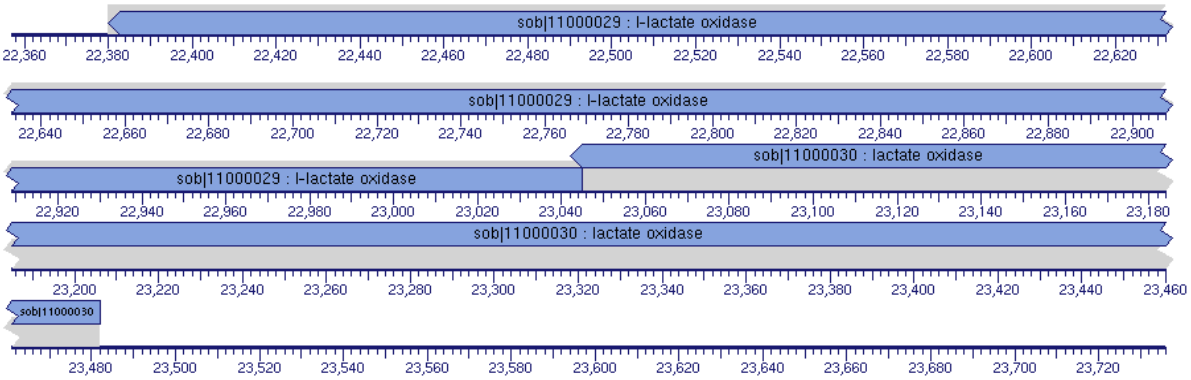


Abbildung 71: Lage der L-Laktat-Oxidase und der Laktat-Oxidase im Genom von *S. sobrinus* (Abbildung aus der BioInSys-Datenbank, *S. sobrinus* Stamm DSM20742)

Im Genom von *S. sobrinus* liegen beide Enzyme aufeinanderfolgend und entgegen der Leserichtung vor. Beide Enzyme wurden größtenteils in Bakterien gefunden, die einen überwiegend fermentativen Metabolismus aufweisen (*100*). Streptokokken zählen zu den Fermentern, sie können aber auch in Anwesenheit von Sauerstoff wachsen. Unter aeroben Bedingungen kann die Laktat-Oxidase die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat unter Abspaltung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) katalysieren (*41*)(*100*). Ein Nachteil bei dieser Reaktion ist die Bildung von H_2O_2, das bekanntlich als Zellgift wirkt (*100*). Da Streptokokken nicht über eine Katalase oder ähnliche Enzyme verfügen muss das H_2O_2 auf alternativem Weg aus den Zellen entfernt werden. Ähnlich wie Bacteriocine könnte *S. sobrinus* das Wasserstoffperoxid als

Bakterizid gegenüber Konkurrenten einsetzen. Ein solches Phänomen wurde bereits für *S. oligofermentas* und *S. sanguinis* beschrieben (*149*)(*150*). Von *S. pneumoniae* ist bekannt, dass die Bakterien mit Hilfe der Laktat- und Pyruvat-Oxidase Milchsäure zu Essigsäure verstoffwechseln (*41*). Diese Reaktion läuft ebenfalls unter aeroben Bedingungen ab und bildet einen neuen Stoffwechselweg bei dem Energie in Form von ATP gebildet wird (*151*). Allerdings konnte bei *S. sobrinus*, bzw. allen anderen Mutans-Streptokokken keine Pyruvat-Oxidase nachgewiesen werden.

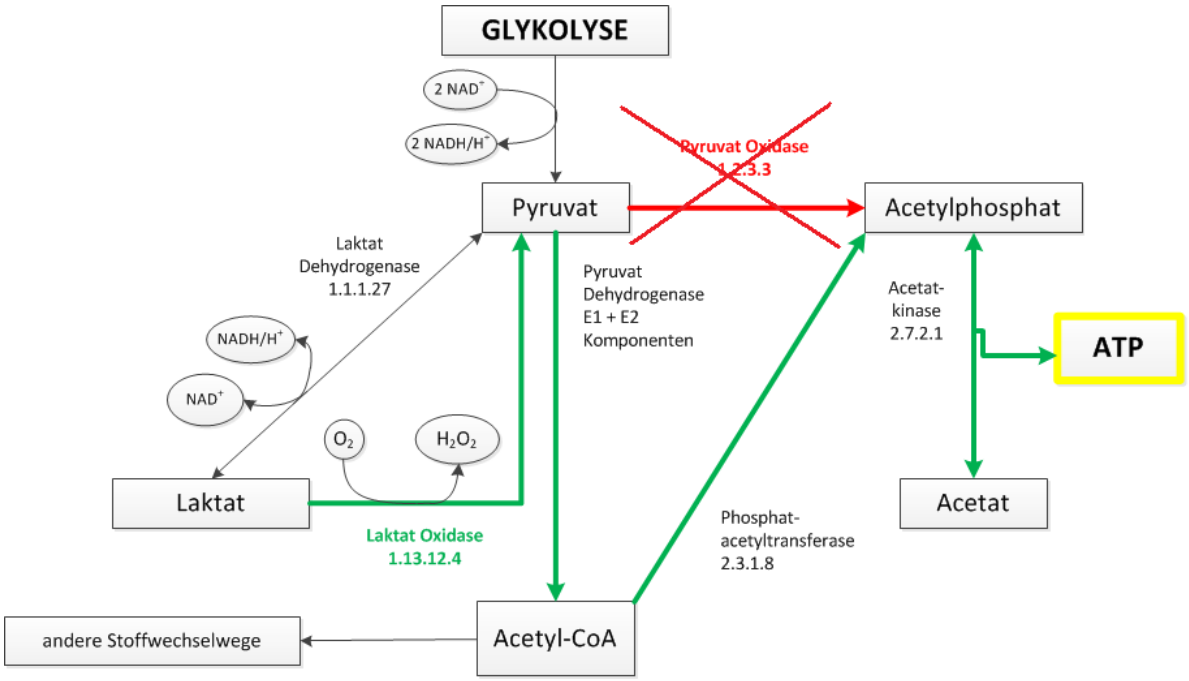


Abbildung 72: Putativer neuer Stoffwechselweg in *S. sobrinus* zur Energieproduktion ausgehend vom Laktat über Pyruvat, Acetyl-CoA, Acetylphosphat zu Acetat (grün) unter Bildung von ATP (gelb)

Da die Pyruvat-Oxidase aber essentiell für diesen Weg ist kann man daraus schließen, dass bei *S. sobrinus* ein anderer Stoffwechselweg für die Produktion von ATP genutzt wird. Dabei bildet die Laktat-Oxidase zusammen mit der Pyruvat-Dehydrogenase, der Phosphatacetyltransferase und der Acetatkinase einen neuen Stoffwechselweg der zu Acetat unter ATP-Bildung führt (siehe Abbildung 72)(*41*). Die Gene der beteiligten Enzyme sind in jedem Fall in den Mutans-Genomen nachweisbar. Zusätzlich könnte *S. sobrinus* durch den Verbrauch von Laktat den pH-Wert regulieren und sich so einen Vorteil bei der Säuretoleranz verschaffen (*41*).
Die computergestützten Genomanalysen zeigten, dass neben *S. sobrinus* noch *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. pyogenes* und *S. dysagalactiae* über eine Laktat-Oxidase verfügen. Bei einigen anderen Spezies (u. a. *S. mitis*, *S. cristatus*, *S. peroris* oder *S. criceti*) ist der Nachweis einer Laktat-Oxidase wahrscheinlich, konnte jedoch

nicht eindeutig belegt werden, da für diese Spezies noch keine kompletten Genominformationen verfügbar waren. Interessant ist der Nachweis der Pyruvat-Oxidase (EC Nummer 1.2.3.3.) in den Spezies der Mitis-Gruppe. Die Pyruvat-Oxidase katalysiert die Oxidation von Pyruvat zu Acetylphosphat und H_2O_2 (*152*). Die Kombination aus Laktat- und Pyruvat-Oxidase könnte es den Bakterien ermöglichen sich einen entscheidenden Vorteil gegenüber *S. mutans* bei initialen Phase der Biofilmbildung zu verschaffen. Besonders im frühen Stadium der Besiedlung, wenn erst wenig Laktat vorhanden ist kann die Pyruvat-Oxidase schon H_2O_2 erzeugen und bildet somit ein primäres Verteidigungssystem gegenüber Konkurrenzkeimen (*152*).
Der Pyruvat Dehydrogenase Komplex (E1 + E2), die Phosphatacetyl-Transferase und die Acetat Kinase konnten in allen Stämmen nachgewiesen werden. Dies ist nicht verwunderlich, da alle Enzyme wichtige Schritte katalysieren. So verbindet z. B. der Pyruvat Dehydrogenase Komplex die Glykolyse mit dem Citratzyklus (*38*).
Da bei einigen Spezies nur eine sehr geringe Anzahl an kompletten Genomen vorlag war eine exakte Aussage über die An- bzw. Abwesenheit der betreffenden Enzyme schwierig. Für eine allgemein gültige Aussage müssten deutlich mehr Genome analysiert werden.
Die Ergebnisse wurden unter meiner Koautorenschaft in 2013 BMC Genomics veröffentlicht (*41*) und unter meiner Erstautorenschaft als Poster auf der DGHM-Tagung 2013 in Rostock präsentiert (MPP01).

4.6. Entwicklung einer neuen Karies-PCR und Durchführung der Pilot-Studie

In den letzten Jahren konnten aufgrund des technologischen Fortschritts (Next Generation Sequencing, Microarrays, verbesserte Kultivierungsverfahren) immer mehr Keime der oralen Mikroflora identifiziert werden. Dazu zählen unter anderem schwer kultivierbare bzw. unkultivierbare Keime die Bestandteil der residenten oralen Mikroflora sind. Dadurch rückten auch potentiell neue kariogene Spezies in den Mittelpunkt des Interesses. So wurde z. B. *Scardovia wiggsiae* erst 2011 genauer in der Literatur charakterisiert, obwohl das Genus *Scardovia* bereits Mitte der Neunziger beschrieben wurde (*36*)(*48*). *Scardovia wiggsiae* zeigt eine starke Prävalenz bei Early Childhood Caries (ECC) (*37*), White Spot Lesions (WSL) und Gingivitis (*35*). Da aber aktuell unter dem Stichwort „*Scardovia wiggsiae*“ bei Pubmed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) nur vier Artikel gelistet sind (Vergleich *S. mutans*: 8500 Artikel), wird deutlich, wie wenig Informationen über *Scardovia*, im

Gegensatz zu etablierten Karieserregern, zur Verfügung stehen. Für die *Bifidobacteriaceae* und im Speziellen *B. dentium* ist die Datenlage besser. Danach kommen *Bifidobacteriaceae* ähnlich häufig im Speichel von Kindern und Erwachsenen vor wie Mutans-Streptokokken (*153*)(*154*). Dabei ist jedoch auffällig, dass *B. dentium* oft in Zusammenhang mit schweren kariösen Läsionen wie etwa Dentin-Karies gefunden wird (*155*)(*156*)(*157*). Die Gemeinschaft aus *S. mutans*, *S. wiggsiae* und *B. dentium* könnte Teil einer neuen pathogenen Gemeinschaft sein, die die traditionellen Karieserreger (*Streptococcus spp*., *Lactobacillus spp*., *Actinomyces spp.)* teilweise ersetzt (*21*). Um dies zu überprüfen wurden im Rahmen der Arbeit neue Primer und PCR-Programme zum Nachweis von *B. dentium* sowie für die Gattung *Bifidobacterium spp.* entwickelt. Das PCR-Protokoll zum spezies-spezifischen Nachweis für *B. dentium* ist nach den Ergebnissen in dieser Arbeit hochspezifisch, da es weder nah-verwandte Arten, wie *B. breve* oder *B. bifidum*, noch benachbarte Genera wie *Scardovia,* erfasst. In Kombination mit den bereits publizierten PCR-Protokollen für den Nachweis von *S. wiggsiae* (*111*) und *S. mutans* (*158*) ist es ein Teil der neuen Karies-PCR.
Die genus-spezifischen Primer für alle Bifidobakterien konnten die im Institut vorhandenen Stämme zwar erfassen, sodass man auch hier von einer gewissen Spezifität ausgehen kann. Da jedoch nicht ausreichend Referenzstämme zur Verfügung standen um dies eindeutig zu belegen wurde auf den weiteren Einsatz dieser Primer zunächst verzichtet.

Um die Zusammensetzung der bakteriellen Flora bei gesunden Probanden sowie im Krankheitsfall – also bei Patienten mit Karies – genauer charakterisieren zu können wurde eine Pilot-Studie durchgeführt. Diese umfasste je 10 Proben aus exkavierten Kariesläsionen sowie 10 Proben aus dem Sulcus gingivae[3] von gesunden Probanden. Dabei wurden die PCR-Protokolle zum Nachweis von *S. mutans*, *S. wiggsiae* und *B. dentium* eingesetzt sowie ein PCR-Protokoll zur Bestimmung der Gesamtzellzahl (*159*). Ähnlich wie in den Tierversuchen diente die Zellzahl von *S. mutans* dabei als Referenz-Marker für die Kariesbildung. Dabei wurden folgende Ergebnisse erwartet:

[3] Sulcus gingivae (kurz Sulcus) = zirkulär verlaufende Vertiefung zwischen dem Zahnhals und dem Zahnfleisch

- die Gesamtzellzahl in den Karies-Proben ist höher als die Gesamtzellzahl in den Vergleichsproben bei Gesunden
- die Zellzahl von *S. mutans* ist in den Kariesproben höher als die von *S. wiggsiae* und *B. dentium*
- der Nachweis von *S. wiggsiae* und *B. dentium* in den Karies-Proben ist wahrscheinlich
- *B. dentium* ist in den Proben der gesunden Probanden nicht nachweisbar

Nach Auswertung der Ergebnisse konnten unsere Erwartungen zum großen Teil bestätigt werden. Die durchschnittliche Gesamtzellzahl der Karies-Proben lag mit einem Mittelwert von $5,4x10^6$ Zellen (SE $2,1x10^6$) um ca. eine Zehnerpotenz höher als bei den Proben der Kontrollgruppe (MW $1,5x10^5$ Zellen, SE $4,9x10^4$). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da kariöse Läsionen mit einer Oberflächenvergrößerung einhergehen und so mehr Fläche zur Ansammlung von Plaque bieten.

In allen 20 Proben konnte *S. mutans* nachgewiesen werden. Wobei die Zellzahlen in der Karies-Gruppe deutlich höher lagen als in der gesunden Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen und stimmen mit der Tatsache überein, das *S. mutans* auch in kariesfreien Individuen zu finden ist (*160*)(*29*). Interessanterweise war auch in allen Proben *S. wiggsiae* nachweisbar. In den kariösen Proben lagen die Werte mit einem Mittelwert von $1,7x10^4$ Zellen (Standardfehler $1,0x10^4$) nur knapp unterhalb der Zahlen von *S. mutans*. In den Proben der gesunden Probanden fielen die Zellzahlen mit einem Mittelwert von $3,1x10^1$ (SE $1,8x10^1$) deutlich geringer aus und lagen im unteren Bereich der Nachweisgrenze. Der Nachweis in gesunden Probanden ist überraschend und unterstreicht zunächst die allgemeine Bedeutung von *S. wiggsiae* bei der Entwicklung von Karies. Zusätzlich konnte *S. wiggsiae* auch vereinzelt in subgingivalem Biofilm aus Parodontitisproben nachgewiesen werden (die Daten dazu waren nicht Teil dieser Arbeit). Der Nachweis in subgingivaler Plaque ist damit ein Merkmal, das *S. wiggsiae* mit Mutans-Streptokokken teilt (*161*). *Bifidobacterium dentium* war hingegen nur in der Hälfte der Karies-Proben nachweisbar und dort in geringerem Umfang (MW $5,5x10^3$ Zellen, SE $2,9x10^3$) als die beiden anderen Spezies. In den Proben der gesunden Probanden konnte *B. dentium* nicht nachgewiesen werden. Die Abwesenheit von *B. dentium* in den Proben der

gesunden Probanden entspricht den Erwartungen und ist mit den bislang bekannten Ergebnissen durchaus vereinbar (*162*)(*163*).

Das Fazit der Pilotstudie ist, dass die Prävalenz für *S. wiggsiae* bei biofilmassoziierten Erkrankungen vermutlich höher ist als bislang angenommen. Während *B. dentium* vermutlich eher bei schweren Kariesläsionen zu finden ist (*30*). Auch wenn der geringe Probenumfang der Pilot-Studie eine allgemeine Aussage erschwert, zeigen unsere Ergebnisse, dass vor allem *S. wiggsiae* eine deutlich wichtigere Rolle im oralen Biofilm einnimmt als bislang angenommen. Da sich im Laufe der Karies-Entwicklung die Zusammensetzung der dominierenden Keime verschiebt ist es wahrscheinlich, dass *B. dentium* eher in schweren und tiefen Läsionen zu finden ist (*164*)(*30*). Durch seine azidogenen Eigenschaften ist *B. dentium* in der Lage bei sauren pH-Werten (<4,2), wie sie bei fortgeschrittenen Läsionen vorkommen, zu überleben und zur weiteren Demineralisierung des Zahnhartgewebes beizutragen (*165*)(*162*)(*166*)(*167*). Insgesamt gesehen könnten *S. wiggsiae* und *B. dentium* - ähnlich wie die Mutans-Streptokokken - als Indikator für die Aggressivität einer Karies dienen. Die kombinierte Quantifizierung der drei Erreger – *S. mutans*, *S. wiggsiae* und *B. dentium* – könnte damit in Zukunft eine bessere Grundlage für die Bestimmung des mikrobiellen Kariesrisikos bilden.

Ein Schwachpunkt der Pilot-Studie ist, neben dem geringen Probenumfang, die Auswahl der Kontrollproben. Als Kontrolle wurden subgingivale Sulkus-Proben von gesunden Probanden verwendet, die keine Karies aufwiesen. Aufgrund der anatomischen Lage, der Verfügbarkeit von niedermolekularen Kohlenhydraten, der Sauerstoffverhältnisse und der klinischen Situation sind diese Proben definitiv „anders“ als Karies-Proben. Um Vergleichsproben zu erhalten müssten Proben von vielen Probanden analysiert werden. Dafür müssten an unterschiedlichen Stellen supragingival Proben entnommen werden, ohne dabei die Flora bei der Probenentnahme zu beeinflussen. So könnten die Keime erfasst werden, die an einer späteren Kariesinitiation beteiligt sind. Dies war in dieser Form für die Pilot-Studie nicht durchführbar. Die logische Konsequenz der hier erzielten Resultate wäre die Durchführung einer umfangreicheren Folge-Studie zur Bestätigung unserer Ergebnisse. Eine solche Studie ist allerdings sehr aufwendig und wurde weltweit bislang nur vereinzelt in spezialisierten Zentren durchgeführt. Die enge Zusammenarbeit mit der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive

Zahnheilkunde ermöglicht den Zugang zur notwendigen Infrastruktur und bietet Potenzial für die Durchführung einer solchen Studie.

