

**Untersuchung an KB-Zellen zur Freisetzung
proinflammatorischer Interleukine und zu Adhäsion und Invasion
parodontopathogener Bakterien im „Biofilm“**

Dissertation

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

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Michael Kirschbaum
geboren am 08.08.1982 in Gotha

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. S. Eick, Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Glockmann, Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. H. Jentsch, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.09.2008

Abkürzungsverzeichnis

A. a./A. actinomycetemcomitans Y4	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
ATCC	American type culture collection
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMEM	eagle minimum essential medium (Zellkultur-medium)
EPS	extrazelluläre Polysaccharide
F. n./F. nucleatum	Fusobacterium nucleatum
FCS	fetales Kälberserum
FLP	fimbrial low molecularweight protein
HGEC	primäre Epithelzellkultur
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KB-Zellen	permanente orale Epithelzelllinie
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
LtxA	Leukotoxin (von A. actinomycetemcomitans)
MMP	Matrix-Metall-Proteinasen
P. g./P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
PBS	Phosphat-gepufferte Natrium-Chlorid-Lösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNM	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PrtP	Dentilysin (Protease von T. denticola)
REM	Rasterelektronenmikroskop
T. d./ T. denticola	Treponema denticola
T. f./ T. forsythia	Tannerella forsythia

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Parodontalerkrankungen	3
2.1.1 Klassifikation der Parodontalerkrankungen.....	3
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis	4
2.2 Parodontopathogene Bakterien und ihre Virulenzfaktoren.....	5
2.3 Biofilme – Multi-Spezies-Gemeinschaften in der Mundhöhle	15
2.4 Epithelzellen.....	17
2.4.1 Internalisierung parodontopathogener Bakterien in Epithelzellen.....	17
2.4.2 Proinflammatorische Zytokine bei parodontalen Erkrankungen	18
3 Zielstellung	21
4 Material und Methoden	22
4.1 KB-Zellen und deren Passage	22
4.2 Bakterienstämme	23
4.3 Synthetischer Speichel	24
4.4 Vorversuche	24
4.5 Hauptversuche.....	26
4.6 ELISA - Bestimmung der Konzentration von IL-6 und IL-8.....	30
4.7 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen.....	33
4.8 Statistische Datenanalyse	33
5 Ergebnisse	34
5.1 Adhärenz parodontopathogener Bakterien an KB-Zellen.....	34
5.1.1 Aggregatibacter actinomycetemcomitans Y4	34
5.1.2 Porphyromonas gingivalis und Fusobacterium nucleatum ATCC 25586.....	34
5.1.3 Mischinfektionen mit Tannerella forsythia ATCC 43037	36

5.2	Internalisierung parodontopathogener Bakterien in KB-Zellen.....	38
5.2.1	Aggregatibacter actinomycetemcomitans Y4	38
5.2.2	Porphyromonas gingivalis und Fusobacterium nucleatum ATCC 25586.....	38
5.2.3	Mischinfektionen mit Tannerella forsythia ATCC 43037	40
5.3	Interleukine	42
5.3.1	Interleukin-6.....	42
5.3.2	Interleukin-8.....	44
5.4	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	46
6	Diskussion	48
6.1	Methodik	48
6.2	Adhärenz und Internalisierung parodontopathogener Bakterien an bzw. in KB-Zellen	50
6.3	Interleukine	54
7	Schlussfolgerung	62
8	Literaturverzeichnis	63
9	Anhang	78

1 Zusammenfassung

Epidemiologische Studien weisen immer wieder auf hohe Prävalenz parodontaler Erkrankungen in der Gesamtbevölkerung hin. Parodontopathogene Bakterien sind in Form eines Biofilmes in der subgingivalen Plaque assoziiert. Bisherige Untersuchungen an Epithelzellen zu Adhärenz und Internalisierung sowie zur Freisetzung von Interleukinen bezogen sich vorwiegend auf Einzelinfektionen. Die meisten Experimente fanden zudem nur im planktonischen Milieu und über sehr kurze Beobachtungszeiträume statt. Dem Biofilm und der Etablierung verschiedener Mischinfektionen wurde bislang äußerst wenig Beachtung geschenkt.

Ziel dieser In-vitro-Studie war es, die Adhärenz und Invasion parodontopathogener Bakterien an Epithelzellen sowie die damit verbundene Freisetzung von Zytokinen im Zusammenhang mit Speichel zu untersuchen. KB-Zellen (permanente Zelllinie) wurden hierzu mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 und M5-1-2 (klinisches Isolat), *Tannerella forsythia* ATCC 43037, *Treponema denticola* ATCC 35405 einzeln sowie in Form verschiedener Mischinfektionen im planktonischen Milieu und im Zusammenhang mit künstlichem Speichel infiziert. Als Brückenkeim diente *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Nach 1, 6 und 18 h wurde die Zahl der adhärennten und invadierten Bakterien anhand von KBE auf Agarplatten bestimmt. Die IL-6- und IL-8-Spiegel wurden in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen.

Alle Bakterien waren zu Adhärenz an und Invasion in KB-Zellen fähig. Beide Eigenschaften variierten allerdings stammspezifisch. Zumeist veränderte der Zusatz von synthetischem Speichel die Zahl adhärennter Bakterien nur geringfügig. *F. nucleatum* ATCC 25586 hatte weder im planktonischen Milieu noch im „Biofilm“ signifikanten Einfluss auf die Adhärenz der anderen Bakterien. Zahlenmäßig am stärksten adhärennten nach 18 h *T. forsythia* ATCC 43037 und *P. gingivalis* M5-1-2 (3,44 bzw. 4,74% der angeimpften Bakterien) in Mono- und Doppelinfektion mit *F. nucleatum* ATCC 25586. Mit Ausnahme von *T. forsythia* ATCC 43037 internalisierten alle Bakterien im planktonischen Milieu stärker als in den Versuchen mit künstlichem Speichel. Ein signifikanter Einfluss des Speichels auf die Freisetzung von IL-6 aus nicht infizierten KB-Zellen war nicht feststellbar (nach 18 h mit Speichel 6,82 pg/ml, ohne 6,57 pg/ml). Jedoch förderte der Speichel die Freisetzung von IL-8 aus nicht infizierten KB-Zellen (nach 18 h mit Speichel 39,1 pg/ml, ohne 29,9 pg/ml). Verglichen mit diesen erhöhten nur die Monoinfektionen von *F. nucleatum* ATCC 25586 und *A. actinomycetemcomi-*

tans Y4 die Spiegel beider Interleukine. Die höheren Werte wurden dabei für *F. nucleatum* ATCC 25586 bestimmt (25,5 pg IL-6/ml nach 18 h im planktonischen Milieu; 135 pg IL-8/ml nach 18 h mit Speichel). Nach Infektion mit *T. denticola* ATCC 35405 wurden nur sehr geringe Spiegel beider Interleukine gemessen. Mischinfektionen bewirken synergistische und antagonistische Effekte, die auch stammspezifisch sein können. Nach Infektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586 wurden bis zu 233 pg/ml IL-6 (planktonischer Versuch) und 102,4 pg/ml IL-8 (künstlicher Speichel) gemessen. Demgegenüber war nach Infektion mit *P. gingivalis* M5-1-2 und *F. nucleatum* ATCC 25586 nie eines der beiden Zytokine nachweisbar. Nach Vierfachinfektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277, *T. denticola* ATCC 35405, *T. forsythia* ATCC 43037 und *F. nucleatum* ATCC 25586 wurden initial 6,5 pg/ml IL-6 (1 h) im Biofilm detektiert, nach 18 h lediglich 2,8 pg/ml; IL-8 war nie nachweisbar.