Alle Proben wurden mit Einverständnis der Probanden entnommen. Die Ethikkommision der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen hatte vorher die Zustimmung für die Entnahme anonymisierter oraler Proben gegeben. Die Ergebnisse wurden als Poster auf der DGHM-Tagung 2013 in Rostock veröffentlicht (PWP07).

4.7. Ausblick

Die im Rahmen der Arbeit erzielten Ergebnisse bilden eine gute Basis zur Erforschung weiterer interessanter Themen im Bereich der Karies-Ätiologie. In einer größer angelegten Studie, mit 50 bis 100 Patientenproben, könnte die Prävalenz von *S. wiggsiae* und *B. dentium* bei kariogenen Prozessen detaillierter untersucht werden. In enger Zusammenarbeit mit der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventiver Zahlheilkunde könnte eine prospektive, verblindete Hauptstudie durchgeführt werden, in der die tatsächliche Kariogenität der neuen „Karieserreger“ validiert wird. Parallel dazu sollte man die Wirkung von Carolacton auf *S. wiggsiae* und *B. dentium* testen. Hierbei könnte man den Effekt auf „single-species“-Biofilme und kombinierte „multi-species“-Biofilme *in vitro* sowie in *vivo* untersuchen. In diesem Zusammenhang müsste man überprüfen, was nach der Verdrängung der pathogenen Streptokokken durch eine Carolacton-Behandlung passiert. Kann es eventuell zur Ausbildung einer neuen, substituierenden kariogenen Flora kommen, die eine andere mikrobielle Zusammensetzung aufweist als vorher? Oder bildet sich eine neue Flora aus, die eventuell sogar probiotische Eigenschaften aufweist? Beide Optionen bieten viel Potential für die Weiterentwicklung der bislang beschriebenen Versuchsansätze.

Mit Hilfe der so gewonnenen Ergebnisse wäre man in der Lage eine Übersicht über das kariogene Mikrobiom zu erstellen. Des Weiteren könnte man mit Hilfe von vergleichenden Genomanalysen verschiedener Karieserreger eine speziesübergreifende Definition des kariogenen Core-Genoms („Kariom“) erstellen. Durch die Verknüpfung mit anderen diagnostischen Mitteln (z. B. Patienten-Anamnese, Befunderhebungsbögen, ParoCheck-Pathogenanalyse) könnte eine sehr detailliertere Diagnose - in Bezug auf das mikrobiologische Risiko der Mundflora – praktikabel sein, als es aktuell möglich ist.

Zusätzlich können die computergestützten Genomanalysen ausgeweitet werden, da fast wöchentlich neue Genomdaten zur Verfügung stehen. In diesem Zusammenhang wäre es von großem Interesse weitere Virulenzgene bei Streptokokken näher zu charakterisieren. Dabei wären besonders die Gene für die Säuretoleranz, die Adhäsion, die Sauerstofftoleranz und / oder die Gene für die Produktion extrazellulärer Polysaccharide von Bedeutung.

Alles in allem wurde durch die Arbeit eine solide Grundlage zur weiteren Erforschung der systembiologischen Aspekte bei Streptokokken sowie bei anderen kariogenen Bakterien geschaffen. Auch aus diesem Grunde hat das BMBF im August 2013 der Weiterführung unserer Verbundforschung im „e:Bio – Innovationswettbewerb Systembiologie“ (Modul II: Transfer von der Grundlagenforschung zu zahnmedizinischen Produkten) zugestimmt.

5. Zusammenfassung / Summary

Diese Dissertation umfasst mehrere systembiologische Aspekte des Karieserregers *Streptococcus mutans* sowie einiger eng verwandter Spezies. Die Versuche mit dem Biofilminhibitor Carolacton wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Christian Apel und Vera Heinz (Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, ZPP, Universitätsklinikum Aachen) durchgeführt und waren Bestandteil des BMBF geförderten Projektes BioInSys (im Rahmen des Programms „Medizinische Systembiologie – MedSys“). Im Hauptteil der Arbeit wurde erstmalig die *in vivo* Wirksamkeit von Carolacton untersucht. Carolacton ist eine im Nanomolbereich wirkende, biofilm-inhibierende Substanz aus Myxobakterien. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Karies- und Biofilm-Tiermodell in der Ratte (Stamm: Sprague-Dawley) mittels Vordesinfektion und nachfolgender Inokulation mit *S. mutans* etabliert. Dieses Modellsystem diente dann der Testung von Carolacton in verschiedenen Formulierungen (als Zahnlack, Wasserzusatz und Mundspülung). Während der Versuchsdauer erfolgte eine kontinuierliche Kontrolle der *S. mutans*-Zellzahlen mittels Nachweis durch real-time quantitative PCR (qPCR). Nach Versuchsende erfolgte die histologische Bestimmung der Karies-Inzidenz und -Progression. Der systembiologische Ansatz sollte helfen den genauen Wirkmechanismus von Carolacton aufzuklären, um anschließend seine Wirkung, z. B. durch Derivatisierung, gezielt verstärken zu können. Durch Inhibition des Biofilms mittels Carolacton sollte eine Reduktion der Kariesaktivität und Invasivität erreicht werden. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Zielsetzung (also weniger Zellzahlen und weniger Kariesläsionen bei Anwesenheit von Carolacton im Vergleich zur Kontrollgruppe) derzeit noch nicht erreichbar ist. Es konnten jedoch wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, die zur Optimierung zukünftiger Versuche dienen werden.

Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten systembiologischen Analysen umfassten hauptsächlich Two-Component Systems (TCS), Toxin-Antitoxin Systeme (TA-Systeme) sowie Teile des streptokokkalen Metaboloms. TCS sind zelluläre Systeme, die es Bakterien ermöglichen schnell auf verschiedene Umweltreize mittels Signalrezeptor und Reporteraktivierung zu reagieren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenität bzw. Virulenz. In umfangreichen computergestützten Genomanalysen konnten insgesamt 18 verschiedene TCS in unterschiedlichen *S. mutans* Stämmen (UA159, NN2025, 5DC8, KK21, KK23, AC4446, ATCC25175,

NCTC11060) sowie den eng verwandten Spezies *S. sobrinus* (DSM20742) und *S. ratti* (DSM20564) nachgewiesen werden. Die An- bzw. Abwesenheit einiger TCS kann erhebliche Auswirkungen auf die Pathogenität einzelner Stämme haben.

Weitere wichtige Virulenzfaktoren für Bakterien sind Plasmide und TA-Systeme. TA-Systeme bestehen (in der Regel) aus zwei Komponenten, einem stabilen Toxin und einem dazugehörigen labilen Antitoxin. Sie kommen chromosomal oder plasmidgebunden vor. Liegen TA-Systeme auf Plasmiden garantieren sie den Erhalt der Plasmide in den Tochterzellen, da Zellen ohne Plasmide die Fähigkeit zur Antitoxinproduktion verloren haben. Diese Zellen werden durch das maternale, stabile Toxin „vergiftet“ (post-segregational killing, PSK). Die parallele Bedeutung von TA-Systemen für die Zellen als Überlebensstrategie bei Nährstoffarmut ist hingegen (noch) umstritten. Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *S. mutans* Stämme DC09 und NC101 neben dem plasmidkodierten *relBE*-System noch über mindestens drei weitere chromosomale TA-Systeme verfügen. Darunter ein weiteres *relBE*-System sowie ein *mazEF*- und ein *hicBA*-System. Die Toxine aller drei Systeme sind mRNA-Endonukleasen, die an unterschiedlichen Stellen die mRNA spalten. Die Homologieanalyse mittels des Proteinprediction-Programms I-Tasser zeigte eindrucksvoll die strukturelle Gleichheit beider Komponenten ($relBE_{plas}$ und $relBE_{chrom}$) auf dreidimensionaler Proteinebene.

Des Weiteren wurde die Ab- bzw. Anwesenheit der Laktat-Oxidase in *S. mutans* und bei der nah verwandten Spezies *S. sobrinus* untersucht. Hier sollte vor allem die Bedeutung der Laktat-Oxidase für den (Energie-)Stoffwechsel und die Virulenz (Kariogenität) der Bakterien erforscht werden. Die Laktat-Oxidase ermöglicht die Umwandlung von Laktat zurück zu Pyruvat und letzten Endes die Bildung von Acetat unter Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP). Zusätzlich wird dabei auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) produziert, das ähnlich wie Bakteriozine Konkurrenzkeime hemmt. An mehr als 25 nah verwandten Stämmen von *S. mutans* (u. a. *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. mitis*) wurde die An- bzw. Abwesenheit der folgenden Enzyme im Rahmen eines umfassenden *in silico* Genomvergleichs überprüft: Laktat-Oxidase, Pyruvat-Oxidase, Pyruvat Dehydrogenase Komplex, Phosphatacetyl-Transferase und Acetat Kinase.

Da *S. mutans* nicht der einzige Karieserreger ist, wurde in dieser Dissertation die Prävalenz zweier weiterer mikrobiellen Säure- und Plaquebildner – *Scardovia wiggsiae* und *Bifidobacterium dentium* - bei Karies genauer untersucht.

Dazu wurden 10 Proben aus Kariesläsionen von Patienten sowie 10 Vergleichsproben von kariesfreien Probanden untersucht. Dazu wurde die Zellzahl von *S. mutans*, *S. wiggsiae* und *B. dentium* sowie die Gesamtzellzahl mittels publizierter und eigens für diese Arbeit entwickelter Primersysteme in der qPCR quantifiziert. Die Assoziation mit Karies war für *S. wiggsiae* dabei ähnlich hoch wie bei der Referenz *S. mutans,* während *B. dentium* immerhin in 50% der Kariesfälle - aber in keiner einzigen Vergleichsprobe - gefunden wurde. In Zukunft könnten mikrobiologische Tests zur Bestimmung des Kariesrisikos eine bessere Aussagekraft erzielen, wenn man diese drei Erregergruppen miteinbezieht.

Durch die Kombination aus altbewährten und modernen (speziell *in silico*) Methoden konnte ein tieferer Einblick in verschiedene systembiologische Aspekte von *Streptococcus mutans* erzielt werden. Auch wenn natives Carolacton in den bisherigen *in vivo* Experimenten keine signifikante Wirkung zeigte, so hat es sich mittlerweile als guter Kontaktwirkstoff in Kompositmaterialien herausgestellt. Die erfolgreiche Verwendung als Zusatzstoff in experimentellen Zahnfüllungsmaterialien und die damit verbundene Perspektive eine ganze Generation von neuen zahnmedizinischen Produkten zu entwickeln, führte zu einer Verlängerung der BMBF-Förderung im „e:Bio-Innovationswettbewerb Systembiologie“ (Modul II - Transfer von der Grundlagenforschung zu zahnmedizinischen Produkten). Die hier etablierten Methoden und Erkenntnisse unterstützten vier Publikationen, zahlreiche Kongressbeiträge, eine Patentanmeldung und die Akquise erheblicher Drittmittel.

5. Summary

This doctoral thesis includes several aspects of systems biology referring to the caries-causing pathogen *Streptococcus mutans* and some closely related species.
The experiments based on the biofilm inhibitor carolacton were carried out in cooperation with Prof. Dr. Christian Apel and Vera Heinz (Department of Operative and Preventive Dentistry & Periodontology, RWTH Aachen University Hospital) and were supported by the BMBF project BioInSys (within the framework of the "Medical systems biology – MedSys programme"). One main part of this thesis addressed for the first time the *in vivo* effect of carolacton, a biofilm inhibiting substance from Myxobacteria which is effective at nanomolar concentration. To this end we established a new caries und biofilm rat model (type Sprague Dawley) via disinfection of the rat's mouth following inoculation with *S. mutans*. This model system was subsequently used for measuring the effect of carolacton in different formulations (varnish, water add on und mouth rinses). During the test duration we performed real-time quantitative PCR (qPCR) for monitoring the total cell count of *S. mutans*. At the end of the test we performed histological determination of the caries incidence and progression. The systems biological approach should help to clear the detailed mode of action of carolacton as a requirement for a directed derivatization to increase its efficiency. By inhibiting the biofilm we expected a reduction of cariogenic activity and invasiveness. The results showed that the aim (less cell count and less cariogenic lesions than the control group) could not be achieved yet. But we received important knowledge to optimise prospective experiments.
The systems biology analyses carried out during this work covered Two Component Systems (TCS), Toxin-Antitoxin Systems (TA systems) as well as parts of the streptococcal metabolome. TCS are cellular systems composed of a histidin kinase and a response regulator. They allow bacteria to detect environmental stimuli via the receptor kinase and respond to the signal by activating the corresponding response regulator. TCS play an important role during pathogenicity and virulence. Performing extensive computer based genome analyses we found 18 different TCS in the *S. mutans* strains (UA159, NN2520, 5DC8, KK21, KK23, AC4446, ATCC25175, NCTC11060) as well as in the closely related species *S. sobrinus* (DSM20742) and

S. ratti (DSM20564). The presence and absence of different TCS can have considerable consequences for the pathogenicity of individual strains.

Other important virulence factors in bacteria are plasmids and TA systems. TA systems are generally made of two components including a stable toxin and a corresponding instable antitoxin. TA systems can be found on plasmids or chromosomally. Plasmid encoded TA systems ensure the dispersal of plasmids within a population via post-segregational killing (PSK) of plasmid negative progenies. Their parallel importance as survival strategy during starvation remains unclear. In this doctoral thesis we showed that the *S. mutans* strains DC09 and NC101 possess at least three chromosomally encoded TA systems apart from one plasmid encoded *relBE*-system. Among the chromosomally encoded systems we found another *relBE*-system as well as a *mazEF*-system and a *hicBA*-system. All three corresponding toxins are mRNA endonucleases. We could show the structural homology on three-dimensional protein level of both systems ($relBE_{plas}$ and $relBE_{chrom}$) based on the protein structure prediction model I-Tasser.

Furthermore we investigated the absence and presence of lactate oxidases in *S. mutans* and its closely related species *S. sobrinus*. We did this to elucidate the importance of lactate oxidases for (energy-) metabolism und virulence (cariogenicity). The lactate oxidase facilitates the conversion from lactate back to pyruvate and acetate producing additional adenosine triphosphate (ATP). Simultaneously hydrogen peroxide (H_2O_2) is produced which is able to inhibit competitive microbes similar as bacteriocins. Additionally we tested more than 25 closely related species (amongst others *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, and *S. mitis*) in an extensive *in silico* genome comparison for the absence and presence of the subsequent enzymes: lactate oxidase, pyruvate oxidase, pyruvate dehydrogenase complex, phosphate acetyltransferase and acetate kinase.

As *S. muta*ns is not the only caries agent, the prevalence of the two acid and dental plaque causative organisms – *Scardovia wiggsiae* and *Bifidobacterium dentium* – was also tested in caries. For this purpose we investigated 10 samples from caries patients as well as 10 reference specimen from volunteers using published and newly designed primer systems (incl. qPCR). The prevalence of *S. wiggsiae* was as high as for the reference *S. mutans*, while *B. dentium* was found only in 50% of all caries samples but not in a single reference sample. In future, the combination of all

three causative organisms in microbiological caries risk tests could increase the predictive value.

By the use of well-established and modern (especially *in silico*) methods we could achieve a profound insight in different systems biological aspects of *S. mutans*. Even though the native carolacton showed no significant effect in the previous *in vivo* experiments, it has been established as an active ingredient in dental composite materials meanwhile. The successful application as additive in experimental teeth restoration and the subsequent perspective of developing a new generation of dental materials led to the extension of the BMBF sponsorship in “e:bio-Innovations-wettbewerb Systembiologie“ (Modul II - transfer of fundamental research to dental products). The hereby established methods and given insights supported four publications, numerous congress-associated articles, one patent application and the acquisition of extensive third-party funds.

6. Literatur

1. T. D. Brock, J. M. Martinko, M. T. Madigan, *Brock Mikrobiologie* (Pearson Studium, 11. Auflage., 2006).

2. J. M. Tanzer, Dental Caries is a Transmissible Infectious Disease: The Keyes and Fitzgerald Revolution, *J. Dent. Res.* **74**, 1536–1542 (1995).

3. R. J. Fitzgerald, H. V. Jordan, H. R. Stanley, Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat, *J. Dent. Res.* **39**, 923–935 (1960).

4. F. J. Orland *et al.*, Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms, *J. Dent. Res.* **33**, 147–174 (1954).

5. W. D. Miller, *The micro-organisms of the human mouth : the local and general diseases which are caused by them* (Karger, 1890).

6. H. Meyer-Lückel, S. Paris, K. Ekstrand, *Karies: Wissenschaft und Klinische Praxis* (Thieme, Stuttgart, 1. Auflage., 2012).

7. W. J. Loesche, Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease (1996) (available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8259/).

8. P. Marsh, M. Martin, *Oral Microbiology* (Chapman & Hall, 3. Auflage., 1992).

9. W. J. Loesche, Role of Streptococcus mutans in human dental decay, *Microbiol. Rev.* **50**, 353–380 (1986).

10. C. H. Splieth, S. Fleßa, Modelling lifelong costs of caries with and without fluoride use, *Eur. J. Oral Sci.* **116**, 164–169 (2008).

11. WHO, WHO | Oral health*WHO* (2013) (available at http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/index.html).

12. H. Hahn, S. H. E. Kaufmann, T. F. Schulz, S. Suerbaum, *Medizinische Mikribiologie und Infektiologie* (Springer Medizin Verlag, 6. Auflage., 2009).

13. R. Pink *et al.*, Saliva as a diagnostic medium, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czechoslov.* **153**, 103–110 (2009).

14. N. Parahitiyawa *et al.*, Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions, *Oral Dis.* **16**, 136–145 (2010).

15. L. Sbordone, C. Bortolaia, Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease, *Clin. Oral Investig.* **7**, 181–188 (2003).

16. E. Könönen, Development of oral bacterial flora in young children, *Ann. Med.* **32**, 107–112 (2000).

17. C. McCarthy, M. L. Snyder, R. B. Parker, The Indigenous Oral Flora of Man. I. The Newborn to the 1-Year-Old Infant, *Arch. Oral Biol.* **10**, 61–70 (1965).

18. G. Suchett-Kaye, D. Décoret, O. Barsotti, Intra-familial distribution of Fusobacterium nucleatumstrains in healthy families with optimal plaque control, *J. Clin. Periodontol.* **26**, 401–404 (1999).

19. I. R. Emanuelsson, Y. Li, D. Bratthall, Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families, *Oral Microbiol. Immunol.* **13**, 271–277 (1998).

20. T. J. van Steenbergen, C. J. Bosch-Tijhof, M. D. Petit, U. Van der Velden, Intra-familial transmission and distribution of Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens, *J. Periodontal Res.* **32**, 345–350 (1997).

21. H. F. Jenkinson, Beyond the oral microbiome, *Environ. Microbiol.* **13**, 3077–3087 (2011).

22. F. E. Dewhirst *et al.*, The Human Oral Microbiome, *J. Bacteriol.* **192**, 5002–5017 (2010).

23. T. K. Fábián, P. Fejérdy, P. Csermely, Salivary Genomics, Transcriptomics and Proteomics: The Emerging Concept of the Oral Ecosystem and their Use in the Early Diagnosis of Cancer and other Diseases, *Curr. Genomics* **9**, 11–21 (2008).

24. M. V. Sizova *et al.*, New Approaches for Isolation of Previously Uncultivated Oral Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 194–203 (2012).

25. B. J. Paster *et al.*, Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque, *J. Bacteriol.* **183**, 3770–3783 (2001).

26. T. Chen *et al.*, The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information, *Database* **2010**, baq013–baq013 (2010).

27. O. Fejerskov, Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care, *Caries Res.* **38**, 182–191 (2004).

28. C. G. Emilson, B. Krasse, Support for and implications of the specific plaque hypothesis, *Scand. J. Dent. Res.* **93**, 96–104 (1985).

29. N. Takahashi, B. Nyvad, Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process, *Caries Res.* **42**, 409–418 (2008).

30. J. A. Aas *et al.*, Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults, *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1407–1417 (2008).

31. G. H. Bowden, Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals?, *Community Dent. Oral Epidemiol.* **25**, 76–81 (1997).

32. P. D. Marsh, Are dental diseases examples of ecological catastrophes?, *Microbiology* **149**, 279–294 (2003).

33. P. D. Marsh, Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease, *Adv. Dent. Res.* **8**, 263–271 (1994).

34. P. D. Marsh, Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque, *Proc. Finn. Dent. Soc. Suom. Hammaslääkäriseuran Toim.* **87**, 515–525 (1991).

35. A. C. R. Tanner *et al.*, White-spot Lesions and Gingivitis Microbiotas in Orthodontic Patients, *J. Dent. Res.* **91**, 853–858 (2012).

36. J. Downes *et al.*, Scardovia wiggsiae sp. nov., isolated from the human oral cavity and clinical material, and emended descriptions of the genus Scardovia and Scardovia inopinata, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 25–29 (2011).

37. A. C. R. Tanner *et al.*, Cultivable Anaerobic Microbiota of Severe Early Childhood Caries, *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1464–1474 (2011).

38. L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, *Stryer Biochemie* (Elsevier - Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage., 2007).

39. R. Facklam, What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes, *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 613–630 (2002).

40. O. E. Cornejo *et al.*, Evolutionary and Population Genomics of the Cavity Causing Bacteria Streptococcus mutans, *Mol. Biol. Evol.* (2012), doi:10.1093/molbev/mss278.

41. L. Song *et al.*, Genetic variability of mutans streptococci revealed by wide whole-genome sequencing, *BMC Genomics* **14**, 430 (2013).

42. M. S. Hossain, I. Biswas, Mutacins from Streptococcus mutans UA159 Are Active against Multiple Streptococcal Species, *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2428–2434 (2011).

43. S. Alaluusua, T. Takei, T. Ooshima, S. Hamada, Mutacin activity of strains isolated from children with varying levels of mutants streptococci and caries, *Arch. Oral Biol.* **36**, 251–255 (1991).

44. Y. Kawamura, X.-G. Hou, F. Sultana, H. Miura, T. Ezaki, Determination of 16s rRNA Sequences of Streptococcus mitis and Streptococcus gordonii and Phylogenetic Relationships among Members of the Genus Streptococcus, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 406–408 (1995).

45. C. D. Doern, C.-A. D. Burnham, It's Not Easy Being Green: the Viridans Group Streptococci, with a Focus on Pediatric Clinical Manifestations, *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3829–3835 (2010).

46. M. Ventura *et al.*, Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 495–548 (2007).

47. W. Jian, X. Dong, Transfer of Bifidobacterium inopinatum and Bifidobacterium denticolens to Scardovia inopinata gen. nov., comb. nov., and Parascardovia denticolens gen. nov., comb. nov., respectively., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 809–812 (2002).

48. F. Crociani, B. Biavati, A. Alessandrini, C. Chiarini, V. Scardovi, Bifidobacterium inopinatum sp. nov. and Bifidobacterium denticolens sp. nov., Two New Species Isolated from Human Dental Caries, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 564–571 (1996).

49. V. Scardovi, F. Crociani, Bifidobacterium catenulatum, Bifidobacterium dentium, and Bifidobacterium angulatum: Three New Species and Their Deoxyribonucleic Acid Homology Relationships, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**, 6–20 (1974).

50. W. G. Wade, The oral microbiome in health and disease, *Pharmacol. Res.* **69**, 137–143 (2013).

51. L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, P. Stoodley, Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases, *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004).

52. M. Hentzer, M. Givskov, Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections, *J. Clin. Invest.* **112**, 1300–1307 (2003).

53. B. Rasmussen, Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit, *Nature* **405**, 676–679 (2000).

54. R. Jansen *et al.*, Carolacton - A Macrolide Ketocarbonic Acid that Reduces Biofilm Formation by the Caries- and Endocarditis-Associated Bacterium Streptococcus mutans, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1284–1289 (2010).

55. K.-G. Chan *et al.*, Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the Zingiber officinale (ginger) rhizosphere: Co-existence of quorum quenching and quorum sensing in Acinetobacter and Burkholderia, *BMC Microbiol.* **11**, 51 (2011).

56. P. Williams, K. Winzer, W. C. Chan, M. Camara, Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **362**, 1119–1134 (2007).

57. Y.-H. Dong, L.-H. Wang, L.-H. Zhang, Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **362**, 1201–1211 (2007).

58. B. Kunze *et al.*, Damage of Streptococcus mutans biofilms by carolacton, a secondary metabolite from the myxobacterium Sorangium cellulosum, *BMC Microbiol.* **10**, 199 (2010).

59. D. M. Livermore, The need for new antibiotics, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10 Suppl 4**, 1–9 (2004).

60. L.-H. Zhang, Y.-H. Dong, Quorum sensing and signal interference: diverse implications, *Mol. Microbiol.* **53**, 1563–1571 (2004).

61. M. Cámara, P. Williams, A. Hardman, Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk, *Lancet Infect. Dis.* **2**, 667–676 (2002).

62. T. R. de Kievit, B. H. Iglewski, Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships, *Infect. Immun.* **68**, 4839–4849 (2000).

63. H.-S. Joo, M. Otto, Molecular Basis of In Vivo Biofilm Formation by Bacterial Pathogens, *Chem. Biol.* **19**, 1503–1513 (2012).

64. K. M. D. Parsa *et al.*, Demonstration of Bacterial Biofilms in Culture-Negative Silicone Stent and Jones Tube, *Ophthalmic Plast. Reconstr. Surg. NovemberDecember 2010* **26**, 426–430 (2010).

65. J. C. Carvalho, K. R. Ekstrand, A. Thylstrup, Dental plaque and caries on occlusal surfaces of first permanent molars in relation to stage of eruption, *J. Dent. Res.* **68**, 773–779 (1989).

66. BASF, pro-t-action (2013) (available at http://www.basf.com/group/corporate/de_DE/innovations/research/innovation/innovative-solutions/pro-t-action).

67. H. C. Margolis, E. C. Moreno, B. J. Murphy, Effect of low levels of fluoride in solution on enamel demineralization in vitro, *J. Dent. Res.* **65**, 23–29 (1986).

68. I. Mohamed Hamouda, Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials, *J. Biomed. Res.* **26**, 143–151 (2012).

69. B. Spellberg *et al.*, The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **46**, 155–164 (2008).

70. J. D. Siegel, E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello, Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006, *Am. J. Infect. Control* **35**, S165–S193 (2007).

71. H. W. Boucher *et al.*, Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1–12 (2009).

72. J. Schmitz, Carolacton – ein hochwirksamer Inhibitor von Biofilmen, *Pharm. Unserer Zeit* **41**, 271–271 (2012).

73. T. Schmidt, A. Kirschning, Totalsynthese von Carolacton, einem hochwirksamen Inhibitor von Biofilmen, *Angew. Chem.* **124**, 1087–1091 (2012).

74. S. Schneiker *et al.*, Complete genome sequence of the myxobacterium Sorangium cellulosum, *Nat. Biotechnol.* **25**, 1281–1289 (2007).

75. D. Ajdić *et al.*, Genome sequence of Streptococcus mutans UA159, a cariogenic dental pathogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14434–14439 (2002).

76. S. C. Wenzel, R. Müller, The biosynthetic potential of myxobacteria and their impact in drug discovery, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **12**, 220–230 (2009).

77. H. Reichenbach, Myxobacteria, producers of novel bioactive substances, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 149–156 (2001).

78. M. Reck *et al.*, The biofilm inhibitor carolacton disturbs membrane integrity and cell division of Streptococcus mutans through the serine/threonine protein kinase PknB, *J. Bacteriol.* **193**, 5692–5706 (2011).

79. L. Song *et al.*, A genome-wide study of two-component signal transduction systems in eight newly sequenced mutans streptococci strains, *BMC Genomics* **13**, 128 (2012).

80. A. Dmitriev *et al.*, CovR-controlled Global Regulation of Gene Expression in Streptococcus mutans, *PloS One* **6**, e20127 (2011).

81. J. A. Hoch, Two-component and phosphorelay signal transduction, *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–170 (2000).

82. A. M. Stock, V. L. Robinson, P. N. Goudreau, Two-Component Signal Transduction, *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215 (2000).

83. I. Biswas, L. Drake, D. Erkina, S. Biswas, Involvement of Sensor Kinases in the Stress Tolerance Response of Streptococcus mutans, *J. Bacteriol.* **190**, 68–77 (2008).

84. C. M. Levesque *et al.*, Systemic inactivation and phenotypic characterization of two-component systems in expression of Streptococcus mutans virulence properties, *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 398–404 (2007).

85. C. Fabret, V. A. Feher, J. A. Hoch, Two-Component Signal Transduction in Bacillus subtilis: How One Organism Sees Its World, *J. Bacteriol.* **181**, 1975–1983 (1999).

86. G. M. Dunny, N. Birch, G. Hascall, D. B. Clewell, Isolation and Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid from Streptococcus mutans, *J. Bacteriol.* **114**, 1362–1364 (1973).

87. X. Zhou, P. W. Caufield, Y. Li, F. Qi, Complete Nucleotide Sequence and Characterization of pUA140, a Cryptic Plasmid from Streptococcus mutans, *Plasmid* **46**, 77–85 (2001).

88. H. H. Murchison, J. F. Barrett, G. A. Cardineau, R. Curtiss, Transformation of Streptococcus mutans with chromosomal and shuttle plasmid (pYA629) DNAs., *Infect. Immun.* **54**, 273–282 (1986).

89. F. L. Macrina, J. L. Reider, S. S. Virgili, D. J. Kopecko, Survey of the extrachromosomal gene pool of Streptococcus mutans., *Infect. Immun.* **17**, 215–226 (1977).

90. A. Rheinberg, I. J. Swierzy, T. D. Nguyen, H.-P. Horz, G. Conrads, Cryptic Streptococcus mutans 5.6-kb plasmids encode a toxin-antitoxin system for plasmid stabilization, *J. Oral Microbiol.* **5** (2013), doi:10.3402/jom.v5i0.19729.

91. I. J. Swierzy, thesis, RWTH Aachen, Aachen (2010).

92. H. Lehnherr, E. Maguin, S. Jafri, M. B. Yarmolinsky, Plasmid Addiction Genes of Bacteriophage P1: doc, which Causes Cell Death on Curing of Prophage, and phd, which Prevents Host Death when Prophage is Retained, *J. Mol. Biol.* **233**, 414–428 (1993).

93. Y. Yamaguchi, M. Inouye, Regulation of growth and death in Escherichia coli by toxin–antitoxin systems, *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 779–790 (2011).

94. D. P. Pandey, K. Gerdes, Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes, *Nucleic Acids Res.* **33**, 966–976 (2005).

95. K. Gerdes, S. K. Christensen, A. Løbner-Olesen, Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci, *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 371–382 (2005).

96. J. A. C. Lemos, T. A. Brown, J. Abranches, R. A. Burne, Characteristics of Streptococcus mutans strains lacking the MazEF and RelBE toxin–antitoxin modules, *FEMS Microbiol. Lett.* **253**, 251–257 (2005).

97. E. Aizenman, H. Engelberg-Kulka, G. Glaser, An Escherichia coli chromosomal “addiction module” regulated by guanosine [corrected] 3’,5’-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6059–6063 (1996).

98. L. Van Melderen, M. Saavedra De Bast, Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities?, *PLoS Genet.* **5**, e1000437 (2009).

99. R. D. Magnuson, Hypothetical Functions of Toxin-Antitoxin Systems, *J. Bacteriol.* **189**, 6089–6092 (2007).

100. A. Gibello, M. D. Collins, L. Domínguez, J. F. Fernández-Garayzábal, P. T. Richardson, Cloning and Analysis of the l-Lactate Utilization Genes from Streptococcus iniae, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4346–4350 (1999).

101. S. S. Baron, Ed., *Medical Microbiology* (University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX), ed. 4th, 1996).

102. Y. Shibata *et al.*, Analysis of Loci Required for Determination of Serotype Antigenicity in Streptococcus mutans and Its Clinical Utilization, *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4107–4112 (2003).

103. A. L. Coykendall, Streptococcus sobrinus nom. rev. and Streptococcus ferus nom. rev.: Habitat of These and Other Mutans Streptococci, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 883–885 (1983).

104. D. Bratthall, Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling Streptococcus mutans, *Odontol. Revy* **21**, 143–152 (1970).

105. P. H. Keyes, Dental Caries in the Molar Teeth of Rats: II. a Method for Diagnosing and Scoring Several Types of Lesions Simultaneously, *J. Dent. Res.* **37**, 1088–1099 (1958).

106. J. M. Tanzer, *Animal models in cariology* (Information Retrieval Inc., 1981).

107. J. K. Kondo, L. L. McKay, Mutanolysin for Improved Lysis and Rapid Protoplast Formation in Dairy Streptococci, *J. Dairy Sci.* **65**, 1428–1431 (1982).

108. S. Hamada *et al.*, Lysis of Streptococcus mutans cells with mutanolysin, a lytic enzyme prepared from a culture liquor of Streptomyces globisporus 1829, *Arch. Oral Biol.* **23**, 543–549 (1978).

109. A. Rheinberg, I. J. Swierzy, T. D. Nguyen, H.-P. Horz, G. Conrads, Cryptic Streptococcus mutans 5.6-kb plasmids encode a toxin-antitoxin system for plasmid stabilization, *J. Oral Microbiol.* **5** (2013), doi:10.3402/jom.v5i0.19729.

110. J. Guglielmini, L. Van Melderen, Bacterial toxin-antitoxin systems: Translation inhibitors everywhere, *Mob. Genet. Elem.* **1**, 283–290 (2011).

111. A. C. R. Tanner *et al.*, Microbiota of Severe Early Childhood Caries before and after Therapy, *J. Dent. Res.* **90**, 1298–1305 (2011).

112. M. A. Weinberg, M. Bral, Laboratory animal models in periodontology, *J. Clin. Periodontol.* **26**, 335–340 (1999).

113. J. M. Tanzer, A. M. Thompson, L. P. Grant, M. M. Vickerman, F. A. Scannapieco, Streptococcus gordonii's Sequenced Strain CH1 Glucosyltransferase Determines Persistent But Not Initial Colonization of Teeth of Rats, *Arch. Oral Biol.* **53**, 133–140 (2008).

114. J. M. Tanzer, L. K. Baranowski, J. D. Rogers, E. M. Haase, F. A. Scannapieco, Oral colonization and cariogenicity of Streptococcus gordonii in specific pathogen-free TAN:SPFOM(OM)BR rats consuming starch or sucrose diets, *Arch. Oral Biol.* **46**, 323–333 (2001).

115. V. Idone *et al.*, Effect of an Orphan Response Regulator on Streptococcus mutans Sucrose-Dependent Adherence and Cariogenesis, *Infect. Immun.* **71**, 4351–4360 (2003).

116. J. M. Tanzer, A. B. Kurasz, J. Clive, Competitive displacement of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by Streptococcus salivarius TOVE-R., *Infect. Immun.* **48**, 44–50 (1985).

117. S. M. Michalek, J. R. McGhee, J. M. Navia, Virulence of Streptococcus mutans: a sensitive method for evaluating cariogenicity in young gnotobiotic rats., *Infect. Immun.* **12**, 69–75 (1975).

118. T. Thurnheer, E. Giertsen, R. Gmür, B. Guggenheim, Cariogenicity of soluble starch in oral in vitro biofilm and experimental rat caries studies: a comparison, *J. Appl. Microbiol.* **105**, 829–836 (2008).

119. M. Mitoma *et al.*, Passive Immunization with Bovine Milk Containing Antibodies to a Cell Surface Protein Antigen-Glucosyltransferase Fusion Protein Protects Rats against Dental Caries, *Infect. Immun.* **70**, 2721–2724 (2002).

120. K. M. Chang *et al.*, Tetracyclines inhibit Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in rats by a non-antimicrobial mechanism, *J. Periodontal Res.* **29**, 242–249 (1994).

121. W. H. Bowen, K. M. Madison, S. K. Pearson, Influence of Desalivation in Rats on Incidence of Caries in Intact Cagemates, *J. Dent. Res.* **67**, 1316–1318 (1988).

122. N. S. Jakubovics, N. Strömberg, C. J. Van Dolleweerd, C. G. Kelly, H. F. Jenkinson, Differential binding specificities of oral streptococcal antigen I/II family adhesins for human or bacterial ligands, *Mol. Microbiol.* **55**, 1591–1605 (2005).

123. C. W. Douglas, Bacterial-protein interactions in the oral cavity, *Adv. Dent. Res.* **8**, 254–262 (1994).

124. K. Wennerholm, C.-G. Emilson, Comparison of Saliva-Check Mutans and Saliva-Check IgA Mutans with the Cariogram for caries risk assessment, *Eur. J. Oral Sci.* **121**, 389–393 (2013).

125. D. Bratthall, G. Hänsel Petersson, Cariogram – a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease, *Community Dent. Oral Epidemiol.* **33**, 256–264 (2005).

126. K. Pienihäkkinen, J. Jokela, P. Alanen, Assessment of Caries Risk in Preschool Children, *Caries Res.* **38**, 156–162 (2004).

127. B. Kunze *et al.*, Damage of Streptococcus mutans biofilms by carolacton, a secondary metabolite from the myxobacterium Sorangium cellulosum, *BMC Microbiol.* **10**, 199 (2010).

128. J. D. Bader, G. Rozier, R. Harris, K. N. Lohr, Introduction (2004) (available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK43254/#A33576).

129. J. D. Featherstone, The science and practice of caries prevention, *J. Am. Dent. Assoc. 1939* **131**, 887–899 (2000).

130. F. A. Arnold, H. T. Dean, J. W. Knutson, Effect of fluoridated public water supplies on dental caries prevalence, *Public Health Rep.* **68**, 141–148 (1953).