Alle Ergebnisse weisen auf einen invasionsinhibierenden Effekt von Speichel bzw. Biofilmen hin. Die Bakterien benötigen initial mehr Zeit für die Besiedlung von Biofilmen und die Adhärenz an Epithelzellen. Die für viele Spezies in beiden Milieus dennoch hohe Zahl internalisierter Bakterien nach 18 h ist vermutlich neben einer progressiven Invasion der Bakterien auch einer intrazellulären Vermehrung zuzuschreiben. Nicht infizierte KB-Zellen bilden unter Zusatz von künstlichem Speichel (Biofilm) mehr IL-8. Speichelbestandteile fördern somit die Freisetzung von IL-8 aus KB-Zellen. Mischinfektionen unter Beteiligung von Bakterien des „Roten Komplexes“ verändern massiv die Freisetzung von Interleukinen. *F. nucleatum* ATCC 25586 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 tragen durch Erhöhung des IL-8-Spiegels zur Aufrechterhaltung eines chronisch-entzündlichen Milieus bei. Proteasen von *T. denticola* ATCC 35405 und *P. gingivalis* M5-1-2 hingegen scheinen in der Lage, IL-8 vollständig abzubauen zu können. Beide Bakterien hemmen folglich die wirtseigene Abwehr und fördern damit die Proliferation parodontopathogener Bakterien.

Alle Untersuchungen zeigen deutlich die immunmodulatorische Wirkung des Speichels und dessen Einfluss auf die Interaktion von Bakterien und Wirtszellen. Ein komplexer Biofilm wie an festen Oberflächen bildet sich jedoch nicht. Trotzdem zeigen die Experimente, dass bisher für Einzelinfektionen im planktonischen Milieu ermittelte Werte nicht einfach auf speichelassoziierte Mischkulturen übertragbar sind.

2 Einleitung

2.1 Parodontalerkrankungen

2.1.1 Klassifikation der Parodontalerkrankungen

Die zur Zeit gültige Klassifikation der Parodontalerkrankungen wurde auf dem *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* in Oak Brook, Illinois, USA, im Jahre 1999 festgelegt (Armitage 1999).

In der Kategorie I sind alle Formen *gingivaler Erkrankungen* zusammengefasst. Hierzu zählen neben Plaque-assoziierten gingivalen Erkrankungen auch nicht-plaque-induzierte Gingivitiden (z. B. viral- oder pilzbedingte Erkrankungen der Gingiva) oder systemische Erkrankungen, die sich an der Gingiva manifestieren.

Hinter der Kategorie II obiger Klassifikation verbirgt sich die *chronische Parodontitis*. Mit einem Anteil von 90-95% ist sie die häufigste Form aller Parodontitiden. Charakteristisch ist ein gehäuftes Auftreten im Erwachsenenalter. Es besteht aber auch die Möglichkeit einer Manifestation im Kindes- und Jugendalter. Ausgelöst wird die Erkrankung durch eine kleine Gruppe parodontopathogener Bakterien in der oralen Plaque (Paster et al. 2001, Noiri et al. 2001), wobei *Porphyromonas gingivalis* zusammen mit *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* als wichtige Leitkeime der chronischen Parodontitis gelten (Socransky et al. 1998, Slots 1999, Ezzo und Cutler 2003). Neben gelegentlich vorkommenden Aktivitätsschüben zeigt die Erkrankung eine überwiegend langsame Progression. Das Ausmaß der parodontalen Destruktion steht in direktem Zusammenhang mit der Menge an akkumulierter Plaque. Entsprechend der Anzahl der befallenen Zahnflächen lässt sich eine Unterteilung in eine lokalisierte (weniger als 30% der Zahnflächen befallen) oder generalisierte Form vornehmen (Gängler et al. 2005).

Kategorie III der internationalen Einteilung von 1999 (Armitage 1999) ist die *aggressive Parodontitis*. Charakteristisch für diese Form der Parodontitis ist das Vorkommen von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Slots 1999). Deutliches Kennzeichen ist das Missverhältnis zwischen der Menge bakterieller Ablagerungen und dem Ausmaß der Gewebsdestruktion. Die lokalisierte Form dieser Erkrankung beginnt zunächst an den ersten Molaren und den Schneidezähnen. Der Übergang zur generalisierten Form ist dabei fließend. Im Gegensatz zur chro-

nischen Parodontitis sind die Patienten meist jünger als 30 Jahre. Eine familiäre Häufung ist zu beobachten. Die Betroffenen weisen eine abnormale Phagozytenfunktion sowie hyper-responsive Makrophagen mit einer erhöhten Produktion von PGE₂ und IL-1β auf (Lang et al. 1999). Klinisch ist die aggressive Parodontitis durch häufige Aktivitätsschübe und eine rasche Progression gekennzeichnet.

Die Kategorien IV-VIII der Klassifikation von 1999 beinhalten folgende Krankheitsbilder: Parodontitiden als Manifestation systemischer Erkrankungen, nekrotisierende Parodontalerkrankungen, Parodontalabszesse, Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen und entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände des Parodonts (Armitage 1999).

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis

In der Mundhöhle des Menschen befinden sich ca. 500 - 600 Bakterienarten (Socransky und Haffajee 1994, Kroes et al. 1999, Kazor et al. 2003), von denen etwa 400 Spezies die subgingivale Plaque bevölkern (Paster et al. 2001).

Mikrobielle Ursache der Parodontitis sind orale Bakterien (Socransky und Haffajee 1992, Moore und Moore 1994), die von Socransky et. al. (1998) entsprechend ihrer Bedeutung in Farbkomplexe kodiert wurden. *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* – den drei Vertretern des „roten Komplexes“ – wird gemeinsam mit *A. actinomycetemcomitans* das größte Pathogenitätspotential zugeschrieben. *F. nucleatum* als so genannter „Brückenkeim“ (Kolenbrander 2000) wird dem orangefarbenen Komplex zugeordnet und scheint eine wichtige Rolle bei der Initiation parodontaler Läsionen zu spielen (Moore und Moore 1994). Im Gegensatz dazu werden die Vertreter des gelben und des lilafarbenen Komplexes als kommensale Bakterien bezeichnet, denen keine direkte Virulenz zugeschrieben wird (Roberts und Darveau 2002). Neben diesen oralen Mikroorganismen tragen eine ganze Reihe von Risikofaktoren zur Pathogenese der Parodontitis bei: zunehmendes Alter, Rauchen, schlechte Mundhygiene, niedriger sozioökonomischer Status, systemische Erkrankungen, genetische Aspekte, Immunsuppression, Mangelernährung, Stress und Okklusionstrauma (Kinane 2001).