131. C. . Tabchoury, T. Holt, S. . Pearson, W. . Bowen, The effects of fluoride concentration and the level of cariogenic challenge on caries development in desalivated rats, *Arch. Oral Biol.* **43**, 917–924 (1998).

132. L. Zeng, S. Das, R. A. Burne, Genetic Analysis of the Functions and Interactions of Components of the LevQRST Signal Transduction Complex of Streptococcus mutans, *PloS One* **6**, e17335 (2011).

133. Y. Liu, R. A. Burne, Multiple Two-Component Systems of Streptococcus mutans Regulate Agmatine Deiminase Gene Expression and Stress Tolerance, *J. Bacteriol.* **191**, 7363–7366 (2009).

134. L. Song *et al.*, A genome-wide study of two-component signal transduction systems in eight newly sequenced mutans streptococci strains, *BMC Genomics* **13**, 128 (2012).

135. L. Zeng, R. A. Burne, Comprehensive Mutational Analysis of Sucrose-Metabolizing Pathways in Streptococcus mutans Reveals Novel Roles for the Sucrose Phosphotransferase System Permease, *J. Bacteriol.* **195**, 833–843 (2013).

136. J. R. van der Ploeg, Regulation of Bacteriocin Production in Streptococcus mutans by the Quorum-Sensing System Required for Development of Genetic Competence, *J. Bacteriol.* **187**, 3980–3989 (2005).

137. Y.-H. Li *et al.*, A Quorum-Sensing Signaling System Essential for Genetic Competence in Streptococcus mutans Is Involved in Biofilm Formation, *J. Bacteriol.* **184**, 2699–2708 (2002).

138. L. Van Melderen, M. Saavedra De Bast, Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities?, *PLoS Genet.* **5**, e1000437 (2009).

139. E. Maisonneuve, L. J. Shakespeare, M. G. Jørgensen, K. Gerdes, Bacterial Persistence by RNA Endonucleases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13206–13211 (2011).

140. S. K. Christensen, K. Gerdes, RelE toxins from Bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA, *Mol. Microbiol.* **48**, 1389–1400 (2003).

141. K. Gerdes, S. K. Christensen, A. Løbner-Olesen, Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci, *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 371–382 (2005).

142. M. Yang, C. Gao, Y. Wang, H. Zhang, Z.-G. He, Characterization of the Interaction and Cross-Regulation of Three Mycobacterium tuberculosis RelBE Modules, *PLoS ONE* **5** (2010), doi:10.1371/journal.pone.0010672.

143. V. Leung, C. M. Lévesque, A Stress-Inducible Quorum-Sensing Peptide Mediates the Formation of Persister Cells with Noninherited Multidrug Tolerance, *J. Bacteriol.* **194**, 2265–2274 (2012).

144. L. Van Melderen, Toxin–antitoxin systems: why so many, what for?, *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 781–785 (2010).

145. T. F. Cooper, T. Paixão, J. A. Heinemann, Within-host competition selects for plasmid-encoded toxin–antitoxin systems, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **277**, 3149–3155 (2010).

146. T. F. Cooper, J. A. Heinemann, Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12643–12648 (2000).

147. T. Naito, K. Kusano, I. Kobayashi, Selfish behavior of restriction-modification systems, *Science* **267**, 897–899 (1995).

148. J. J. Williams, P. J. Hergenrother, Artificial activation of toxin–antitoxin systems as an antibacterial strategy, *Trends Microbiol.* **20**, 291–298 (2012).

149. H. Tong *et al.*, Streptococcus oligofermentans inhibits Streptococcus mutans through conversion of lactic acid into inhibitory H2O2: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition, *Mol. Microbiol.* **63**, 872–880 (2007).

150. C. S. Ryan, I. Kleinberg, Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide, *Arch. Oral Biol.* **40**, 753–763 (1995).

151. H. Ma, A.-P. Zeng, Reconstruction of metabolic networks from genome data and analysis of their global structure for various organisms, *Bioinforma. Oxf. Engl.* **19**, 270–277 (2003).

152. L. Liu, H. Tong, X. Dong, Function of the Pyruvate Oxidase-Lactate Oxidase Cascade in Interspecies Competition between Streptococcus oligofermentans and Streptococcus mutans, *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2120–2127 (2012).

153. R. Kaur, S. C. Gilbert, E. C. Sheehy, D. Beighton, Salivary levels of Bifidobacteria in caries-free and caries-active children, *Int. J. Paediatr. Dent.* **23**, 32–38 (2013).

154. D. Beighton *et al.*, Isolation and Identification of Bifidobacteriaceae from Human Saliva, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6457–6460 (2008).

155. M. Ventura *et al.*, The Bifidobacterium dentium Bd1 Genome Sequence Reflects Its Genetic Adaptation to the Human Oral Cavity, *PLoS Genet.* **5** (2009), doi:10.1371/journal.pgen.1000785.

156. M. Mantzourani *et al.*, The Isolation of Bifidobacteria from Occlusal Carious Lesions in Children and Adults, *Caries Res.* **43**, 308–313 (2009).

157. M. Mantzourani, M. Fenlon, D. Beighton, Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions, *Oral Microbiol. Immunol.* **24**, 32–37 (2009).

158. A. Yano, N. Kaneko, H. Ida, T. Yamaguchi, N. Hanada, Real-time PCR for quantification of Streptococcus mutans, *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 23–30 (2002).

159. M. A. Nadkarni, F. E. Martin, N. A. Jacques, N. Hunter, Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set, *Microbiology* **148**, 257–266 (2002).

160. A. Tahmourespour, A. Nabinejad, H. Shirian, N. Ghasemipero, The Comparison of Proteins Elaborated by Streptococcus mutans Strains Isolated from Caries Free and Susceptible Subjects, *Iran. J. Basic Med. Sci.* **16**, 656–660 (2013).

161. C. R. de A. Estrela, F. C. Pimenta, A. H. G. de Alencar, L. F. N. Ruiz, C. Estrela, Detection of selected bacterial species in intraoral sites of patients with chronic periodontitis using multiplex polymerase chain reaction, *J. Appl. Oral Sci. Rev. FOB* **18**, 426–431 (2010).

162. M. Mantzourani, M. Fenlon, D. Beighton, Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions, *Oral Microbiol. Immunol.* **24**, 32–37 (2009).

163. J. A. Aas, B. J. Paster, L. N. Stokes, I. Olsen, F. E. Dewhirst, Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity, *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5721–5732 (2005).

164. N. Takahashi, B. Nyvad, The Role of Bacteria in the Caries Process Ecological Perspectives, *J. Dent. Res.* **90**, 294–303 (2011).

165. M. Ventura *et al.*, The Bifidobacterium dentium Bd1 Genome Sequence Reflects Its Genetic Adaptation to the Human Oral Cavity, *PLoS Genet.* **5** (2009), doi:10.1371/journal.pgen.1000785.

166. S. R. Brailsford *et al.*, The Predominant Aciduric Microflora of Root-caries Lesions, *J. Dent. Res.* **80**, 1828–1833 (2001).

167. J. van Houte, J. Lopman, R. Kent, The Final pH of Bacteria Comprising the Predominant Flora on Sound and Carious Human Root and Enamel Surfaces, *J. Dent. Res.* **75**, 1008–1014 (1996).

168. Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinformatics* **9**, 40 (2008).

169. A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat. Protoc.* **5**, 725–738 (2010).

170. Y. Shao *et al.*, TADB: a web-based resource for Type 2 toxin–antitoxin loci in bacteria and archaea, *Nucleic Acids Res.* **39**, D606–D611 (2011).

7. Anhang

7.1. Verwendete Materialien

7.1.1. Verwendete Chemikalien und Kits

Tabelle 23: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Kits sowie deren Hersteller

Chemikalie / Kit	**Hersteller**
Agarose	Merck, Darmstadt
Ambion® DNase freies Wasser	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Augmentan (Amoxicillin-Clavulan)	Aliud Pharma, Laichingen
Basisches Fuchsin	Merck, Darmstadt
BHI-Medium/-Bouillon	Heipha Diagnostika, Heidelberg
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Carolacton	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig
Cryobank™	Mast Diagnostica, Rheinfeld
Deoxynucleoside Triphosphate Set	Roche, Mannheim
Difco™ Columbia Blood Agar Base	Oxoid, Wesel
Domitor	Pfizer, Karlsruhe
DyeEx® 2.0 Spin Kit (250)	Qiagen, Hilden
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol (absolut, p.A.)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (0,025%)	Roth, Karlsruhe
Fluoretten®	Sanofi-Aventis, Frankfurt (a. M.)
Forene® (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden
Formaldehyd (4%, neutral gepuffert)	Roth, Karlsruhe
Gramfärbe-Kit	Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Darmstadt
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Ketamin (10%)	Ceva, Düsseldorf

LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I	Roche, Mannheim
Lysozym (4kU/mg)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mutanolysin (10kU/mg)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Paroex Mundspüllösung (0,12% Chlorhexidin)	Sunstar Gum, Schönau
Polymer POP-6	Applied Biosystems, Darmstadt
Primer	Tib Molbiol, Berlin
QIAamp DNA mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
Rondells Blue (zur Plaquefärbung)	Directa, Upplands Väsby, Schweden
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
TE-Puffer 100x (Roti®Stock)	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt
Zahnlack (mit Carolacton bzw. Placebo)	Voco, Cuxhaven
Zucker (Haushaltszucker)	Diamant Raffinade Zucker, Pfeifer & Langen, Köln

7.1.2. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 24: Übersicht über die Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Verbrauchsstoff	**Hersteller**
AmpliSize Molecular Ruler 50-2.000bp	Biorad, Hercules, Californien, USA
Anaerocult® P	Merck, Darmstadt
Apply Tips Applicators	Hager und Werken, Duisburg
Cariogenic diet - Experimentalfutter	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Cellstar® Falcon Tubes (50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalspritzen (1ml, steril)	Braun, Melsungen
FastRuler™ Low Range 50-1.500bp	Fermentas (Thermo Scientific), Schwerte
Fixationskleber Technovit 7230 VLC	Heraeus Kulzer, Wehrheim/Ts.
GasPak™ EZ Anaerobe Container System	Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA
Genetic Analyzer Probengefäß und Septen (0,5ml)	Applied Biosystems, Foster City, Californien, USA
Glaskugeln (Ø 2mm)	Roth, Karlsruhe
Impfösen (1µl und 10 µl, steril)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Karies-Entnahmebesteck	LCL biokey, Herzogenrath
Kunststoffobjektträger	PSI Grünewald, Laudenbach
LightCycler® Capillaries (20µl)	Roche, Mannheim
Microbiology Anerotest®	Merck, Darmstadt
Nitrilhandschuhe Peha-soft® nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Objektträger aus Glas	R. Langenbrinck, Emmendingen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter (2,5µl, 10µl, 100µl, 200µl und 1000µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen ohne Filter (200µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,2ml und 0,5ml)	Thermo Scientific, Schwerte
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
Skalpell (steril)	Feather, Osaka, Japan
Urinbecher	Sarstedt, Nümbrecht
Wattetupfer	BD Falcon™, Sparks, Maryland, USA
Zellkulturröhrchen (13ml)	Sarstedt, Nümbrecht

7.1.3. Verwendete Geräte

Tabelle 25: Übersicht über die verwendeten Geräte und deren Hersteller

Gerätetyp	**Gerätebezeichnung**	**Hersteller**
Anaerobiertopf	- BBL GasPack® System	Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA
Analysenwaage	- Kern 770	KERN & Sohn GmbH, Balingen
DNA Sequencer	- ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Externe Lichtquelle	- KL150 LCD (3300K) (für das Stereomikroskop)	Leica, Wetzlar
Geldokumentations-system	- BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
Gelelektrophorese-system	- Kammer + Powersupply	Roth, Karlsruhe
Halteapparat zur Fixierung der Ratten	- Eigenbau	Medizintechnik, Universitätsklinikum Aachen
Kamera	- HV-C20A 3CCD - scA1930-17fc	Hitachi, Tokio, Japan Basler, Ahrensburg
Klebepresse	- EXAKT 402	EXAKT, Norderstedt
Lichtmikroskop	- Laborlux 11 - DMRX	Leitz, Wetzlar Leica, Wetzlar
Magnetrührer	- RCT basic	IKA-Werke, Staufen
Ohrlochzange	- Napox KN 292B	Natsume, Seisakusho Co. Ltd; Osaka, Japan
Pipetten	- Eppendorf Research (2,5µl, 10µl, 100µl, 250µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
qPCR-Cycler	- LightCycler® 2.0	Roche, Mannheim
Schaumstoffpellets	- Pele Tim	Voco, Cuxhaven
Schleifmaschine	- DP-U4 (mit Wasserzulauf)	Struers, Willich
Schleifpapier	- P800-1200 Silicon Carbide	Struers, Willich
Stereomikroskop	- MZ6	Leica, Wetzlar

Sterilwerkbank	- HS12	Heraeus, Hanau
Thermocycler	- Mastercycler®	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	- Thermomixer comfort (0,5ml bis 50ml)	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	- Ti5	Biometra, Göttingen
Vakuumzentrifuge	- Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortex	- Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Waagen	- Type 1404 (bis 2,220kg) - 1265 MP (bis 400g)	beide Sartorius, Göttingen
Werkbank	- captair®Bio Biocap DNA (mit UV-Lampe) - captair®chem (Filtair 834)	Erlab D.F.S. S.A.S, Köln
Whirlmix	- MS2 Minishaker - Lab Dancer	beide IKA-Werke, Staufen
Zentrifugen	- Centrifuge 5804 - Centrifuge 5424 - Centrifuge 5415R - Megafuge 10R - Minizentrifuge Sprout - VWR Ministar	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau Biozym Scientific GmbH, Oldendorf VWR, Darmstadt

7.1.4. Verwendete Software

Tabelle 26: Übersicht über die verwendete Software und deren Hersteller

Software	**Hersteller**
BioDocAnalyze Software 2.0	Biometra, Göttingen
BioEdit Version 7.0.9	Thomas Hall, USA
BioInSys-Datenbank http://134.28.64.65/www/index.php	Lifu Song, Institut für Bioprozess und Biosystemtechnik, Technische Universität Hamburg-Harburg
BLAST http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA
Diskus Version 4.20	Carl H. Hilgers – Technisches Büro, Königswinter
Expasy Translate tool http://web.expasy.org/translate/	Swiss Institute for Bioinformatics, Lausanne, Schweiz
Genedoc Version 2.7.000	Karl Nicolas, USA
Human Oral Microbiome Database (HOMD), http://www.homd.org/index.php	The Forsyth Institute, Cambridge, Massachusetts, USA
I-Tasser Online http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/	Yang Zhang, Department of Biological Chemistry, University of Michigan, USA (*168*)(*169*)
LightCycler® Software Version 4.05	Roche, Mannheim
Mafft Version 7 online http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/	Computational Biology Research Center (CBRC), Japan
Microsoft Excel 2003/2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Visio 2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word 2003/2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Oligonucleotide Properties Calculator http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html	Northwestern University, USA

Ribosomal Database Projekt RDP (Release 10, Update 32) http://rdp.cme.msu.edu/	Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA
Toxin-Antitoxin Database http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB/	Microbial Genomics and Bioinformatics Group, Shanghai, China (*170*)
Zotero Version 3.0	Center for History and New Media George Mason University (USA)

7.2. Ohrmarkierung der Versuchstiere

Tabelle 27: Detaillierte Beschreibung aller verwendeten Ohrmarkierungen der Versuchstiere

Ratte	Markierung linkes Ohr	Markierung rechtes Ohr
1	---	halbes Loch vorne
2		halbes Loch Mitte
3		halbes Loch vorne und Mitte
4		halbes Loch hinten
5		halbes Loch vorne und hinten
6		halbes Loch Mitte und hinten
7		halbes Loch vorne, Mitte und hinten
8		ganzes Loch Mitte
9		halbes Loch vorne und ganzes Loch Mitte
10	halbes Loch vorne	-
11		halbes Loch vorne
12		halbes Loch Mitte
13		halbes Loch vorne und Mitte
14		halbes Loch hinten
15		halbes Loch vorne und hinten
16		halbes Loch Mitte und hinten
17		halbes Loch vorne, Mitte und hinten
18		ganzes Loch Mitte
19		halbes Loch vorne, ganzes Loch Mitte
20	halbes Loch Mitte	-
21		halbes Loch vorne
22		halbes Loch Mitte
23		halbes Loch vorne und Mitte
24		halbes Loch hinten
25		halbes Loch vorne und hinten
26		halbes Loch Mitte und hinten
27		halbes Loch vorne, Mitte und hinten
28		ganzes Loch Mitte
29		halbes Loch vorne, ganzes Loch Mitte
30	halbes Loch vorne und Mitte	-
31		halbes Loch vorne
32		halbes Loch Mitte
33		halbes Loch vorne und Mitte
34		halbes Loch hinten
35		halbes Loch vorne und hinten
36		halbes Loch Mitte und hinten
37		halbes Loch vorne, Mitte und hinten
38		ganzes Loch Mitte
39		halbes Loch vorne, ganzes Loch Mitte
40	halbes Loch hinten	-
41		halbes Loch vorne
42		halbes Loch Mitte
43		halbes Loch vorne und Mitte
44		halbes Loch hinten
45		halbes Loch vorne und hinten

7.3. Zeitlicher Ablaufplan des Tierversuchs 2010

Tabelle 28: Zeitlicher Ablaufplan 2010 (wichtige Ereignisse sind gelb unterlegt)

Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag
				Anlieferung der Versuchstiere 22. Okt.	Behandlung mit Chlorhexidin 23. Okt.	Behandlung mit Augmentan 24. Okt.
Markierung & Lackierung der Tiere 25. Okt.	Inokulation mit *S. mutans* 26. Okt.	Inokulation mit *S. mutans* 27. Okt.	Inokulation mit *S. mutans* 28. Okt.	29. Okt.	30. Okt.	31. Okt.
01. Nov.	Erster Abstrich 02. Nov.	03. Nov.	04. Nov.	05. Nov.	06. Nov.	07. Nov.
08. Nov.	09. Nov.	10. Nov.	Kontrollabstriche* 11. Nov.	12. Nov.	13. Nov.	14. Nov.
15. Nov.	16. Nov.	17. Nov.	18. Nov.	19. Nov.	20. Nov.	21. Nov.
22. Nov.	23. Nov.	24. Nov.	Zweite Lackierung & zweiter Abstrich 25. Nov.	26. Nov.	27. Nov.	28. Nov.
29. Nov.	30. Nov.	01. Dez.	02. Dez.	Dritter Abstrich 03. Dez.	04. Dez.	05. Dez.
06. Dez.	07. Dez.	08. Dez.	09. Dez.	10. Dez.	11. Dez.	12. Dez.
13. Dez	14. Dez	15. Dez	16. Dez.	17. Dez.	18. Dez.	19. Dez.
20. Dez.	21. Dez.	22. Dez.	23. Dez.	24. Dez.	25. Dez.	26. Dez.
Versuchsende & letzter Abstrich 27. Dez	28. Dez.	29. Dez.	30. Dez.	31. Dez.		