Ursächlich für die kontinuierliche Schädigung parodontaler Gewebe ist die Organisation von Bakterien in einer Plaque, deren Bildung in mehreren Phasen verläuft. Grundlage ist die Ausbildung einer aus Proteinen bestehenden Pellikelschicht auf der Zahnoberfläche. Initial wird

diese Schicht durch Pionierkeime wie *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces naeslundii* und *Actinomyces viscosus* besiedelt (Roberts und Darveau 2002). Diese Bakterien weisen ein konfluierendes Wachstum auf und bilden nach 8 - 12 h einen dichten Bakterienrasen. Mit weiterem Dickenwachstum nimmt der O₂-Gehalt in der Plaque deutlich ab und es siedeln sich zunehmend anaerobe Mikroorganismen an. Unter diesen kommt *F. nucleatum* eine Schlüsselrolle zu, da es sowohl mit Pionierkeimen als auch mit Spätbesiedlern wie *P. gingivalis* und *T. forsythia* koaggregieren kann (Kolenbrander und London 1993). Im weiteren Verlauf wandelt sich die initiale grampositive und aerobe Bakterienflora in eine gramnegative und anaerobe um. Dies ist mit einer Zunahme der Pathogenität verbunden. Mit dem Dickenwachstum findet gleichzeitig auch ein Tiefenwachstum der Plaque statt. Damit ist die Grundlage für die Etablierung einer subgingivalen Plaque geschaffen (Sanderink et al. 2004).

Voraussetzung für die Etablierung einer Parodontitis ist die Gingivitis. Der Umkehrschluss, dass aus einer Gingivitis immer eine Parodontitis entsteht, ist jedoch nicht zulässig. Die Entstehung der Parodontitis mit Beteiligung aller Strukturen des Parodonts – Gingiva, Desmodont, Alveolarknochen, Wurzelzement – ist ein sukzessiver Prozess. Das Spektrum reicht von der Plaquebildung über die Phasen der Entstehung einer Gingivitis – Initiaalläsion, Frühläsion, etablierte Läsion – bis hin zur eigentlichen Entstehung einer Parodontitis – der fortgeschrittenen Läsion mit Attachmentverlust. Die Parodontitis als solche ist dennoch keine interindividuell einheitlich verlaufende Erkrankung. Vielmehr wird sie durch Risikofaktoren, wirtsspezifische Unterschiede und Besonderheiten der verantwortlichen Bakterien modifiziert (Genco 1996). Seitens des Wirtes gibt es vielfältige Möglichkeiten, sich im Rahmen der angeborenen und erworbenen Immunität gegen eindringende Noxen zu verteidigen.

2.2 Parodontopathogene Bakterien und ihre Virulenzfaktoren

Im Folgenden sollen die in der vorliegenden Studie verwendeten und für die Pathogenese der Parodontitis entscheidenden Bakterien unter besonderer Berücksichtigung ihrer Virulenzfaktoren näher charakterisiert werden.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

A. actinomycetemcomitans, dessen engster Verwandter *H. influenzae* ist, ist ein gramnegativer, unbeweglicher, fakultativ anaerober Kokkobazillus (Henderson et al. 2003). Erst kürzlich

wurde *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* umbenannt (Norskov-Lauritsen und Kilian 2006). Entsprechend seiner mikroaerophilen Eigenschaften weist er das stärkste Wachstum bei 5% CO₂ und 37°C auf. Im Gegensatz zu anderen parodontopathogenen Bakterien ist *A. actinomycetemcomitans* sowohl bei parodontaler Gesundheit als auch bei sämtlichen Formen der Parodontitis nachweisbar (Holttä et al. 1994), nicht aber bei Zahnlosigkeit (Wilson und Henderson 1995). Er ist das Schlüsselbakterium der lokalisierten aggressiven Parodontitis (Slots und Ting 1999). Darüber hinaus ist er bei extraoralen Infektionen anzutreffen (van Winkelhoff und Slots 1999, Fine et al. 2006) und gilt als Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen (Genco et al. 2002).

Die Adhärenz des Bakteriums an Strukturen der Mundhöhle wird überwiegend durch aus Flp-Monomeren aufgebaute Fimbrien vermittelt (Inoue et al. 1998). Diese gehen jedoch nach mehrmaliger Subkultur des Bakteriums *in vitro* verloren. Stämme mit Fimbrien zeigen dabei ein bedeutend besseres Adhärenzverhalten als Stämme ohne Fimbrien (Rosan et al. 1988). Weitere Moleküle wie z. B. Tad und EmaA sind ebenfalls für die Adhärenz verantwortlich (Kachlany et al. 2000b, Kachlany et al. 2001, Mintz 2004).

Analog zu anderen invasiven Bakterien werden für die Internalisierung von *A. actinomycetemcomitans* sowohl bakterielle als auch wirtszelluläre Mechanismen benötigt (Sreenivasan et al. 1993). Hierbei sind glatte Formen des Bakteriums (*A. actinomycetemcomitans* Y4) invasiver als diejenigen mit Fimbrien (Lepine et al. 1998). Dies zeigt die Internalisierung als einen von der Adhärenz unabhängigen Prozess, welcher rezeptorvermittelt über Transferrinrezeptoren und Integrine abläuft (Henderson et al. 2003). Versuche an KB-Zellen zeigten sehr schnelle Invasionszeiten (Meyer et al. 1996). Diese Autoren wiesen zudem eine schnellere Replikation des Bakteriums im Zytoplasma der Epithelzelle gegenüber der Vermehrung außerhalb von Wirtszellen nach. Nach erfolgter Invasion und Replikation verlässt *A. actinomycetemcomitans* die Wirtszelle, um zugleich in die nächste benachbarte zu invadieren (Meyer et al. 1999). Die mit *A. actinomycetemcomitans* infizierten oralen Epithelzelle leiten die Apoptose ein (Kato et al. 2000). Da das Bakterium fast unbemerkt in die Epithelzellen eindringt, nimmt es eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der aggressiven Parodontitis ein.

Zum vielfältigen Repertoire der Virulenzfaktoren gehört das für gramnegative Bakterien typische LPS. Entsprechend des Aufbaus dieses Moleküls kann die Klassifikation von *A. actinomycetemcomitans* in 6 Serotypen (a-f) vorgenommen werden (Kaplan et al. 2001). Die Pati-

enten sind dabei meist von nur einem Serotyp befallen (Saarela et al. 1999). Serotyp c kommt vor allem bei parodontaler Gesundheit vor. Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis sind Träger des Serotyp b, zu dem auch der Stamm Y4 gehört. Verglichen mit dem LPS von *P. gingivalis* ist das LPS von *A. actinomycetemcomitans* potenter in der Induktion des Knochenabbaus (Holt und Ebersole 2005).

A. actinomycetemcomitans synthetisiert verschiedene Toxine. Eines ist das Leukotoxin (LtxA) (Henderson et al. 2003). LtxA gehört zur RTX-Toxin-Familie und bewirkt eine Porenbildung in Leukozyten. Diese Zellspezifität beruht auf der Bindung des Toxins an den β_2 -Integrinrezeptor, LFA-1, dieser Zellen (Lally et al. 1997). Neben der Förderung der Degranulation von PNMs und der Apoptose von Leukozyten (Lally et al. 1999) ist es in höheren Konzentrationen für deren nekrotischen Zelltod und damit für eine verstärkte Freisetzung wirtseigener Proteasen verantwortlich (Korostoff et al. 1998, O'Brien-Simpson et al. 2004). Die freigesetzte Menge an LtxA variiert stammspezifisch. Der Stamm Y4 ist ein mittelmäßiger Produzent von Ltx (Kolodrubetz et al. 1996).