* Kontrollabstriche der Ratten 15, 18, 19, 24, 28, 29, 30, 34, 3

7.4. Übersicht über die Gesamtdaten des ersten Rattenversuchs

7.4.1. Zellzahlen der Abstriche

7.4.1.1. Zellzahlen des ersten Abstrichs 2. November 2010

Tabelle 29: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Kontrollgruppe (Abstrich 2. November 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
1	1,05E+02	2,10E+04
2	1,89E+02	3,78E+04
3	1,05E+02	2,10E+04
4	2,19E+02	4,38E+04
5	1,23E+02	2,46E+04
6	1,15E+02	2,30E+04
7	3,00E+02	6,00E+04
8	1,40E+02	2,80E+04
9	1,17E+02	2,34E+04
10	1,32E+02	2,64E+04
11	1,05E+02	2,10E+04
12	1,39E+02	2,78E+04
MW	**1,49E+02**	**2,98E+04**
SE	**1,63E+01**	**3,41E+03**

Tabelle 30: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack C Gruppe (Abstrich 2. November 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
13	3,70E+01	7,40E+03
14	1,62E+01	3,24E+03
15	2,37E+00	4,80E+02
16	5,55E+01	1,11E+04
17	1,22E+02	2,44E+04
18	1,22E+01	2,44E+03
19	2,47E+00	5,00E+02
20	5,85E+01	1,17E+04
21	4,04E+01	8,08E+03
22	1,60E+02	3,20E+04
23	6,38E+01	1,28E+04
24	3,01E-01	6,00E+01
MW	**4,76E+01**	**9,51E+03**
SE	**1,38E+01**	**2,88E+03**

Tabelle 31: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack D Gruppe (Abstrich 2. November 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
25	2,33E+01	4,66E+03
26	1,99E+02	3,98E+04
27	7,84E+01	1,57E+04
28	1,96E+00	4,00E+02
29	1,09E+00	2,20E+02
30	7,45E+00	1,50E+03
31	1,09E+02	2,18E+04
32	3,25E+01	6,50E+03
33	2,60E+02	5,20E+04
34	1,21E+01	2,42E+03
35	1,97E+00	4,00E+02
36	2,11E+01	4,22E+03
MW	**6,23E+01**	**1,25E+04**
SE	**2,37E+01**	**4,95E+03**

Tabelle 32: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier aus dem Kontrollabstrich vom 11. November 2010

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
15	8,57E+01	1,71E+04
18	5,42E+01	1,08E+04
19	4,50E+01	9,00E+03
24	4,27E+02	8,54E+04
28	6,37E+01	1,27E+04
29	2,22E+02	4,44E+04
30	6,34E+01	1,27E+04
34	2,74E+02	5,48E+04
35	9,69E+02	1,94E+05

7.4.1.2. Zellzahlen des ersten Abstrichs nach dem Kontrollabstrich

Tabelle 33: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack C Gruppe nach dem Kontrollabstrich (kursiv) mit verändertem ME und SE

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
13	3,70E+01	7,40E+03
14	1,62E+01	3,24E+03
15	*8,57E+01*	*1,71E+04*
16	5,55E+01	1,11E+04
17	1,22E+02	2,44E+04
18	*5,42E+01*	*1,08E+04*
19	*4,50E+01*	*9,00E+03*
20	5,85E+01	1,17E+04
21	4,04E+01	8,08E+03
22	1,60E+02	3,20E+04
23	6,38E+01	1,28E+04
24	*4,27E+02*	*8,54E+04*
MW	**9,71E+01**	**1,94E+04**
SE	**3,21E+01**	**6,41E+03**

Tabelle 34: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack D Gruppe nach dem Kontrollabstrich (kursiv) mit verändertem ME und SE

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
25	2,33E+01	4,66E+03
26	1,99E+02	3,98E+04
27	7,84E+01	1,57E+04
28	*6,37E+01*	*1,27E+04*
29	*2,22E+02*	*4,44E+04*
30	*6,34E+01*	*1,27E+04*
31	1,09E+02	2,18E+04
32	3,25E+01	6,50E+03
33	2,60E+02	5,20E+04
34	*2,74E+02*	*5,48E+04*
35	*9,69E+02*	*1,94E+05*
36	2,11E+01	4,22E+03
MW	**1,93E+02**	**3,86E+04**
SE	**7,55E+01**	**1,51E+04**

7.4.1.3. Zellzahlen des zweiten Abstrichs 25. November 2010

Tabelle 35: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Kontrollgruppe (Abstrich 25. November 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
1	1,26E+01	2,52E+03
2	2,56E+01	5,12E+03
3	3,89E+01	7,78E+03
4	1,33E+01	2,66E+03
5	6,97E+01	1,39E+04
6	3,43E+01	6,86E+03
7	6,95E+01	1,39E+04
8	1,04E+01	2,08E+03
9	2,24E+01	4,48E+03
10	7,18E+01	1,44E+04
11	4,25E+01	8,50E+03
12	2,03E+01	4,06E+03
MW	**3,59E+01**	**7,19E+03**
SE	**6,37E+00**	**1,27E+03**

Tabelle 36: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack C-Gruppe (Abstrich 25. November 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
13	2,26E+02	4,52E+04
14	1,98E+01	3,96E+03
15	2,26E+01	4,52E+03
16	9,46E+00	1,89E+03
17	1,77E+00	3,54E+02
18	6,59E+00	1,32E+03
19	8,18E-01	1,64E+02
20	6,16E+01	1,23E+04
21	1,28E+00	2,56E+02
22	1,06E+01	2,11E+03
23	1,03E+02	2,06E+04
24	8,31E+00	1,66E+03
MW	**3,93E+01**	**7,86E+03**
SE	**1,83E+01**	**3,66E+03**

Tabelle 37: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack D-Gruppe (Abstrich 25. November 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
25	1,56E+01	3,12E+03
26	5,24E+02	1,05E+05
27	2,49E+02	4,98E+04
28	7,90E+01	1,58E+04
29	2,05E+01	4,10E+03
30	2,73E+01	5,46E+03
31	1,87E+01	3,47E+03
32	8,19E+01	1,64E+04
33	4,39E+01	8,78E+03
34	1,49E+02	2,98E+04
35	1,25E+02	2,50E+04
36	7,46E-01	1,49E+02
MW	**1,11E+02**	**2,22E+04**
SE	**4,10E+01**	**8,21E+03**

7.4.1.4. Zellzahlen des dritten Abstrichs 2. Dezember 2010

Tabelle 38: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Kontrollgruppe (Abstrich 3. Dezember 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
1	8,44E+01	1,69E+04
2	1,65E+02	3,30E+04
3	6,71E+01	1,34E+04
4	3,40E+01	6,80E+03
5	2,79E+01	5,58E+03
6	4,60E+01	9,20E+03
7	1,79E+02	3,58E+04
8	5,27E+01	1,05E+04
9	7,91E+01	1,58E+04
10	2,51E+02	5,02E+04
11	3,47E+01	6,94E+03
12	4,02E+02	8,04E+04
MW	**1,19E+02**	**2,37E+04**
SE	**3,13E+01**	**6,26E+03**

Tabelle 39: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack C Gruppe (Abstrich 3. Dezember 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
13	1,30E+02	2,60E+04
14	9,82E+00	1,96E+03
15	2,02E+02	4,04E+04
16	4,27E+01	8,54E+03
17	3,65E+01	7,30E+03
18	3,62E+01	7,24E+03
19	1,14E+01	2,28E+03
20	3,77E+02	7,54E+04
21	1,21E+02	2,42E+04
22	1,26E+02	2,52E+04
23	1,26E+01	2,52E+03
24	3,93E-01	7,85E+01
MW	**9,21E+01**	**1,84E+04**
SE	**3,04E+01**	**6,09E+03**

Tabelle 40: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack D Gruppe (Abstrich 3. Dezember 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
25	2,10E+01	4,20E+03
26	2,32E+02	4,64E+04
27	4,33E+00	8,66E+02
28	1,75E+01	3,50E+03
29	7,09E+01	1,42E+04
30	1,45E+01	2,90E+03
32	2,84E+02	5,68E+04
33	8,86E+01	1,77E+04
34	1,61E+02	3,22E+04
35	8,96E+01	1,79E+04
36	2,85E+00	5,70E+02
MW	**8,97E+01**	**1,79E+04**
SE	**2,79E+01**	**5,57E+03**

* Ratte 31 verstarb während der zweiten Narkose und wird in den weiteren Ergebnissen nicht mehr mit aufgeführt

7.4.1.5. Zellzahlen des letzten Abstrichs 26./27. Dezember 2010

Tabelle 41: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Kontrollgruppe (Abstrich 26./27. Dezember 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
1	4,15E+01	8,30E+03
2	7,42E+01	1,48E+04
3	3,93E+01	7,86E+03
4	2,76E+01	5,52E+03
5	4,86E+01	9,72E+03
6	8,34E+01	1,67E+04
7	5,86E+01	1,17E+04
8	4,80E+01	9,60E+03
9	1,15E+01	2,30E+03
10	8,54E+01	1,71E+04
11	6,45E+01	1,29E+04
12	1,12E+01	2,23E+03
MW	**4,95E+01**	**9,90E+03**
SE	**6,93E+00**	**1,39E+03**

Tabelle 42: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack C Gruppe (Abstrich 26./27. Dezember 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
13	1,10E+02	2,20E+04
14	5,17E+01	1,03E+04
15	1,01E+02	2,02E+04
16	7,41E+01	1,48E+04
17	3,16E+01	6,32E+03
18	3,19E+01	3,68E+03
19	5,65E+01	1,13E+04
20	1,48E+02	2,96E+04
21	7,53E-01	1,50E+02
22	1,69E+02	3,38E+04
23	4,19E+02	8,38E+04
24	6,23E+00	1,25E+03
MW	**1,00E+02**	**1,98E+04**
SE	**3,14E+01**	**6,32E+03**

Tabelle 43: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack D Gruppe (Abstrich 26./27. Dezember 2010)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
25	1,43E+02	2,86E+04
26	1,79E+02	3,58E+04
27	3,22E+00	6,44E+02
28	3,14E+01	6,28E+03
29	1,36E+02	2,72E+04
30	6,41E+01	1,28E+04
32	2,36E+02	4,72E+04
33	2,62E+01	5,24E+03
34	6,74E+01	1,35E+04
35	2,08E+02	4,16E+04
36	6,08E+02	1,22E+05
MW	**1,55E+02**	**3,10E+04**
SE	**4,66E+01**	**9,73E+03**

7.4.2. Ergebnisse des Karies-Scoring nach Keyes zum ersten Versuch

Tabelle 44: Karies-Scoring der Kontrollgruppe aus dem ersten Versuch Tiere 1 bis 12 (E = Enamel caries, Ds = Dentin surface caries, Dm = Dentin medium caries, Dx = Dentin deep caries)

Tiernummer	E	Ds	Dm	Dx	Summe
1	19	18	13	4	54
2	21	15	12	6	54
3	22	13	8	4	47
4	23	18	12	6	59
5	23	23	14	3	63
6	13	8	2	0	23
7	21	14	9	5	49
8	17	15	8	2	42
9	17	12	6	3	38
10	21	20	8	3	52
11	14	3	0	0	17
12	18	17	6	3	44
MW	**19,08**	**14,67**	**8,17**	**3,25**	**-**
SD	**3,34**	**5,37**	**4,28**	**1,96**	**-**

Tabelle 45: Karies-Scoring der Lack C-Gruppe aus dem ersten Versuch Tiere 13 bis 24

Tiernummer	E	Ds	Dm	Dx	Summe
13	13	2	0	0	15
14	21	16	9	4	50
15	17	12	0	0	29
16	23	20	9	3	55
17	20	20	12	4	56
18	18	12	4	0	34
19	16	7	0	0	23
20	17	5	0	0	22
21	20	11	6	0	37
22	19	15	7	3	44
23	21	20	13	6	60
24	17	13	0	0	30
MW	**18,50**	**12,75**	**5,00**	**1,67**	**-**
SD	**2,71**	**5,93**	**5,01**	**2,19**	**-**

Tabelle 46: Karies-Scoring der Lack D-Gruppe aus dem ersten Versuch Tiere 25 bis 36

Tiernummer	E	Ds	Dm	Dx	Summe
25	17	10	4	0	31
26	19	15	11	3	48
27	12	12	1	0	25
28	16	8	2	0	26
29	15	4	0	0	19
30	18	6	0	0	24
32	18	10	8	3	39
33	18	11	2	0	31
34	23	19	12	6	60
35	21	18	11	5	55
36	11	0	0	0	11
MW	**17,09**	**10,27**	**4,64**	**1,55**	**-**
SD	**3,53**	**5,75**	**4,88**	**2,30**	**-**

7.5. Zeitlicher Ablaufplan des Tierversuchs 2011

Tabelle 47: Zeitlicher Ablaufplan 2011 (wichtige Ereignisse sind gelb unterlegt)

Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag
				Anlieferung der Versuchstiere 27. Mai	28. Mai	29. Mai
Behandlung mit Chlorhexidin 30. Mai	Behandlung mit Augmentan 31. Mai	Inokulation mit *S. mutans* Start Trinkwasserzusätze 01. Juni	Inokulation mit *S. mutans* 02. Juni	Inokulation mit *S. mutans* 03. Juni	04. Juni	05. Juni
Erster Abstrich Start Mundspülungen 06. Juni	07. Juni	08. Juni	09. Juni	10. Juni	11. Juni	12. Juni
13. Juni	Kontrollabstrich* 14. Juni	15. Juni	16. Juni	17. Juni	18. Juni	19. Juni
20. Juni	21. Juni	Zweiter Abstrich 22. Juni	23. Juni	24. Juni	25. Juni	26. Juni
27. Juni	28. Juni	29. Juni	30. Juni	01. Juli	02. Juli	03. Juli
Überprüfung der Karies (Ratte 6, 21 & 44) 04. Juli	05. Juli	Finalisierung & letzter Abstrich 06. Juli	07. Juli	08. Juli	09. Juli	10. Juli

* Kontrollabstrich nur bei Ratte 10

7.6. Übersicht über die Gesamtdaten des zweiten Rattenversuchs

7.6.1. Zellzahlen der Abstriche

7.6.1.1. Zellzahlen des ersten Abstrichs 6. Juni 2011

Tabelle 48: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Fluorid (Abstrich 6. Juni 2011)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
1	1,55E+02	3,10E+04
2	1,17E+01	2,34E+03
3	2,39E+02	4,78E+04
4	1,64E+02	3,28E+04
5	1,03E+02	2,06E+04
6	1,24E+02	2,48E+04
7	1,21E+02	2,42E+04
8	1,73E+02	3,46E+04
9	4,77E+02	9,54E+04
10*	1,89E+03	3,78E+05
11	6,36E+02	1,27E+05
12	1,45E+02	2,90E+04
13	4,95E+02	9,90E+04
14	4,54E+01	9,08E+03
15	2,43E+02	4,86E+04
MW	**3,35E+02**	**6,70E+04**
SE	**1,20E+02**	**2,40E+04**

* inklusive Kontrollabstrich

Tabelle 49: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton A (Abstrich 6. Juni 2011)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
16	2,11E+02	4,22E+04
17	5,24E+02	1,05E+05
18	5,02E+03	1,00E+06
19	1,88E+03	3,76E+05
20	8,28E+01	1,66E+04
21	2,12E+02	4,24E+04
22	4,66E+01	9,32E+03
23	3,60E+02	7,20E+04
24	9,61E+02	1,92E+05
25	2,38E+01	4,76E+03
26	1,72E+01	3,44E+03
27	2,14E+02	4,28E+04
28	1,51E+02	3,02E+04
29	5,10E+01	1,02E+04
30	1,77E+02	3,54E+04
MW	**6,62E+02**	**1,32E+05**
SE	**3,36E+02**	**6,72E+04**

Tabelle 50: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton B (Abstrich 6. Juni 2011)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
31	3,55E+01	7,10E+03
32	3,72E+01	7,44E+03
33	1,30E+01	2,60E+03
34	4,40E+01	8,80E+03
35	2,27E+03	4,54E+05
36	3,06E+02	6,12E+04
37	7,01E+02	1,40E+05
38	3,20E+01	6,40E+03
39	1,28E+02	2,56E+04
40	1,36E+02	2,72E+04
41	6,12E+01	1,22E+04
42	8,03E+01	1,61E+04
43	2,62E+01	5,24E+03
44	6,61E+01	1,32E+04
45	3,18E+01	6,36E+03
MW	**2,65E+02**	**5,29E+04**
SE	**1,50E+02**	**3,01E+04**

7.6.1.2. Zellzahlen des zweiten Abstrichs 22. Juni 2011

Tabelle 51: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Fluorid (Abstrich 22. Juni 2011)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
1	1,89E+03	3,78E+05
2	2,68E+02	5,36E+04
3	2,55E+02	5,10E+04
4	8,70E+02	1,74E+05
5	2,11E+01	4,22E+03
6	2,82E+03	5,64E+05
7	1,71E+02	3,42E+04
8	1,43E+02	2,86E+04
9	4,14E+03	8,28E+05
10	5,61E+02	1,12E+05
11	1,67E+02	3,34E+04
12	1,51E+01	3,02E+03
13	1,13E+02	2,26E+04
14	2,39E+02	4,78E+04
15	8,32E+03	1,66E+06
MW	**1,33E+03**	**2,67E+05**
SE	**5,68E+02**	**1,14E+05**

Tabelle 52: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton A (Abstrich 22. Juni 2011)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
16	1,05E+02	2,10E+04
17	4,91E+02	9,82E+04
18	2,61E+02	5,22E+04
19	8,84E+02	1,77E+05
20	9,14E+02	1,83E+05
21	6,34E+01	1,27E+04
22	4,59E+01	9,18E+03
23	1,98E+00	3,96E+02
24	8,23E+01	1,65E+04
25	1,30E+02	2,60E+04
26	3,90E+01	7,80E+03
27	5,49E+01	1,10E+04
28	2,92E+02	5,84E+04
29	4,81E+02	9,62E+04
30	2,16E+01	4,32E+03
MW	**2,58E+02**	**5,16E+04**
SE	**7,58E+01**	**1,52E+04**

Tabelle 53: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton B (Abstrich 22. Juni 2011)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
31	9,74E+01	1,95E+04
32	2,52E+00	5,04E+02
33	2,29E+00	4,58E+02
34	1,68E+02	3,36E+04
35	1,77E-01	3,54E+01
36	2,23E+01	4,46E+03
37	1,15E+00	2,30E+02
38	1,74E+00	3,48E+02
39	5,65E+00	1,13E+03
40	2,32E+01	4,64E+03
41	1,01E+02	2,02E+04
42	3,04E+02	6,08E+04
43	1,27E+02	2,54E+04
44	6,36E+02	1,27E+05
45	1,76E+03	3,52E+05
MW	**2,17E+02**	**4,34E+04**
SE	**1,15E+02**	**2,29E+04**

7.6.1.3. Zellzahlen des letzten Abstrichs 6. Juli 2011

Tabelle 54: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Fluorid (Abstrich 6. Juli 2011)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
1	2,62E+02	5,24E+04
2	1,05E+02	2,10E+04
3	2,24E+02	4,48E+04
4	1,92E+02	3,84E+04
5	2,34E+01	4,68E+03
6*		
7	2,75E+02	5,50E+04
8	2,79E+01	5,58E+03
9	5,43E+01	1,09E+04
10	3,80E+02	7,60E+04
11	4,36E+02	8,72E+04
12	8,54E+00	1,71E+03
13	9,22E+01	1,84E+04
14	4,49E+00	8,98E+02
15	9,65E+02	1,93E+05
MW	**2,18E+02**	**4,36E+04**
SE	**6,61E+01**	**1,32E+04**

Tabelle 55: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton A (Abstrich 6. Juli 2011)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
16	1,62E+02	3,24E+04
17	1,01E+03	2,02E+05
18	1,46E+03	2,92E+05
19	2,40E+02	4,80E+04
20	3,84E+01	7,68E+03
21*		
22	8,02E+01	1,60E+04
23	6,30E-01	1,26E+02
24	3,37E+01	6,74E+03
25	2,36E+01	4,72E+03
26	5,15E+02	1,03E+05
27	2,79E+01	5,58E+03
28	3,26E+02	6,52E+04
29	1,19E+02	2,38E+04
30	1,31E+02	2,62E+04
MW	**2,98E+02**	**5,95E+04**
SE	**1,11E+02**	**2,22E+04**

Tabelle 56: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton B (Abstrich 6. Juli 2011)

Tiernummer	Zellzahl pro µl	Zellzahl pro Abstrich
31	1,99E+01	3,98E+03
32	9,77E+02	1,95E+05
33	5,31E+03	1,06E+06
34	9,18E+02	1,84E+05
35	3,61E+00	7,22E+02
36	8,01E+01	1,60E+04
37	2,23E+01	4,46E+03
38	5,91E+00	1,18E+03
39	4,17E+01	8,34E+03
40	6,26E+01	1,25E+04
41	7,40E+01	1,48E+04
42	6,95E+02	1,39E+05
43	2,66E+01	5,32E+03
44*		
45	1,49E+04	2,98E+06
MW	**1,65E+03**	**3,31E+05**
SE	**1,05E+03**	**2,09E+05**

* für die Ratten 6, 21 und 44 liegen keine finalen Zellzahlen vor, da die Tiere vor dem letzten Abstrich finalisiert wurden.