Ein zweites Toxin ist das zytoletale Toxin. Dieses besitzt DNase-Aktivität und stoppt den Zellzyklus der Zielzelle in der G2-Phase (Elwell und Dreyfus 2000, Lara-Tejero und Galan 2000). Hauptaufgabe liegt in der Dysregulation der T-Zellimmunität durch seine Apoptose-induzierende Eigenschaft in T-Lymphozyten (Shenker et al. 2000, Shenker et al. 2001).

Über die enzymatischen Eigenschaften des Bakteriums ist nur wenig bekannt. So ist eine Trypsin-ähnlichen Protease beschrieben, welche für die Spaltung von Fibrinogen und Kollagen I zuständig ist. Überdies mindert diese die proliferativen Eigenschaften gingivaler Epithelzellen (Wang et al. 2001). Saure und alkalische Phosphataseaktivität sind mit Knochenabbau assoziiert. In diesem Zusammenhang spielt auch das Hitzeschockprotein GroEL eine wichtige Rolle (Henderson et al. 2003).

Zahlreiche immunsuppressive Mechanismen wurden beschrieben. So exprimiert *A. actinomycetemcomitans* OMP34, welches als Fc-Bindungsprotein agiert und die Phagozytose des Bakteriums verhindert (White et al. 1998). Darüber hinaus ist das Bakterium resistent gegenüber der Wirkung von Defensinen (Wilson und Henderson 1995) und zum Abbau von IgG, IgA und IgM befähigt (Gregory et al. 1992).

Demgegenüber besitzt *A. actinomycetemcomitans* aber auch immunstimulatorische Eigenschaften. Einige Zellwandstrukturen wirken mitogen auf B-Lymphozyten. So sind die gegen *A. actinomycetemcomitans* gerichteten erhöhten Antikörper-Titer erklärbar. Ein weiteres Protein wirkt proliferativ auf B-Zellen (Jeong et al. 2000).

Zu den Freisetzungsmechanismen von Interleukinen aus Epithelzellen ist nur sehr wenig bekannt. So zeigen Epithelzellen eine erhöhte Expression von IL-8 nach Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (Huang et al. 1998b, Sfakianakis et al. 2001, Uchida et al. 2001).

Fusobacterium nucleatum

F. nucleatum ist ein gramnegatives, spindelförmiges, nicht bewegliches Stäbchen von 5-10 µm Länge. Anders als die meisten Anaerobier vermehrt es sich auch in Gegenwart von bis zu 6% O₂ im umgebenden Milieu (Bolstad et al. 1996). Die Spezies *F. nucleatum* wird in drei Subspezies untergliedert: *nucleatum* (Referenzstamm ATCC 25586), *polymorphum* und *vincentii* (Dzink et al. 1990).

Neben seinem Vorkommen in der oralen Plaque ist *F. nucleatum* auch bei extraoralen Infektionen anzutreffen (Bultink et al. 1999, Bauer et al. 2000, Huang et al. 2004). *F. nucleatum* ist sowohl an aktiven als auch inaktiven Stellen der Parodontitis zu finden (Kolenbrander und London 1993). Es besitzt die Eigenschaft gleichzeitig an Früh- und Spätbesiedler zu binden (Kolenbrander 2000). Mit dieser Fähigkeit zur inter- und multigenerischen Koaggregation stellt *F. nucleatum* eine Verbindung zwischen früher und reifer Plaque her. Mischkulturen mit anderen Bakterien sind dabei pathogener als alleinige *F. nucleatum*-Kulturen (Baumgartner et al. 1992, Sharma et al. 2005).

Eine Adhärenz an viele Strukturen der Mundhöhle, wie Epithelzellen, Kollagen und Prolinreiche Glykoproteine des Speichels konnte nachgewiesen werden (Bolstad et al. 1996, Han et al. 2000). Die Bindung an KB-Zellen wird dabei entscheidend durch FadA (*Fusobacterium* Adhäsins A) beeinflusst, was Untersuchungen mit FadA-defizienten Mutanten zeigten (Han et al. 2005). Von Han et al. (2000) konnte die Internalisierung von *F. nucleatum* in Epithelzellen nachgewiesen werden. Der Stamm ATCC 25586 war dabei besonders invasiv.

Einfluss auf die körpereigene Abwehr nimmt *F. nucleatum* durch eine Epithelzell-vermittelte Freisetzung von antimikrobiell wirksamen β -Defensin-2 und -3 (Krisanaprakornkit et al.

2000, Yin und Dale 2007). Selbst ist es resistent gegenüber diesen Peptiden. *F. nucleatum* ist ein sehr starker Induktor der IL-8-Sekretion aus Epithelzellen (Darveau et al. 1998, Han et al. 2000). Gerardo et al. (2000) konnten die Existenz eines die B- und T-Zellantwort unterdrückenden immunsuppressiven Proteins (FIP) nachweisen.

Weitere Virulenzfaktoren dieser Spezies sind neben dem LPS auch Oberflächenmoleküle, die an der Koaggregation mit anderen Bakterien und Invasionsprozessen beteiligt sind. Von diesen Molekülen verfügt FomA über Porin-bildende Eigenschaften (Kleivdal et al. 1995).

Der Metabolismus dieses Bakteriums ist auf die Verstoffwechslung von Aminosäuren und Peptiden angewiesen. *F. nucleatum* selbst verfügt zwar über intrinsische proteolytische Aktivität (Ogawa et al. 2006). Diese ist jedoch nur sehr schwach, so dass *F. nucleatum* auf die Bereitstellung von Aminosäuren durch andere Bakterien (z. B. *P. gingivalis*) angewiesen ist (Bolstad et al. 1996). Stoffwechselprodukte wie Azetat, Buttersäure, Propionat und Sulfide unterstützen die Penetration in Epithelzellen und inhibieren gleichzeitig die Proliferation von Fibroblasten (Bolstad et al. 1996).

Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis ist ein gramnegatives, anaerobes und asaccharolytisches Bakterium. Es ist schwarz pigmentiert. Dies ist auf die Akkumulation von Hämin auf der Zelloberfläche zurückzuführen. *P. gingivalis* ist das Schlüsselbakterium chronischer Parodontitiden (Genco et al. 1998, Socransky et al. 1998, Slots 1999, Ezzo und Cutler 2003). Die Übertragung erfolgt von Mensch zu Mensch, wobei der Speichel als entscheidender Vektor fungiert (Greenstein und Lamster 1997).