7.6.2. Ergebnisse des Karies-Scoring zum zweiten Versuch

7.6.2.1. Karies-Scoring nach Keyes

Tabelle 57: Karies-Scoring der Fluoridgruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 1 bis 15

Tiernummer	E	Ds	Dm	Dx	Summe
1	23	11	3	0	37
2	18	8	0	0	26
3	27	14	3	0	44
4	34	28	10	4	76
5	25	17	1	0	43
6	22	4	0	0	26
7	21	7	4	1	33
8	27	10	0	0	37
9	29	11	3	0	43
10	33	26	9	0	68
11	32	26	14	3	75
12	31	7	2	0	40
13	26	6	0	0	32
14	29	5	0	0	34
15	39	21	5	0	65
MW	**27,73**	**13,40**	**3,60**	**0,53**	**-**
SD	**5,56**	**8,24**	**4,27**	**1,25**	**-**

Tabelle 58: Karies-Scoring der Carolacton A Gruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 16 bis 30

Tiernummer	E	Ds	Dm	Dx	Summe
16	31	22	4	0	57
17	29	19	7	0	55
18	26	15	1	0	42
19	29	25	9	0	63
20	32	24	17	5	78
21	24	14	0	0	38
22	36	29	21	7	93
23	36	20	3	0	59
24	25	15	0	0	40
25	36	27	14	3	80
26	37	30	15	5	87
27	26	7	0	0	33
28	33	21	5	0	59
29	28	14	1	0	43
30	25	8	0	0	33
MW	**30,20**	**19,33**	**6,47**	**1,33**	**-**
SD	**4,59**	**7,10**	**7,10**	**2,41**	**-**

Tabelle 59: Karies-Scoring der Carolacton B Gruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 31 bis 54

Tiernummer	E	Ds	Dm	Dx	Summe
31	25	13	1	0	39
32	28	20	0	0	48
33	30	26	3	0	59
34	38	33	14	4	89
35	30	23	2	0	55
36	38	26	5	1	70
37	31	26	7	1	65
38	33	28	10	3	74
39	21	14	0	0	35
40	36	34	12	6	88
41	33	22	9	3	67
42	33	14	1	0	48
43	37	31	7	1	76
44	24	22	0	0	46
45	27	20	2	0	49
MW	**30,93**	**23,47**	**4,87**	**1,27**	**-**
SD	**5,23**	**6,63**	**4,69**	**1,87**	**-**

7.6.2.2. Karies-Scoring nach Larson

Tabelle 60: Karies-Scoring der Fluoridgruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 1 bis 15

Tiernummer	E	Ds	Dm	Dx	Summe
1	29	6	0	0	35
2	30	14	5	0	49
3	28	16	5	0	49
4	39	30	14	2	85
5	30	8	3	1	42
6	28	4	0	0	32
7	23	9	5	2	39
8	31	9	0	0	40
9	31	5	2	0	38
10	35	25	8	0	68
11	35	26	14	6	81
12	31	14	5	0	50
13	33	14	3	0	50
14	28	6	0	0	34
15	34	10	2	0	46
MW	**31,00**	**13,07**	**4,40**	**0,73**	**-**
SD	**3,84**	**8,12**	**4,56**	**1,62**	**-**

Tabelle 61: Karies-Scoring der Carolacton A Gruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 16 bis 30

Tiernummer	E	Ds	Dm	Dx	Summe
16	32	18	0	0	50
17	29	15	8	1	53
18	28	11	1	0	40
19	34	15	2	0	51
20	35	26	15	0	76
21	24	6	0	0	30
22	46	38	21	5	110
23	36	15	5	0	56
24	31	7	0	0	38
25	41	27	10	0	78
26	41	30	15	7	93
27	27	8	0	0	35
28	32	17	6	0	55
29	29	12	3	0	44
30	23	6	0	0	29
MW	**32,53**	**16,73**	**5,73**	**0,87**	**-**
SD	**6,48**	**9,59**	**6,75**	**2,13**	**-**

Tabelle 62: Karies-Scoring der Carolacton B Gruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 31 bis 45

Tiernummer	E	Ds	Dm	Dx	Summe
31	23	1	0	0	24
32	30	5	0	0	35
33	39	22	5	0	66
34	41	24	6	0	71
35	34	10	0	0	44
36	38	14	2	0	54
37	36	18	2	0	56
38	36	18	5	0	59
39	18	0	0	0	18
40	33	18	4	0	55
41	31	18	6	0	55
42	30	11	1	0	42
43	39	29	11	0	79
44	34	10	0	0	44
45	30	8	0	0	38
MW	**32,80**	**13,73**	**2,80**	**0,00**	**-**
SD	**6,19**	**8,34**	**3,28**	**0,00**	**-**

7.7. Gewichtsentwicklung der Tiere im zweiten Versuch

7.7.1. Gewichtsentwicklung in der Fluoridgruppe

Tabelle 63: Übersicht über die Gewichtsentwicklung der Tiere der Fluoridgruppe

Ratte	Startgewicht in g	Endgewicht in g	Käfig
1	65	233,5	
2	55	199,2	
3	68	233,4	
4	72	240,1	**1**
5	61	216,0	
MW	**64,2**	**224,44**	
SA	**5,8**	**14,94**	
6*	68	229,1	
7	61	225,1	
8	68	232,5	
9	65	213,6	**2**
10	63	220,4	
MW	**65,0**	**224,14**	
SA	**2,8**	**6,64**	
11	62	247,1	
12	65	250,9	
13	69	243,4	
14	68	224,1	**3**
15	65	234,7	
MW	**65,8**	**240,04**	
SA	**2,5**	**9,61**	

7.7.2. Gewichtsentwicklung in der Carolacton A Gruppe

Tabelle 64: Übersicht über die Gewichtsentwicklung der Tiere der Carolacton A Gruppe

Ratte	Startgewicht in g	Endgewicht in g	Käfig
16	62	250,8	
17	64	218,3	
18	67	240,4	
19	57	235,9	**1**
20	60	218,6	
MW	**62,0**	**232,80**	
SA	**3,4**	**12,67**	
21*	61	222,9	
22	70	230,1	
23	61	265,8	
24	64	234,5	**2**
25	60	233,4	
MW	**63,2**	**237,34**	
SA	**3,7**	**14,80**	
26	60	251,7	
27	60	261,9	
28	72	261,8	
29	68	256,9	**3**
30	60	223,4	
MW	**64,0**	**251,14**	
SA	**5,1**	**14,37**	

7.7.3. Gewichtsentwicklung in der Carolacton B Gruppe

Tabelle 65: Übersicht über die Gewichtsentwicklung der Tiere der Carolacton B Gruppe

Ratte	Startgewicht in g	Endgewicht in g	Käfig
31	70	258,5	
32	65	223,8	
33	70	244,6	
34	58	217,9	**1**
35	61	233,1	
MW	**64,8**	**235,58**	
SA	**4,8**	**14,59**	
36	63	243,7	
37	70	247,7	
38	65	232,5	
39	72	260,5	**2**
40	65	217,8	
MW	**67,0**	**240,44**	
SA	**3,4**	**14,43**	
41	60	212,8	
42	65	245,6	
43	68	239,5	
44*	69	247,3	**3**
45	63	221,2	
MW	**65,0**	**233,28**	
SA	**3,3**	**13,80**	

7.8. Verwendete Primer (konventionelle und qPCR)

Tabelle 66: Übersicht über die verwendeten Primer

Primer-bezeich-nung	Primersequenz 5’ → 3’	Primertarget	Primer-länge	Annealing-temperatur (°C)*	Produkt in bp	Quelle
Primer für den Nachweis von *Streptococcus mutans*						
Sm F5	5’ AGCCATGCGCAATCAACAGGTT 3’	Glucosyltransferase-I & GTF-SI *S. mutans* (spezies-spezifisch, forward)	22	69	415	(*158*)
Sm R4	5’ CGCAACGCGAACATCTTGATCAG 3’	Glucosyltransferase-I & GTF-SI *S. mutans* (spezies-spezifisch, reverse)	23	70		
Universelle Primer						
Nadkarni-F	5’ TCCTACGGGAGGCAGCAGT 3’	16S rRNA (forward)	19	60,1	467	(*159*)
Nadkarni-R	5’ GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3’	16S rRNA (reverse)	26	57,7		
Two-Component Systems						
TCS-3 HK P1	5’ CAYGAYYTIMGIAAYCC 3’	TCS 3 – Histidin Kinase (HK) (Covs/R) (forward)	17	38,7	505	(*79*)
TCS-3 HK P2	5’ GTDATUACIGTICCC 3’	TCS 3 – HK (CovS/R) (reverse)	15	32,9		
HKP1 (TCS-9 HK-F)	5’ ATACAGTCAATATGCYAAGC 3’	TCS 9 – HK (LevS/R) (forward)	20	43,6	1055	
HKP2 (TCS-9 HK-R)	5’ GRATAACACGGAAAA 3’	TCS 9 – HK (LevS/R) (reverse)	15	34,5		

RRP1 (TCS-9 RR-F)	5’ TGCTGARGACCAAGA 3’	TCS 9 – Response Regulator (RR) (LevS/R)	15	41,8	522	
RRP2 (TCS-9 RR-R)	5’ TTAGCTGCAATTTCTT 3’	TCS 9 – RR (LevS/R) (reverse)	16	40,8		
TCS-13 P1	5’ RAKTTYATGCCYCTMACYTTYCAG 3’	TCS-13 (ComD/E) (forward)	24	50,7	~1600	
TCS-13 P2	5’ GATTCRWWRGCMGCCTC 3’	TCS 13 (ComD/E) (reverse)	17	47,6		
HK-F1	5’ TTGCTTGCTGTTGTTGTG 3’	TCS 15 – HK (ComP) *S. mutans 11060* (spezies-spezifisch, forward)	18	52,3	HK-F1 +HK-R1 = 1624 HK-F2 + HK-R1 = 504	
HK-F2	5’ GGCTACCATTTAGTAGAAAAGAGG 3’	TCS 15 – HK (ComP) *S. mutans 11060* (spezies-spezifisch, forward)	24	54,0		
HK-R1	5’ TGTTACCATCTTCGGAAGG 3’	TCS 15 – HK (ComP) *S. mutans 11060* (spezies-spezifisch, reverse)	19	52,0		
TCS-18 P1	5’ CACTGTTCCTCCTGTATCC 3’	TCS 18 (RNA-binding) *S. ratti* (spezies-spezifisch, forward)	19	49,2	ca. 1899	
TCS-18 P2	5’ ATGCTGGCTATGATGTTGT 3’	TCS 18 (RNA-binding) *S. ratti* (spezies-spezifisch, reverse)	19	50,2		
Primer für die Serotypisierung mittels *in silico* PCR						
SC-F	5’ CGGAGTGCTTTTTACAAGTGCTGG 3’	RPG-Gene	24	n.b.	727	(*102*)
SC-R	5’ AACCACGGCCAGCAAACCCTTTAT 3’	RPG-Gene	24	n.b.		

SE-F	5‘ CCTGCTTTTCAAGTACCTTTCGCC 3‘	RPG-Gene	24	n.b.	517	
SE-R	5‘ CTGCTTGCCAAGCCCTACTAGAAA 3‘	RPG-Gene	24	n.b.		
SF-F	5‘ CCCACAATTGGCTTCAAGAGGAGA 3‘	RPG-Gene	24	n.b.	316	
SF-R	5‘TGCGAAACCATAAGCATAGCGAGG 3‘	RPG-Gene	24	n.b.		
Toxin-Antitoxin Systeme						
mazEF-F	5’ AATAGACACAGAAATAGGAGGT 3’	TA-System mazEF *S. mutans* (spezies-spezifisch, forward)	22	48,3	640	**
mazEF-R	5’ GATTTCAGTAGAAGTTTAACTG 3’	TA-System mazEF *S. mutans* (spezies-spezifisch, reverse)	22	44,9		
relBE-F	5’ GGTATAATAGATATAAAAGGAGTT 3’	TA-System relBE *S. mutans* (spezies-spezifisch, forward)	24	44,3	609	
relBE-R	5’ AACAGGAAGAACTACCTTTGAG 3’	TA-System relBE *S. mutans* (spezies-spezifisch, reverse)	22	51,8		
TAS3-F (Hic-F)	5’ CGCTAGAAATCAATCTTTCTA 3’	TA-System hicBA *S. mutans* (spezies-spezifisch, forward)	21	47,6	703	
TAS3-R (Hic-R)	5’ TAGTTTCTAAATCAGGGGCT 3’	TA-System hicBA *S. mutans* (spezies-spezifisch, reverse)	20	50,1		
Laktat-Oxidase						

Lac-F	5’ GAGCAGGATAATTGACAGTC 3’	Lactat-Oxidase *S. sobrinus* (forward)	20	47,9	1175	(*41*)
Lac-R	5’ ACTCAGTGACGAATCAGTT 3’	Lactat-Oxidase *S. sobrinus* (reverse)	19	47,1		
Scardovia- und *Bifidobacterium*-Primer						
Scar448F	5’ GTGGACTTTATGAATAAGC 3’	16S rRNA *S. wiggsiae* (spezies-spezifisch, forward)	19	43,5	146	(*111*)
Scar619R	5’ CTACCGTTAAGCAGTAAG 3’	16S rRNA *S. wiggsiae* (spezies-spezifisch, reverse)	18	43,8		
Bifgsp628F	5’ CGGTGGATYNGCGCCGGGTAC 3’	16S rRNA *Bifidobacterium* (genus-spezifisch, forward)	21	68,8	Bifgsp628 F + Bifgsp846 Rx = 241	**
Bifgsp846R1	5’ CTCCGACACGGARMMCGTGGA 3’	16S rRNA *Bifidobacterium* (genus-spezifisch, reverse)	21	62,9		
Bifgsp846R2	5’ CYCCGACACRGRACCCGKRRA 3’	16S rRNA *Bifidobacterium* (genus-spezifisch, reverse)	21	56,8		
Bifdent846F	5’ TCCACGKKYTCCGTGTCGGAG 3’	16S rRNA *B. dentium* (spezies-spezifisch, forward)	21	63,7	184	
Bifdent1011R	5’ GGCCGTATCTCTACGGCC 3’	16S rRNA *B. dentium* (spezies-spezifisch, reverse)	18	56,9		

* Die Annealingtemperatur der Primer entspricht dem thermodynamischen Schmelzpunkt nach einer Methode von TIB MOLBIOL und deren Angabe auf dem Informationszettel des entsprechenden Primers, bei Primern aus Publikationen entspricht die Annealingtemperatur der in der Arbeit veröffentlichen Temperatur.

** diese Arbeit n.b. = nicht bekannt

Abkürzungen für degenerierte Basen: S = G / C, Y = C / T, M = A / C, W = A / T, R = A / G, K = G / T
H = A / C / T, D = A / G / T, B = C / G / T, V = A / C / G
N = A / C / G / T

7.9. Sequenzvergleich der Ergebnisse der *in silico*-Typisierung

7.9.1. Ergebnisse für den Serotyp C

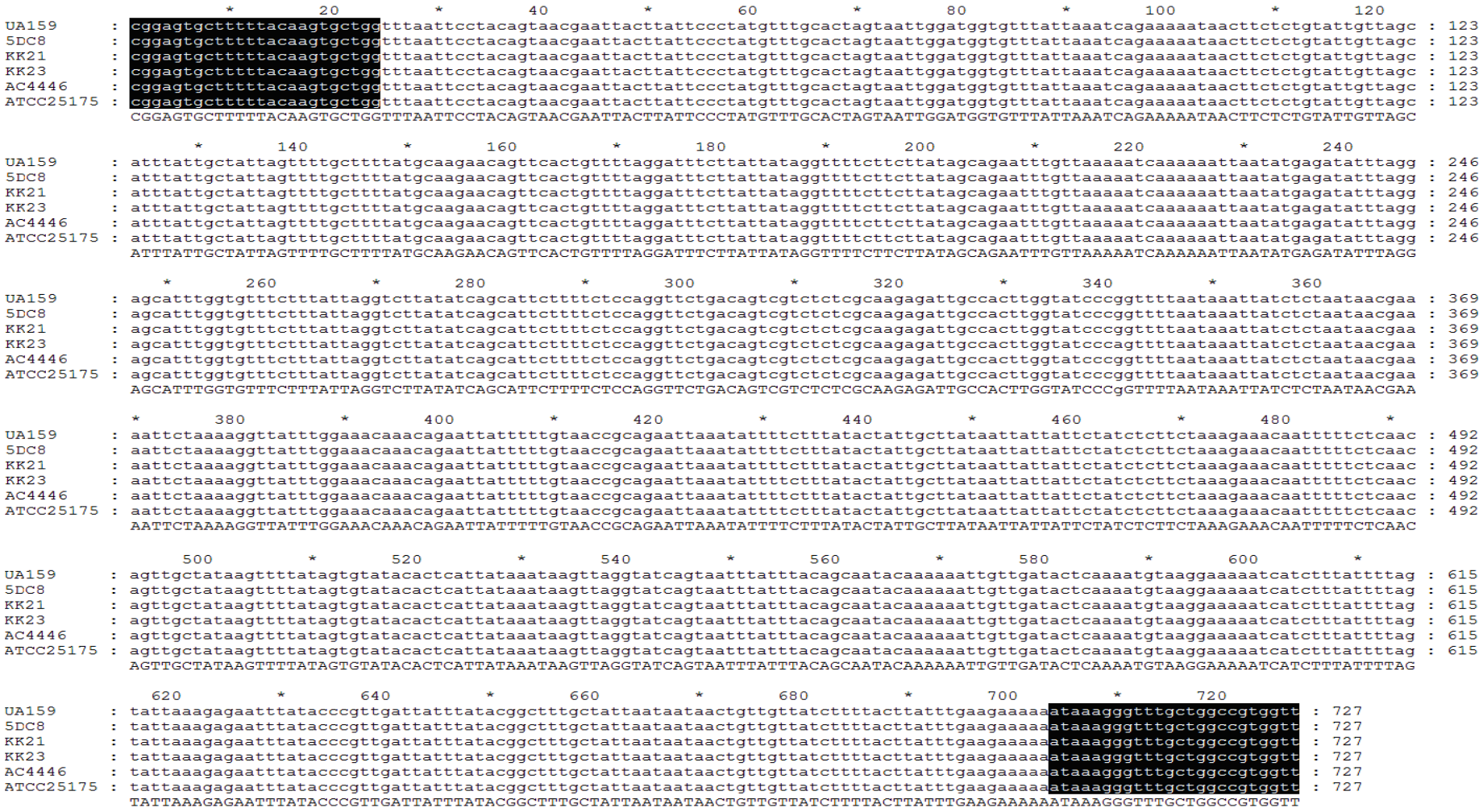


Abbildung 73: Sequenzvergleich für den Serotyp C mit der Primerkombination SC-F / SC-R (Primer sind schwarz unterlegt, Produktgröße 727bp) der *S. mutans* Stämme UA159, 5DC8, KK21, KK23, AC4446 und ATCC25175

178

7.9.2. Ergebnisse für den Serotyp F

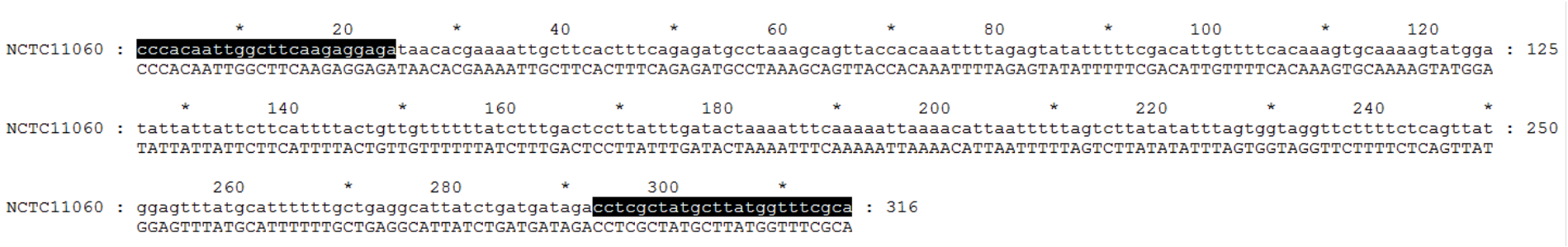


Abbildung 74: Sequenzvergleich für den Serotyp F mit der Primerkombination SF-F / SF-R (Primer sind schwarz unterlegt, Produktgröße 316bp) des *S. mutans* Stammes NCTC11060

7.10. *Scardovia* und *Bifidobacterium* Standardwerte für die qPCR

7.10.1. *S. mutans* Standardwerte

Tabelle 67: Standardwerte für die qPCR von *S. mutans*

Verdünnungsstufe	Zellzahl
10^{-2}	$1,6x10^{5}$
10^{-3}	$1,6x10^{4}$
10^{-4}	$1,6x10^{3}$
10^{-5}	$1,6x10^{2}$

7.10.2. *S. wiggsiae* Standardwerte

Tabelle 68: Standardwerte für die qPCR von *S. wiggsiae*

Verdünnungsstufe	Zellzahl
10^{-2}	$2,3x10^{4}$
10^{-3}	$2,3x10^{3}$
10^{-4}	$2,3x10^{2}$

7.10.3. *B. dentium* Standardwerte

Tabelle 69: Standardwerte für die qPCR von *B. dentium*

Verdünnungsstufe	Zellzahl
10^{-2}	$1,4x10^{4}$
10^{-3}	$1,4x10^{3}$
10^{-4}	$1,4x10^{2}$

7.11. Laktat- und Pyruvat-Oxidase

Tabelle 70: Anwesenheit verschiedener Enzyme des Pyruvat Stoffwechsels in Streptococci sortiert nach phylogenetischen Eigenschaften

Spezies und Stamm	Laktat Oxidase (1.13.12.4)	Pyruvat Oxidase (1.2.3.3)	Pyruvate Dehydrogenase Komplex (E1 + E2)	Phosphat-acetyl-Transferase (2.3.1.8)	Acetat Kinase (2.7.2.1)	Gruppe
S. pneumoniae TIGR4	X	X	X	X	X	Mitis-Gruppe
S. pneumoniae Taiwan19F--14	X	X	X	X	X	
S. pneumoniae 70585	X	X	X	X	X	
S. pneumoniae Hungary 19A--6	X?[3]	X	--?	X	X	
S. mitis B6	X?[1]	X	--?	X	X	
S. mitis SK597	X	X	X	X	X	
S. oralis Uo5	X	X	X	X	X	
S. infantis SK1302	--?	X	X	?	?	
S. australis ATCC700641	--?	X	X	X	X	
S. parasanguinis ATCC 15912	--	X	X	X	X	
S. sanguinis SK36	--	X	X	X	X	
S. sanguinis ATCC49296	X	X	X	X	X	
S. peroris ATCC700780	X	X	X	X	X	
S. gordonii challis	--	X	X	X	X	
S. cristatus ATCC51100	X	X	X	X	X	
S. thermophilus CNRZ1066	--	--	X	X	X	Salivarius-Gruppe
S. thermophilus LMD--9	--	--	X	X	X	
S. thermophilus LMG 18311	--	--	X	X	X	
S. salivarius JIM8780	--	--	X	X	X	
S. vestibularis ATCC49124	--?	X	X	--?	X	
S. anginosus 1_2_62CV	--?	X	X	X	X	Anginosus-Gruppe
S. pasteurianus ATCC 43144	--	--	X	X	X	Bovis-Gruppe
S. gallolyticus UCN34	--	--	X	X	X	
S. pyogenes MGAS5005	X	--	X	X	X	Pyogenes-Gruppe
S. pyogenes M1GAS	X	--	X	X	X	
S. pyogenes MGAS10270	X	--	X	X	X	
S. pyogenes MGAS10394	X	--	X	X	X	

S. pyogenes MGAS10750	**X**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. pyogenes MGAS2096	**X**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. pyogenes MGAS315	**X**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. pyogenes MGAS6180	**X**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. pyogenes MGAS8232	**X**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. pyogenes MGAS9429	**X**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. pyogenes SSI--1	**X**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. parauberis KCTC11537	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. agalactiae 2603V/R	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. agalactiae A909	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. agalactiae NEM316	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. dysgalactiae subsp. equisimilis GGS_124	**X**	**X?**[2]	**X**	**X**	**X**	
S. uberis 0140J	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. equi subsp. equi 4047	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. suis 05ZYH33	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	Suis-Gruppe
S. suis 98HAH33	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. mutans UA 159	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	Mutans-Gruppe
S. mutans NN2025	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. mutans 5DC8	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. mutans KK21	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. mutans KK23	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. mutans AC4446	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. mutans ATCC25175	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. mutans NCTC11060	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. ratti DSM20564	**--**	**--**	**X**	**X**	**X**	
S. criceti HS-6	**X**	**--**	**X**	**?**	**X**	
S. sobrinus DSM20742	**X**	**--**	**X**	**X**	**X**	

* abgeleitet von *in silico* Information, keine experimentelle Bestätigung

[1] Gen kürzer als die Laktat Oxidase von *S. pneumoniae* (möglicherweise nicht funktionsfähig)

[2] potentieller Frameshift (in Übereinstimmung mit der Datenbank) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/251781468)

[3] potentieller Frameshift (in Übereinstimmung mit der Datenbank) (http://134.28.64.65/www/index.php/genome/Genometool/action/show/tClass/organism-summary/pgDB/SPNE487214)

Legende: X = bestätigt // X?, --?, ? = nicht bestätigt, möglicherweise beschädigt // -- = nicht vorhanden // schwarz = in den Datenbanken gefunden / Genomdaten komplett verfügbar // grau = durch BLAST Suche gefunden / keine kompletten Genomdaten verfügbar

7.12. Ergebnisse der Pilot-Studie (Nachweis von *S. wiggsiae* und *B. dentium*)

Tabelle 71: Gesamtzellzahlen pro Probe bei den Karies-Patienten und den gesunden Probanden

Probe	Karies	Gesunde
1	3,71E+05	2,96E+04
2	4,35E+06	3,33E+04
3	1,97E+07	2,24E+05
4	7,37E+06	1,44E+05
5	2,35E+06	3,24E+05
6	8,11E+06	2,90E+04
7	1,76E+07	5,90E+04
8	7,38E+05	1,16E+05
9	3,13E+06	4,92E+05
10	6,42E+06	7,15E+04

Tabelle 72: Zellzahlen der Karieserreger pro Probe bei den Karies-Patienten

Probe	*B. dentium*	*S. wiggsiae*	*S. mutans*
1	4,47E+03	9,16E+03	3,67E+03
2	2,86E+04	7,80E+04	2,03E+05
3	1,31E+04	2,19E+03	3,43E+05
4	-	7,67E+04	8,90E+04
5	-	4,13E+03	2,06E+05
6	4,47E+03	5,62E+02	1,19E+04
7	-	2,50E+01	1,35E+02
8	-	2,50E+01	2,90E+02
9	-	2,50E+01	9,60E+02
10	4,47E+03	1,08E+02	-
MW	**5,51E+03**	**1,71E+04**	**8,10E+04**
SE	**2,88E+03**	**1,01E+04**	**3,54E+04**

Tabelle 73: Zellzahlen der Karieserreger pro Probe bei den gesunden Probanden

Probe	*B. dentium*	*S. wiggsiae*	*S. mutans*
1	-	6,42E+00	**2,34E+02**
2	-	6,42E+00	**3,62E+01**
3	-	7,23E+01	**5,83E+01**
4	-	1,04E+01	**3,74E+01**
5	-	7,78E+00	**7,20E+01**
6	-	6,42E+00	**5,16E+01**
7	-	6,42E+00	**3,21E+02**
8	-	6,70E+00	**3,61E+03**
9	-	1,79E+02	**2,10E+03**
10	-	7,78E+00	**9,20E+03**
MW	**-**	**3,10E+01**	**1,57E+03**
SE	**-**	**1,77E+01**	**9,29E+02**

7.13. DNA-Ladder

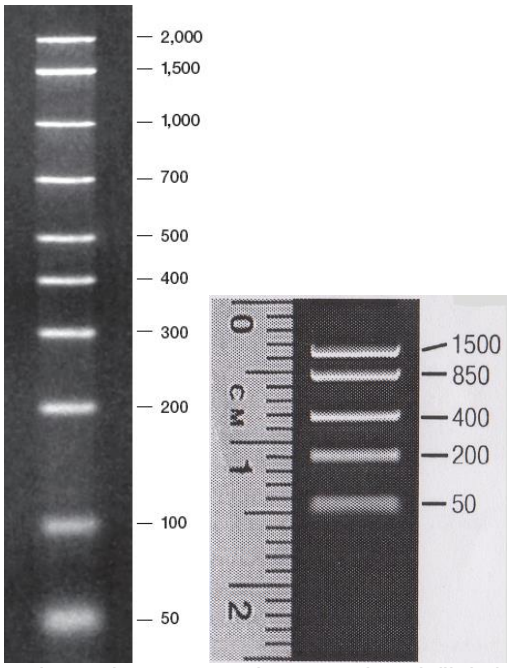


Abbildung 75: AmpliSize Molecular Ruler 50-2.000bp von Biorad (links), FastRuler DNA Ladder, Low Range 50-1.500bp von Fermentas (rechts)

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphische Darstellung verschiedener Einflussfaktoren auf die Bildung von Karies 14
(rot = negativ, grün = positiv) (*6*) 14
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Umwandlung von Pyruvat zu Laktat während der Milchsäuregärung durch die Laktat-Dehydrogenase 16
Abbildung 3: REM-Aufnahme von *Streptococcus mutans*-Zellen im Biofilm einer kariösen Läsion bei einer Ratte (25.000fache Vergrößerung) 18
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Viridans-Streptokokken in Anlehnung an (*44*)(*39*)(*45*) ... 19
Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahme von *S. wiggsiae* (nach Gram-Färbung, 100er Objektiv) 20
Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme von *B. dentium* (nach Gram-Färbung, 100er Objektiv)..... 22
Abbildung 7: Die verschiedenen Phasen während der Biofilmbildung als graphische Darstellung und als mikroskopische Aufnahmen eines Biofilms von *Pseudomonas aeruginosa* (in Anlehnung an http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biofilm.jpg) 23
Abbildung 8: Chemische Strukturformel von Carolacton, Summenformal $C_{25}H_{40}O_8$ (*54*)..... 26
Abbildung 9: Vereinfachte schematische Darstellung der Funktionsweise eines TCS..... 28
Abbildung 10: Schematische Darstellung der 3 verschiedenen TA-Gruppen nach Yamaguchi & Inouye (*93*) (a = Typ I, b = Typ II, c = Typ III)..... 30
Abbildung 11: Schematische Darstellung des PSK (links: Zelle mit Plasmid und TA-System, rechts: Zelle mit Plasmid ohne TA-System)(*98*)..... 31
Abbildung 12: Übersicht über den Pyruvat-Stoffwechsel mit den entsprechenden Enzymen und EC-Nummern..... 32
Abbildung 13: Übersicht der Ohrmarkierungen am Beispiel der Tiere eins bis zehn..... 40
Abbildung 14: Behandlung einer Ratte mit Chlorhexidin (links) und Augmentan (rechts) 41
Abbildung 15: Eine narkotisierte und fixierte Ratte in der Halteapparatur während der Lackierung der hinteren Molaren (C = Nahaufnahme, D = Detailaufnahme)..... 42
Abbildung 16: Inokulation einer Ratte mit 100 µl konzentrierter *S. mutans* Zellsuspension 43
Abbildung 17: Beispielhafte Dokumentation einer nativen Kieferhälfte (Ansicht links: okklusal, Ansicht rechts: vestibulär/oral) 45
Abbildung 18: Ergebnisausgabe eines LightCycler® Laufs mit Definition der Standardkurve (blau) durch die CP-Werte der verschiedenen Standards (rot markiert) 54
Abbildung 19: Beispiel für ein Chromatogramm einer Sequenzierung (Darstellung mit BioEdit) 57
Abbildung 20: Karies-Entnahmebesteck besteht aus Wattetampon (links) und Pinsel (rechts) 59
Abbildung 21: Zellzahlen von *S. mutans* pro Abstrich und Ratte (1-36) zu verschiedenen Zeitpunkten (I = erster Abstrich inkl. Kontrollabstrich, II = zweiter Abstrich, III = dritter Abstrich, IV = finaler Abstrich, logarithmische Auftragung; Kontrollgruppe = grün, Lack C = orange, Lack D = rot). 63
Ratte 31 verstarb zwischen Abstrich zwei und drei, weshalb dort keine Zellzahlen mehr vorliegen. ... 63
Abbildung 22: Diagramme zur Entwicklung der Zellzahlen pro Abstrich und Tier über den gesamten Versuch (logarithmische Auftragung; Kontrollgruppe = grün, Lack C = orange, Lack D = rot)..... 66
Abbildung 24: Plaquefärbung einer Oberkieferhälfte bukkal (links) und okklusal (rechts)..... 68
(A: Kontrollgruppe, B: Lack C Gruppe, C: Lack D Gruppe)..... 68
Abbildung 25: Beschriftete Aufnahme eines mit Fuchsin gefärbten Kieferschliffs 69

Abbildung 26: REM-Aufnahmen einer fortgeschrittenen kariösen Läsion mit Ablösungen an der Zahnschmelz-Dentin-Grenze (Vergrößerung: A = 36x, B = 150x) 70
Abbildung 27: Kariesfärbung eines Kieferschliffs pro Gruppe in der Aufsicht (A: Kontrollgruppe, B: Lack C Gruppe, C: Lack D Gruppe) 70
Abbildung 28: Auswertung der Kariesläsionen (MW mit Standardabweichung) der drei Gruppen nach Keyes (E = Enamel caries, Ds = Dentin surface caries, Dm = Dentin medium caries, Dx = Dentin deep caries) 71
Abbildung 29: REM-Aufnahmen einer kariösen Läsion aus dem letzten Schliff von Ratte 10 (Kontrollgruppe) mit unterschiedlichen Vergrößerungen (A = 36x, B = 200x, C = 650x, D = 6.500x und E = 12.000x) 73
Abbildung 30: REM-Aufnahme der *Streptococcus mutans*-Zellen im Biofilm bei Ratte 10 (25.000fache Vergrößerung) 74
Abbildung 31: Untersuchter Zahn der Ratte 10 im REM-Bild mit Markierung des Fremdkörpers (links), vergrößerte Darstellung des Fremdkörpers und markierter Bereich der EDX-Analyse (rechts, weiß umrandet) 75
Abbildung 32: Ergebnisdiagramm der EDX-Analyse des Fremdkörpers aus der Fissur bei Ratte 10.. 75
Abbildung 33: Beispielhafte Übersicht über die antiinfektive Behandlung von Ratte 10, A = Abstrich vor Behandlung, B = Abstrich nach Behandlung (1 = MacConkey-Agar, 2 = Blutagar mit Colistin und Nalixinsäure, 3 = Blutagar universell) 77
Abbildung 34: Übersicht über das durchschnittliche Gewicht der Ratten pro Käfig und Gruppe bei Versuchsende (Fluoridgruppe = dunkelgrau, Carolacton A Gruppe = pink, Carolacton B Gruppe = blau, mit Standardabweichung) 78
Abbildung 35: Zellzahlen von *S. mutans* pro Abstrich und Ratte (1-45) zu verschiedenen Zeitpunkten (I = erster Abstrich inkl. Kontrollabstrich von Ratte 10, II = zweiter Abstrich, III = finaler Abstrich, logarithmische Auftragung; Fluoridgruppe = dunkelgrau, Carolacton A Gruppe = pink, Carolacton B Gruppe = blau). Jeweils ein Tier pro Versuchsgruppe (Nr. 6, 21, 44) wurde vor dem letzten Abstrich eingeschläfert, um den besten Zeitpunkt der Kariesentwicklung abschätzen zu können. 79
Abbildung 36: Diagramme zur Entwicklung der Zellzahlen pro Abstrich und Tier über den gesamten Versuch (logarithmische Auftragung; Fluoridgruppe = dunkelgrau, Carolacton A = pink, Carolacton B = blau) 81
Abbildung 37: Übersicht der Mittelwerte aller drei Abstriche mit Standardfehler (logarithmische Auftragung; Fluoridgruppe = dunkelgrau, Carolacton A = pink, Carolacton B = blau) 82
Abbildung 38: Plaquefärbung einer Oberkieferhälfte bukkal (links) und okklusal (rechts), A: Fluoridgruppe (Ratte 15), B: Carolacton A Gruppe (Ratte 22), C: Carolacton B Gruppe (Ratte 45) 83
Abbildung 39: Kariesfärbung eines Kiefers pro Gruppe in der Aufsicht, A: Fluoridgruppe (Ratte 10), B: Carolacton A Gruppe (Ratte 28), C: Carolacton B Gruppe (Ratte 45) 84
Abbildung 40: Mittelwerte des Karies-Scorings nach Keyes (mit Standardabweichung) der Fluoridgruppe (dunkelgrau), Carolacton A (pink) und Carolacton B (blau) (E = Enamel caries, Ds = Dentin surface caries, Dm = Dentin medium caries, Dx = Dentin deep caries) 85