P. gingivalis zeigt in Analogie zu anderen parodontopathogenen Bakterien ein ausgeprägtes Adhärenzverhalten. Beteiligt daran sind zelluläre Komponenten wie Fimbrien, Proteasen, Hämagglutinine und LPS. *P. gingivalis* adhäriert u. a. an Epithelzellen (Isogai et al. 1988, Weinberg et al. 1997), Speichelkomponenten wie Prolin-reiche Proteine und Glykoproteine (Amano et al. 1996, Amano et al. 1998), Hämoglobin (Amano et al. 1995), extrazelluläre Matrix (Amano 2003), Fibrinogen (Naito und Gibbons 1988, Nagata et al. 1994), Fibronectin (Murakami et al. 1996), Statherine, Laktoferrin (Sojar et al. 1998) und Mikroorganismen wie *Streptococcus gordonii* und *Streptococcus oralis* (Lamont et al. 1993). Das Adhärenzverhalten ist stammspezifisch verschieden stark ausgeprägt (Eick et al. 2002).

P. gingivalis zeigt nach erfolgter Adhärenz ein typisches Internalisierungsverhalten. Neben der Invasion in primäre und transformierte Monolayerkulturen gingivaler Epithelzellen (Lamont et al. 1992, Duncan et al. 1993, Lamont et al. 1995, Njoroge et al. 1997, Weinberg et al. 1997) dringt er auch in mehrschichtige Epithelien ein (Andrian et al. 2004). Zudem wurde die Invasion in Herzzellen und Endothelzellen nachgewiesen (Dorn et al. 1999, Dorn et al. 2000). Als Rezeptor dient das $\alpha 5\beta 1$ -Integrin auf den Wirtszellen (Nakagawa et al. 2002).

Eingedrungene *P. gingivalis*-Bakterien besitzen die Fähigkeit, intrazellulär zu persistieren und sich dort zu vermehren (Sandros et al. 1993, Lamont et al. 1995, Houalet-Jeanne et al. 2001, Eick et al. 2006). Im Allgemeinen ist *P. gingivalis* gegenüber Epithelzellen nicht zytotoxisch (Eick et al. 2002). Es konnte sogar die Unterdrückung der Apoptose von KB-Zellen bis zu 24 h nach Infektion nachgewiesen werden (Nakhjiri et al. 2001). Die intrazelluläre Persistenz in Epithelzellen verbunden mit einer erhöhten IL-8-Freisetzung könnte einer der Hauptgründe für das Aufrechterhalten einer chronischen parodontalen Infektion sein (Eick et al. 2006).

Er besitzt zahlreiche Möglichkeiten, das Immunsystem zu stimulieren und zu unterdrücken. Das LPS von *P. gingivalis* hat im Vergleich zu anderen gramnegativen Bakterien eine geringere Endotoxin-Aktivität. Neben der Aktivierung des Komplementsystems (Lamont und Jenkinson 1998) trägt es zum Knochenabbau bei (Chiang et al. 2002, Holt und Ebersole 2005). Gereinigtes LPS gilt als Induktor einer IL-8-Sekretion (Sugiyama et al. 2002).

Ein zweiter wichtiger Virulenzfaktor von *P. gingivalis* sind dessen Fimbrien, die in zwei Typen klassifiziert werden können: major fimbriae (FimA) und minor fimbriae (Mfa1). Die Hauptfimbrien (FimA) sind aus Fimbrillin-Monomeren aufgebaut. Von diesen gibt es sechs verschiedene Genotypen: I-V und Ib (Nakagawa et al. 2000, Nakagawa et al. 2002, Amano et al. 2004). Typ II zeigt eine auffallend häufige Assoziation mit schweren Formen chronischer Parodontitiden (Eick et al. 2002, Amano et al. 2004). Typ I hingegen ist mit parodontaler Gesundheit vergesellschaftet (Amano et al. 2000). Die meisten Betroffenen sind von nur einem Typ kolonisiert (Asikainen et al. 1997, Lamont und Jenkinson 2000). Es wurde auch von Infektionen durch multiple Klone berichtet (Amano et al. 1999, Eick et al. 2002). Versuche mit FimA-defizienten Mutanten zeigten ein nur geringes Adhärenz- bzw. Internalisierungsverhalten (Njoroge et al. 1997, Weinberg et al. 1997). Die Bedeutung der Fimbrien liegt als Hauptadhärenzfaktor in der Beteiligung an fast allen Bindungsaktivitäten (Yilmaz et al. 2002).

Ein dritter Virulenzfaktor sind die Proteasen von *P. gingivalis*. Unter diesen spielen die Gingipaine eine entscheidende Rolle. Sie bewirken 85% der gesamten bakteriellen proteolytischen Aktivität (Potempa et al. 2003). Die Gingipaine werden in zwei Gruppen eingeteilt: Arginin-spezifische Proteasen (HRgpA und RgpB) und eine Lysin-spezifische Protease (Kgp) (Mikolajczyk-Pawlinska et al. 1998). HRgpA, RgpB und Kgp können sowohl in zellgebundener als auch sezernierter Form vorkommen (Travis et al. 1997, Kadowaki et al. 2000). Mikolajczyk-Pawlinska et al. (1998) wiesen für die lösliche Form die Fähigkeit nach, vor dem Abbau von IL-8 dieses zunächst in eine potentere Form umzuwandeln. Die membrangebundene Form bewirkte hingegen den sofortigen Abbau sezernierten IL-8. Die Aufgaben der Gingipaine umfassen ein vielfältiges Spektrum. Zum einen sind sie an der Erschließung kryptischer Bindungsdomänen auf Epithelzellen und der Aktivierung der Blutgerinnung (Imamura et al. 1997, Imamura et al. 2001) und des Kallekrein/Kinin-System (Hinode et al. 1992) beteiligt. Sie bauen folgende Strukturen ab: Interleukine und deren Rezeptoren (Fletcher et al. 1997, Banbula et al. 1999, Oleksy et al. 2002), Zelladhäsions- und Verbindungsmoleküle (Katz et al. 2002, Tada et al. 2003), Immunzellrezeptoren (Genco et al. 1999, Potempa et al. 2000, Kitamura et al. 2002), Immunglobuline (Abe et al. 1998) und extrazelluläre Matrix (Potempa et al. 2000). Gingipaine bauen Gewebe-Proteinase-Inhibitoren ab und sind gleichzeitig resistent gegenüber ihnen (Grenier 1996, Grenier und Mayrand 2001). Weiterhin tragen sie sowohl zur Aktivierung, als auch zum Abbau des Komplementsystems bei (Popadiak et al. 2007). Darüber hinaus aktivieren sie MMPs (DeCarlo et al. 1998). Weitere Proteasen sind: Dipeptidyl-Aminopeptidase IV, Tripeptidylpeptidase und Periodontain (Nelson et al. 1999, Kumagai et al. 2005).

Ein weiterer Virulenzfaktor sind die durch Stress gebildeten Hitzeschockproteine (GroEL, GroES, HtpGT) (Hosogi und Duncan 2005, Argueta et al. 2006). Einige Stämme von *P. gingivalis* bilden zudem eine Polysaccharidkapsel (Slots 1998). Diese erschwert die Phagozytose des Bakteriums und weist weitere antigene Eigenschaften auf (Lamont und Jenkinson 1998).

P. gingivalis benötigt Peptide zur Energiegewinnung (Takahashi et al. 2000). Diese werden durch die Aktivität wirtseigener Enzyme zur Verfügung gestellt. Hämoglobin stellt dabei nicht nur eine essentielle Eisen-, sondern auch eine wichtige Eiweißquelle dar (Dashper et al. 2004). Stoffwechselendprodukte sind vor allem Buttersäure und Sulfatverbindungen (H_2S and CH_3SH), die sich toxisch gegenüber Wirtsgeweben verhalten (Kurita-Ochiai et al. 2000).

Tannerella forsythia

Tannerella forsythia ist ein gramnegatives, anaerobes fusiformes Stäbchen mit asaccharolytischen Eigenschaften. Zunächst ging das Bakterium unter der Bezeichnung *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1979) in die Literatur ein. Später wurde auf Basis von DNA-Analysen ein von den *Bacteroides*-Arten unabhängiger neuer Genus *Tannerella* mit nur einer Spezies, *Tannerella forsythia*, geschaffen (Sakamoto et al. 2002).

Häufig wird *T. forsythia* gemeinsam mit *P. gingivalis* aus Proben subgingivaler Plaque bei Patienten mit chronischer Parodontitis isoliert (Tanner et al. 1998, Grossi 2001). Sein Vorkommen ist mit schweren Formen der Parodontitis, wie sie oftmals bei älteren Patienten auftreten, assoziiert (Socransky und Haffajee 2002, Yang et al. 2004). Die Kultivierung des Bakteriums ist ziemlich kompliziert. Sie erfordert aufwendige Wachstumsbedingungen wie Hämmin, Menadion (Vit. K), L-Cystein und N-Acetylmuraminsäure (Wyss 1989).

Im Gegensatz zu anderen oralen Bakterien bei denen eine Eltern/Kind-Koinfektion in 17-43% der Fälle vorkommt, findet diese für *T. forsythia* in 60% der Fälle statt (Okada et al. 2004).

Die Datenlage zu Adhärenz und Invasion ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch sehr lückenhaft. Erst kürzlich konnte die Fähigkeit zur Koaggregation mit *P. gingivalis*, *F. nucleatum* und *T. denticola* nachgewiesen werden (Kapatral et al. 2002). *T. forsythia* ist in der Lage, in KB-Zellen zu invadieren. Die Bakterien werden dabei von Anteilen der Wirtszellmembran umgeben, was eine Trigger-Funktion auf den Internalisierungsprozess auszuüben scheint. Die internalisierten Bakterien siedelten sich um den Zellkern an (Sabet et al. 2003).

T. forsythia verfügt über eine große Vielfalt an Virulenzfaktoren. BfLP, ein Lipoprotein von *T. forsythia*, ist an der Freisetzung von IL-6 und TNF- α aus Fibroblasten beteiligt und induziert durch Aktivierung der Caspase 8 die Apoptosemechanismen in der Zielzelle (Hasebe et al. 2004, Holt und Ebersole 2005). Proteinasen wie die N-Benzoyl-Val-Gly-Arg-p-Nitroanilid-spezifische Protease (Sharma et al. 1998), die prtH Protease (Saito et al. 1997), die durch das sia HI-Gen verschlüsselte Sialidase (Ishikura et al. 2003) und die N-acetyl- β -Glucosaminidase (Hughes et al. 2003) bestimmen die enzymatische Aktivität des Bakteriums. Aufgabe dieser Enzyme ist neben der Bereitstellung von Nährstoffen das Eindringen in wirtseigene Gewebe.

Ein bedeutender Virulenzfaktor von *T. forsythia* ist das Oberflächenprotein, BspA (Bacteroides surface protein A) (Sharma et al. 1998). Dieses wurde auch in der sezernierten Variante nachgewiesen. BspA ist ein Leucin-reiches Protein. Die Aneinanderreihung von mehreren Leucin-Resten hat sich dabei als starkes Proteinbindungsmotiv erwiesen (Ikegami et al. 2004), welches u. a. die Adhäsion an Fibronectin, Fibrinogen und Matrixbestandteile vermittelt. Abgesehen davon induziert BspA die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α (Hajishengallis et al. 2002) aus Wirtszellen. Bei der Koaggregation mit *F. nucleatum* scheint BspA nach gegenwärtigem Kenntnisstand, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Inagaki et al. 2005, Sharma et al. 2005).

Ein anderer typischer Virulenzfaktor ist eine spezielle Oberflächenschicht, S-Layer (Sabet et al. 2003). Untersuchungen zeigten den strukturellen Aufbau dieser Schicht aus Proteinen mit einer Größe von 200 und 270 kDa (Higuchi et al. 2000, Sabet et al. 2003, Yoneda et al. 2003). Neben der Schutzfunktion gegen exogene Faktoren, wird dieser Schicht Bedeutung bei der Adhärenz und Invasion an und in KB-Zellen und der Hämagglutination beigemessen.

Treponema denticola

Treponema denticola ist ein gramnegatives, obligat anaerobes Bakterium, das aufgrund der Existenz von Flagellen zu einer ausgeprägten Beweglichkeit befähigt ist. Es ist einer der derzeit 50 bekannten Phylotypen oraler Spirochäten (Ellen und Galimanas 2005). Sein gehäuftes Vorkommen ist an die Parodontitis geknüpft (Kigure et al. 1995). An Stellen mit fortgeschrittenen parodontalen Läsionen kann es 50% der Gesamtbakterienmenge ausmachen, bei parodontaler Gesundheit hingegen ist das Bakterium kaum oder gar nicht nachweisbar (Moore und Moore 1994). *T. denticola* bewirkt entscheidend die Aufrechterhaltung chronischer Infektionen (Ellen und Galimanas 2005). Bedingt durch sein hohes Adhärenzlevel an Titan spielt es eine entscheidende Rolle bei der Periimplantitis (Sela 2001). Für *T. denticola* wird ein äußerst schwieriges Kulturverhalten beschrieben (Chan et al. 1993, Ellen und Galimanas 2005).

In Analogie zu anderen parodontopathogenen Bakterien präsentiert *T. denticola* ein ausgeprägtes Adhärenzverhalten. Einerseits bindet das Bakterium an Epithelzellen und Fibroblasten (Weinberg und Holt 1990, Ellen und Galimanas 2005), andererseits an Hydroxylapatit, Fibronectin, Laminin, Kollagen, Glykosaminoglykane und Hyaluronsäure (Umemoto et al. 1997, Li et al. 1999, O'Brien-Simpson et al. 2004, Holt und Ebersole 2005). Vermittelt werden diese

Prozesse durch zahlreiche Adhäsine wie Msp (major surface protein), Dentilysin (Chymotrypsin-ähnliche Protease) und LrrA (Leucin-reiches Protein) (Ikegami et al. 2004).

Koaggregationen zu anderen Bakterien wie *P. gingivalis* (Onagawa et al. 1994) und *F. nucleatum* (Kolenbrander et al. 1995) gehen mit Exazerbationserscheinungen parodontaler Entzündungsprozesse einher. Mischinfektionen mit *P. gingivalis* werden dabei als wichtiger Schritt am Beginn parodontaler Erkrankungen betrachtet. Im Kontext der Biofilmbildung spielt auch ein anderes Protein von *T. denticola* mit der Bezeichnung CfpA (zytoplasmatisches Filament-Protein) eine wichtige Rolle (Vesey und Kuramitsu 2004).