Abbildung 41: Mittelwerte des Karies-Scorings nach Larson (mit Standardabweichung) der Fluoridgruppe (dunkelgrau), Carolacton A (pink) und Carolacton B (blau) (E = Enamel caries, Ds = Dentin surface caries, Dm = Dentin medium caries, Dx = Dentin deep caries) 85
Abbildung 42: Sequenzvergleich der *S. mutans* Stämme UA159, 5DC8, KK21, KK23, AC4446 und ATCC25175 in GeneDoc mit den beiden Primern SC-F und SC-R (rot umrandet), die Sternchen deuten die fehlenden Sequenzbereiche an, der kompletten Sequenzvergleich befindet sich im Anhang unter Punkt 7.9.1. 86
Abbildung 43: Übersicht über die Agarose-Gelbilder der PCR-Amplifikate der verschiedenen Two-Component Systems A bis F (HK = Histidin Kinase, RR = Response Regulator) (*79*)..... 87
Abbildung 44: Agarosegelbilder der TA-Systeme A = *mazEF* (Amplifikatgröße 640bp), B = *hicBA* (Amplifikatgröße 609bp), C = *relBE* (Amplifikatgröße 703bp, 1 = Ladder, 2 = Negativ Kontrolle, 3 = *S. mutans* UA159, 4 = *S. mutans* DC09, 5 = *S. mutans* NC101) 90
Abbildung 45: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen von *mazE* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 91
Abbildung 46: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen von *mazE* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 (*109*) 91
Abbildung 47: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen von *mazF* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 92
Abbildung 48: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen von *mazF* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 (*109*) 92
Abbildung 49: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen von *hicB* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23 DC09 und NC101 93
Abbildung 50: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen von *hicB* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 (*109*) 93
Abbildung 51: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen von *hicA* der *S. mutans*-Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 94
Abbildung 52: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen von *hicA* der Stämme UA159, KK23, DC09 und NC101 von *S. mutans* (*109*) 94
Abbildung 53: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen des chromosomalen *relB* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101 95
Abbildung 54: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen des chromosomalen *relB* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101 95
Abbildung 55: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen des chromosomalen *relE* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101 95
Abbildung 56: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen des chromosomalen *relE* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101 96
Abbildung 57: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen des plasmidkodierten *relB* der *S. mutans*-Stämme DC09 und NC101 96
Abbildung 58: Sequenzanalyse der Nukleotidsequenzen des plasmidkodierten *relE* der *S. mutans*-Stämme DC09 und NC101 96

Abbildung 59: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen des chromosomalen und plasmidkodierten *relB* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101 (*109*) 97
Abbildung 60: Sequenzanalyse der Aminosäuresequenzen des chromosomalen und plasmidkodierten *relE* der *S. mutans*-Stämme UA159, DC09 und NC101 (*109*) 97
Abbildung 61: Proteinprediction Modelle von A) $RelE_{chromosomal}$ UA159 (links) und $RelE_{plasmid}$ DC09/NC101 (rechts) sowie B) $RelB_{chromosomal}$ UA159 (links) und $RelB_{plasmid}$ DC09/NC101 (rechts) 98
Abbildung 62: PCR-Nachweis des Laktat-Oxidase Gens mit Hilfe der Primerkombination Lac-F / Lac-R (Amplifikatgröße 1175bp, 1 = Ladder, 2 = Negativ Kontrolle, 3 = *S. mutans* NC378, 4 = *S. mutans* KK15/95, 5 = *S. sobrinus* AC153, 6 = *S. macacae* GH395, 7 = *S. gordonii* GH355, 8 = *S. sobrinus* DSM20742) 99
Abbildung 63: PCR-Nachweis der 16S rRNA-Sequenz von *S. wiggsiae* mit Hilfe der Primer Scar448F und Scar619R (Amplifikatgröße 145bp, 1 = Ladder, 2 = Negativ Kontrolle, 3 = *S. wiggsiae*, 4 = *B. dentium*, 5 = *S. mutans* UA159) 101
Abbildung 64: PCR-Nachweis der 16S rRNA-Sequenz der Gattung *Bifidobacterium* mit Hilfe der Primer Bifgsp628F und Bifgsp846R (241bp) (1 = Ladder, 2 = Negativ Kontrolle, 3 = *S. wiggsiae*, 4 = *B. dentium*, 5 = *S. mutans* UA159, 6 = *B. bifidum*, 7 = *B. breve*, 8 = *B. adolescentis*) 103
Abbildung 65: PCR-Nachweis der 16S rRNA-Sequenz von *B. dentium* mit Hilfe der Primer Bifdent846F und Bifdent1011R (Amplifikatgröße 184bp) (1 = Ladder, 2 = NC, 3 = *S. wiggsiae*, 4 = *B. dentium*, 5 = *S. mutans* UA159, 6 = *B. bifidum*, 7 = *B. breve*, 8 = *B. adolescentis*) 104
Abbildung 66: Gesamtzellzahlen pro Probe (jeweils 1 bis 10) im Vergleich zwischen der gesunden Kontrollgruppe (hellgrün) und den Kariespatienten (dunkelgrün), logarithmische Skalierung 105
Abbildung 67: Zellzahlen der Karieserreger *S. mutans*, *S. wiggsiae*, *B. dentium* und Gesamtzellzahl pro Probe bei zehn Patientenproben aus kariösen Läsionen (logarithmische Skalierung) 106
Abbildung 68: Zellzahlen von *S. mutans*, *S. wiggsiae*, *B. dentium* und Gesamtzellzahl pro Probe bei zehn Proben von gesunden Probanden (Kontrolle), logarithmische Skalierung 106
Abbildung 69: Sequenzierungsergebnis von Probe 1 (Primer: Scar448F), Abbruch der Reaktion nach ca. 130bp 107
Abbildung 70: BLAST-Ergebnis Vergleich der eingegebenen Sequenz (oben „Query“) mit der Referenzsequenz aus der Datenbank (unten „Sbjct“) 108
Abbildung 71: Lage der L-Laktat-Oxidase und der Laktat-Oxidase im Genom von *S. sobrinus* (Abbildung aus der BioInSys-Datenbank, *S. sobrinus* Stamm DSM20742) 123
Abbildung 72: Putativer neuer Stoffwechselweg in *S. sobrinus* zur Energieproduktion ausgehend vom Laktat über Pyruvat, Acetyl-CoA, Acetylphosphat zu Acetat (grün) unter Bildung von ATP (gelb) 124
Abbildung 73: Sequenzvergleich für den Serotyp C mit der Primerkombination SC-F / SC-R (Primer sind schwarz unterlegt, Produktgröße 727bp) der *S. mutans* Stämme UA159, 5DC8, KK21, KK23, AC4446 und ATCC25175 178
Abbildung 74: Sequenzvergleich für den Serotyp F mit der Primerkombination SF-F / SF-R (Primer sind schwarz unterlegt, Produktgröße 316bp) des *S. mutans* Stammes NCTC11060 179
Abbildung 75: AmpliSize Molecular Ruler 50-2.000bp von Biorad (links), FastRuler DNA Ladder, Low Range 50-1.500bp von Fermentas (rechts) 184

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Systematik der Streptokokken 17
Tabelle 2: Übersicht über die Systematik der Gattung *Scardovia* 20
Tabelle 3: Übersicht über die Systematik der Bifidobacteriaceae 21
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Mikroorganismen 36
Tabelle 5: Übersicht über die Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen 37
Tabelle 6: Gruppeneinteilung und Art der Behandlung der Versuchstiere im ersten Tierversuch 2010 (mit entsprechender Farblegende) 40
Tabelle 7: Einteilung der Versuchstiere während des Tierversuchs 2011 (mit entsprechender Farblegende) 47
Tabelle 8: Zusammensetzung eines Ansatzes für die konventionelle PCR 52
Tabelle 9: Zusammensetzung eines Ansatzes für die qPCR 53
Tabelle 10: Zusammensetzung einer Sequenzierungsreaktion 55
Tabelle 11: PCR Programm der Sequenzierungsreaktion 56
Tabelle 12: CFU der ausplattierten Verdünnungsstufen 10^{-6}, 10^{-7} und 10^{-8} pro 100µl 61
Tabelle 13: Standardwerte für die qPCR während des ersten Tierversuchs 62
Tabelle 14: Übersicht über die untersuchten TCS, deren Bedeutung und Vorkommen sowie die verwendeten Primer und das PCR-Temperaturprofil nach unserer gemeinsamen Publikation Song et al., 2012 88
Tabelle 15: PCR-Programm zum Nachweis der chromosomal kodierten *mazEF*-, *relBE*- und *hicBA*-TA-Systeme in *Streptococcus spp.* 89
Tabelle 16: PCR-Programm zum Nachweis der Laktat-Oxidase in *S. sobrinus* 99
Tabelle 17: Optimiertes PCR-Programm für den spezies-spezifischen Nachweis von *S. wiggsiae* in der konventionellen PCR 101
Tabelle 18: qPCR Programm für den Nachweis der Gattung *Bifidobacterium* 102
Tabelle 19: Konventionelles PCR-Programm für den Nachweis der Gattung *Bifidobacterium* 103
Tabelle 20: qPCR Programm für den Nachweis von *B. dentium* 104
Tabelle 21: Konventinelles PCR-Programm für den spezies-spezifischen Nachweis von *B. dentium* 104
Tabelle 22: Homologievergleich der unterschiedlichen TA-Systeme auf Nukleotidebene zwischen UA159 (als Referenzstamm) DC09 bzw. NC101 (Übereinstimmung in Prozentangaben) 121
Tabelle 23: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Kits sowie deren Hersteller 149
Tabelle 24: Übersicht über die Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller 151
Tabelle 25: Übersicht über die verwendeten Geräte und deren Hersteller 152
Tabelle 26: Übersicht über die verwendete Software und deren Hersteller 154
Tabelle 27: Detaillierte Beschreibung aller verwendeten Ohrmarkierungen der Versuchstiere 156
Tabelle 28: Zeitlicher Ablaufplan 2010 (wichtige Ereignisse sind gelb unterlegt) 157
Tabelle 29: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Kontrollgruppe (Abstrich 2. November 2010) 158
Tabelle 30: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack C Gruppe (Abstrich 2. November 2010) 158
Tabelle 31: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack D Gruppe (Abstrich 2. November 2010) 158
Tabelle 32: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier aus dem Kontrollabstrich vom 11. November 2010 . 159

Tabelle 33: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack C Gruppe nach dem Kontrollabstrich (kursiv) mit verändertem ME und SE 159
Tabelle 34: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack D Gruppe nach dem Kontrollabstrich (kursiv) mit verändertem ME und SE 159
Tabelle 35: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Kontrollgruppe (Abstrich 25. November 2010) ... 160
Tabelle 36: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack C-Gruppe (Abstrich 25. November 2010) .. 160
Tabelle 37: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack D-Gruppe (Abstrich 25. November 2010) .. 160
Tabelle 38: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Kontrollgruppe (Abstrich 3. Dezember 2010) 161
Tabelle 39: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack C Gruppe (Abstrich 3. Dezember 2010) 161
Tabelle 40: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack D Gruppe (Abstrich 3. Dezember 2010) 161
Tabelle 41: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Kontrollgruppe (Abstrich 26./27. Dezember 2010) 162
Tabelle 42: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack C Gruppe (Abstrich 26./27. Dezember 2010) 162
Tabelle 43: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier der Lack D Gruppe (Abstrich 26./27. Dezember 2010) 162
Tabelle 44: Karies-Scoring der Kontrollgruppe aus dem ersten Versuch Tiere 1 bis 12 (E = Enamel caries, Ds = Dentin surface caries, Dm = Dentin medium caries, Dx = Dentin deep caries) 163
Tabelle 45: Karies-Scoring der Lack C-Gruppe aus dem ersten Versuch Tiere 13 bis 24 163
Tabelle 46: Karies-Scoring der Lack D-Gruppe aus dem ersten Versuch Tiere 25 bis 36 163
Tabelle 47: Zeitlicher Ablaufplan 2011 (wichtige Ereignisse sind gelb unterlegt) 164
Tabelle 48: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Fluorid (Abstrich 6. Juni 2011) 165
* inklusive Kontrollabstrich 165
Tabelle 49: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton A (Abstrich 6. Juni 2011) 165
Tabelle 50: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton B (Abstrich 6. Juni 2011) 166
Tabelle 51: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Fluorid (Abstrich 22. Juni 2011) 166
Tabelle 52: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton A (Abstrich 22. Juni 2011) 167
Tabelle 53: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton B (Abstrich 22. Juni 2011) 167
Tabelle 54: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Fluorid (Abstrich 6. Juli 2011) 168
Tabelle 55: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton A (Abstrich 6. Juli 2011) 168
Tabelle 56: Zellzahlen pro µl/Abstrich und Tier Carolacton B (Abstrich 6. Juli 2011) 169
Tabelle 57: Karies-Scoring der Fluoridgruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 1 bis 15 169
Tabelle 58: Karies-Scoring der Carolacton A Gruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 16 bis 30 170
Tabelle 59: Karies-Scoring der Carolacton B Gruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 31 bis 54 170
Tabelle 60: Karies-Scoring der Fluoridgruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 1 bis 15 171
Tabelle 61: Karies-Scoring der Carolacton A Gruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 16 bis 30 171
Tabelle 62: Karies-Scoring der Carolacton B Gruppe aus dem zweiten Versuch Tiere 31 bis 45 172
Tabelle 63: Übersicht über die Gewichtsentwicklung der Tiere der Fluoridgruppe 172
Tabelle 64: Übersicht über die Gewichtsentwicklung der Tiere der Carolacton A Gruppe 173
Tabelle 65: Übersicht über die Gewichtsentwicklung der Tiere der Carolacton B Gruppe 173
Tabelle 66: Übersicht über die verwendeten Primer 174

Tabelle 67: Standardwerte für die qPCR von *S. mutans* 180
Tabelle 68: Standardwerte für die qPCR von *S. wiggsiae* 180
Tabelle 69: Standardwerte für die qPCR von *B. dentium* 180
Tabelle 70: Anwesenheit verschiedener Enzyme des Pyruvat Stoffwechsels in Streptococci sortiert nach phylogenetischen Eigenschaften 181

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Georg Conrads für die Überlassung des Themas und die große Diskussionsbereitschaft, die mich immer motiviert hat noch besser zu werden. Vielen Dank an Prof. Dr. Lars Blank für die unkomplizierte und schnelle Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Apel für die gute Zusammenarbeit während der Tierversuche. Vera möchte ich nicht nur für die tolle Zusammenarbeit während der Rattenversuche danken, sondern auch für die „Abschlussbesprechungen“ und der Tatsache, dass wir so oft einer Meinung sind.
Des Weiteren möchte ich mich bei Lifu Song für die Bereitstellung der Genom-Datenbank bedanken sowie bei allen weiteren Teilnehmern des BioInSys-Projektes.

Ich möchte dem gesamten Team von Flur 46 für das nette Arbeitsklima und die freundliche Aufnahme danken.

PD Dr. Hans-Peter Horz möchte ich für die zahlreichen Ratschläge, Tipps und Diskussionen danken, die man nicht in „Gummibärcheneinheiten“ umrechnen kann.
Ganz besonderer Dank gilt Ilse Seyfarth für ihren festen Glauben an meine Arbeit, Patricia Buttler für ihre Unterstützung und Beate Melzer-Krick für ihre unerschütterliche gute Laune und ihren Optimismus. Ohne Euch wäre ich wahrscheinlich verloren gewesen.
Außerdem möchte ich mich bei Anne, Felix, Hilde, Kamila, Karsten, Lara, Meike, Omar, Olga und Simone für die Zeit zwischen den Versuchen bedanken, ihr habt es immer geschafft mich zum Lachen zu bringen. Simone und Felix möchte ich außerdem für die schöne Zeit in Rostock danken und dafür das ihr einfach da ward!

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Geduld bedanken.
Am meisten möchte ich jedoch meinem Mann René danken. Danke für deine unglaubliche Geduld. Danke, dass du immer für mich da bist und danke, dass du mich zu jeder Zeit bedingungslos unterstützt hast.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter zu Hilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen wurden, sind durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Dies schließt auch Abbildungen und Zeichnungen mit ein.
Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

_____

Anke Rheinberg

Eschweiler, den 12. Februar 2014

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anke Rheinberg, geb. Brock
Geburtsdatum	08. Juli 1985
Geburtsort	Stolberg
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Studium & Schulausbildung

Juni 2012	Auszeichnung mit der Springorum-Denkmünze der RWTH Aachen
November 2010	Beginn der Doktorarbeit am Lehr- und Forschungsgebiet Orale Mikrobiologie und Immunologie im Universitätsklinikum Aachen
Oktober 2010	Diplomabschluss (Titel der Diplomarbeit: „Gesteigerte Itakonsäureproduktion durch induzierte Mutagenese bei *Ustilago maydis*“)
Sommersemester 2007	Vordiplom
Wintersemester 2005 / 2006	Beginn des Diplomstudiengangs Biologie
2005	Allgemeine Hochschulreife
1996 - 2005	Städtisches Gymnasium Eschweiler
1992 - 1996	Katholische Grundschule Bergrath