Gegenüber Epithelzellen zeigt das Bakterium ein unterschiedliches Verhalten. Teilweise werden KB-Zellen von ihrer Unterlage abgelöst und somit der kontrollierte Zelltod gefördert (Fenno et al. 1998). Andererseits bleiben Haftung und Lebensfähigkeit erhalten, was jedoch zu Lasten des Gesamtvolumens der KB-Zellen geht (De Filippo et al. 1995).

T. denticola besitzt die Fähigkeit zur Invasion in Epithelzellen (Chi et al. 2003). Die Penetration tiefer liegender Gewebsschichten ist auf die Zerstörung von „tight junctions“ in der Epithelzellschicht zurückzuführen (Chi et al. 2003). Die damit in Zusammenhang stehende Destruktion der Epithelzellbarriere trägt entscheidend zur Initiation und Progression der Parodontitis bei und erlaubt anderen Bakterien das Überleben im Milieu der parodontalen Tasche sowie die Kolonisation subgingivaler Plaque-Formationen (Hashimoto et al. 2003).

T. denticola zeigt ein ausgesprochen starkes proteolytisches Verhalten. Ausgestattet mit einer Chymotrypsin-ähnlichen Protease ist Dentilysin zum Abbau von Kollagen IV, Laminin, Fibronectin, Hyaluronsäure (Grenier et al. 1990, Ishihara et al. 1996) sowie Transferrin, Fibrinogen, IgA, IgG, α 1-Antitrypsin, α 2-Makroglobulin, Antithrombin III, Angiotensin I und Substanz P (Makinen et al. 1995, Grenier 1996) befähigt. Weiterhin konnte ein sehr starker Abbau von IL-8 nachgewiesen werden (Deng et al. 2001, Asai et al. 2003). Außerdem werden durch Dentilysin MMPs und wirtseigene Prokollagenasen aktiviert (Holt und Ebersole 2005), wodurch der Abbau parodontaler Gewebe eingeleitet wird. Ferner gehören Prolin-Amino-peptidase, Prolin-Imino-peptidase, Glutamylpeptidase, Phenylalaninprotease, Hyaluronoglycosaminidase (Scott et al. 1996, Sela 2001) und ein Trypsin-ähnliches Enzym (Fenno et al. 2001) zur enzymatischen Ausstattung des Bakteriums.

T. denticola besitzt kein klassisches LPS, sondern nur ein Lipooligosaccharid (LOS) (Sela 2001). Die Lipide der äußeren Membran besitzen eine Glycerolbasis, wodurch eine chemische Verwandtschaft zur Lipoteichonsäure, wie sie für grampositive Bakterien typisch ist, erreicht wird. Funktionell gesehen weist das LOS dennoch Analogien zum LPS der gramnegativen Bakterien auf (Schultz et al. 1998, Ishihara und Okuda 1999). Da dem LOS entscheidende Strukturen des LPS fehlen, bietet *T. denticola* für β -Defensin-1 und -2 keine Angriffspunkte (Brissette et al. 2004). Damit schaltet das Bakterium einen wichtigen Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems aus.

Überdies ist auch das bereits im Zusammenhang mit dem Adhärenzverhalten erwähnte Msp am Prozess der Immunsuppression beteiligt. Es behindert die Migration von PNM (Amin et al. 2004). Ein weiteres immunsuppressives Protein (Sip) vermindert die Proliferation von T-Zellen (Lee et al. 2004).

2.3 Biofilme – Multi-Spezies-Gemeinschaften in der Mundhöhle

Generell unterscheidet man zwei Formen mikrobieller Ansammlungen, planktonische Populationen und Biofilme. Biofilme sind dabei räumlich organisierte Gemeinschaften von Mikroorganismen, die mit einer Oberfläche verbunden, in eine extrazelluläre Matrix eingebettet und von einem feuchten Milieu umgeben sind (Donlan 2002).

Die Gesamtheit der Bakterienzellen nimmt 15-20% des Gesamtvolumens von Biofilmen ein, während die Matrixbestandteile mit einem Anteil von 75-80% zum Gesamtvolumen beitragen. Zur Matrix gehören neben extrazellulären Polysacchariden (EPS) auch Proteine, Salze, Zellmaterial und Nährstoffe (Socransky und Haffajee 2002). Der Biofilm als Ganzes wird von zahlreichen Kanälen durchzogen. Diese fungieren als Versorgungs- und Entsorgungswege für Nährstoffe und Stoffwechselendprodukte. Sie sind damit einem primitiven Kreislaufsystem analog (Sanderink et al. 2004).

Markantes Merkmal von Bakterien eines Biofilms ist, dass sie sich nicht mehr wie Einzeller, sondern wie mehrzellige Organismen verhalten. Infolge veränderter Genexpression zeigen sie einen gegenüber planktonischen Bakterien veränderten Phänotyp (Loo et al. 2000, Donlan und Costerton 2002). So werden Gene, die die Formation einer Glykokalyx und die Produktion von β -Laktamase, Katalase und Superoxid-Dismutase veranlassen, angeschaltet. Die damit einhergehende Virulenzsteigerung manifestiert sich in der Etablierung einer fast undurch-

dringlichen Verteidigungslinie (Socransky und Haffajee 2002) gegen immunologische Abwehrmechanismen wie z. B. Antikörper (Kharazmi 1991). Ein oftmals verringerter bakterieller Metabolismus (dormant stage) stellt einen wichtigen Grund für die bis zu 500fach gesteigerte Resistenz gegen Antibiotika dar (Hoyle und Costerton 1991, Costerton et al. 1995, Gilbert et al. 1997, Moller et al. 1998, Xu et al. 2000). Sekundäre Besiedler werden vor dem Wegspülen durch Speichel bewahrt, im Biofilm befindliche Bakterien vor plötzlichen Milieuänderungen geschützt (Socransky und Haffajee 2002).

Zell-Zell-Kommunikation (Quorum sensing) spielt in Biofilmen eine sehr wichtige Rolle. Plasmidtransfer (Christensen et al. 1998, Licht et al. 1999), Konjugation (Hausner und Wuertz 1999), Transposons (Roberts et al. 1999) sowie die lokale Synthese von Signalmolekülen, Autoinducer (Fong et al. 2001, Frias et al. 2001, Miller und Bassler 2001, Burgess et al. 2002) und Bakteriozinen (Kolenbrander et al. 2002) sind hiermit verbunden.

Grundsätzlich sind alle Grenzflächen zwischen festen und flüssigen Medien des Organismus der Besiedlung durch Bakterien ausgesetzt. Normal verhindert die physiologischerweise stattfindende Oberflächenenerneuerung durch Desquamation einzelner Zellen die Akkumulation von Bakterien. Dieser Prozess findet jedoch an der Zahnoberfläche nicht statt, so dass hier ein ideales Milieu zur Etablierung eines Biofilmes (Plaque) herrscht. Jeder Biofilm ist einzigartig, dennoch lassen sich einige generelle Mechanismen konstatieren (Sanderink et al. 2004).

Zunächst kommt es zur Kontaktaufnahme zwischen primären Kolonisierern und Komponenten auf Oberflächen (Zahnhartsubstanz) adsorbierter organischer Filme (Pellicel). Danach vermehren sich die Erstkolonisierer und bilden Mikrokolonien mit funktioneller Heterogenität sowie verstärkt EPS. Dadurch entstehen Bindungsstellen für Adhäsion und Koaggregation sekundärer Kolonisierer, planktonischer Zellen und Zellverbände (Busscher et al. 1995, Flemming und Wingender 2001, Sutherland 2001, Kolenbrander et al. 2002, Rickard et al. 2003). Die Koaggregation, ein Prozess, bei dem genetisch unterschiedliche Bakterien aneinander haften, wird hierbei als Hauptkolonisierungsstrategie oraler Mikroorganismen verstanden (Lamont und Jenkinson 2000, Ikegami et al. 2004).

Untersuchungen an Biofilmen zeigen zunächst ein starkes Breitenwachstum, gefolgt von Dickenwachstum (Socransky und Haffajee 2002). Mit der gesetzmäßigen Anlagerung der Bakterien entsteht eine aus vielen Spezies bestehende Gemeinschaft (Stoodley et al. 2002).

Biofilme wachsen langsam und erzeugen erst mit einer gewissen Verzögerung Reaktionen des Körpers. Die Eliminierung von Biofilmen ist ein sehr kompliziertes Unterfangen und beinhaltet vorrangig mechanische Maßnahmen. Adjuvant kommen Antibiotika zum Einsatz. Oftmals gelingt die Eliminierung nicht vollständig, so dass die Infektionen häufig rezidivieren. Der Einfluss abgelöster kleinerer Bakterienkolonien und deren Weiterentwicklung an anderen Standorten wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt im Hinblick auf eine suffiziente Therapie kontrovers diskutiert (Socransky und Haffajee 2002).

2.4 Epithelzellen

Epithelzellen, als Bestandteil des angeborenen Immunsystems, stellen die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Noxen dar (Sandros et al. 2000, Kusumoto et al. 2004). Die Integrität der Epithelzellbarriere wird dabei durch „tight junctions“ aufrechterhalten, die den Durchtritt von Ionen, Wasser und Bakterien zwischen verschiedenen Kompartimenten verhindern (Katz et al. 2002). An der Basis des Gingivalsulkus' ist dieses junctionale Epithel nur sehr dünn und zeigt zudem keine Anzeichen einer Keratinisierung.

Epithelzellen präsentieren auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl von Integrinen (Thorup et al. 1997, Holt et al. 1999). Diese sind entscheidend für die epitheliale Immunität durch Akkumulation von PNMs im Gingivalsulkus (Tonetti et al. 1998).

Zu den von Epithelzellen sezernierten Molekülen gehören u. a. MMPs und β -Defensine (Shapiro 1998, Brissette et al. 2004). MMPs spielen beim physiologischen Turn-over des Bindegewebes sowie bei pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle (Pattamapun et al. 2003). Antimikrobielle Peptide (β -Defensine) erschweren das Überleben parodontopathogener Bakterien (Krisanaprakornkit et al. 2000).

2.4.1 Internalisierung parodontopathogener Bakterien in Epithelzellen

Die Invasion von Bakterien in Epithelzellen ist ein aktiver Prozess, der am Beispiel von *P. gingivalis* mehrere Mechanismen sowohl seitens des Bakteriums als auch seitens der Zielzelle benötigt (Lamont und Jenkinson 1998). Dazu gehören Energiebereitstellung, Änderung des Zytoskeletts der Epithelzelle (Belton et al. 1999), Proteaseaktivität des Bakteriums (Lamont et al. 1995) und Fimbrien (Njoroge et al. 1997, Weinberg et al. 1997). Der Invasionsmechanismus ist dabei von der spezifischen Wirtszelle, deren Rezeptoren und deren Signaltransduktionskaskade abhängig (Lamont und Yilmaz 2002). Im Falle von *P. gingivalis* binden Fimbrien

an ein 48kDa-Protein auf Epithelzellen (Weinberg et al. 1997). Die Transduktion des Oberflächensignals erfolgt über Kalzium-abhängige intrazelluläre Signalwege der Wirtszelle (Izutsu et al. 1996, Watanabe et al. 2001). Als Ergebnis bildet die Wirtszelle Membraninvasionen und nimmt *P. gingivalis* durch Endozytose auf (Lamont et al. 1995, Madianos et al. 1996). Uneinigkeit herrscht über das weitere intrazelluläre Vorkommen von *P. gingivalis*. Einige Wissenschaftler meinen, dass *P. gingivalis* innerhalb dieser Vakuolen bleibt (Sandros et al. 1993, Njoroge et al. 1997). Andere gehen davon aus, dass die invadierten Bakterien die Vakuole verlassen und sich intrazellulär frei bewegen (Lamont und Yilmaz 2002, Andrian et al. 2004). Mikroskopisch konnte die Lokalisation der Bakterien in der perinukleären Region der Wirtszelle nachgewiesen werden (Houalet-Jeanne et al. 2001).

Durch ihre intrazelluläre Persistenz entziehen sich die invadierten Bakterien den wirtszellulären Mechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität. Diese immunologisch privilegierte Region, die zudem über Nährstoffe im Überfluss verfügt, bietet optimale Voraussetzungen für eine intrazelluläre Vermehrung der Bakterien (Sandros et al. 1993, Papapanou et al. 1994, Lamont et al. 1995, Eick et al. 2006).

Die Invasion in Epithelzellen ermöglicht das Eindringen der Bakterien in tiefer liegende Schichten des Epithelzellverbundes (Houalet-Jeanne et al. 2001). Die infizierten Epithelzellen zeigen zudem eine reduzierte Adhäsion an extrazellulären Matrixbestandteile, eine veränderte Morphologie und verminderte Motilität (Hintermann et al. 2002).

Die weiteren Prozesse werden kontrovers diskutiert. Während manche Wissenschaftler den Zelltod infizierter Zellen propagieren (Dierickx et al. 2002), negieren andere eine initiale Zytotoxizität von *P. gingivalis* gegenüber Epithelzellen (Nakhjiri et al. 2001, Yilmaz et al. 2004). Die Persistenz parodontopathogener Bakterien wird als einer der Hauptgründe für das Aufrechterhalten einer chronischen Infektion gesehen (Eick et al. 2002).

2.4.2 Proinflammatorische Zytokine bei parodontalen Erkrankungen

Zytokine stellen eine Gruppe kleiner löslicher Proteine dar, die auf lokaler (parakrin, autokrin, juxtakrin) oder systemischer Ebene Eigenschaften von Zellen wie Proliferationsverhalten, Differenzierung und Regeneration verändern und somit den aktuellen Gegebenheiten anpassen können. Zur vielgestaltigen Gruppe der Zytokine gehören neben Interleukinen u. a. auch Interferone, Wachstumsfaktoren und zytotoxische Moleküle. Abhängig von Art und Kinetik

werden die Zytokine einerseits in konstitutiver Weise, andererseits erst auf einen induzierenden Stimulus hin sezerniert. Viele Zytokine wurden ursprünglich auf Basis ihres zellulären Ursprunges und ihrer als erste entdeckten Funktion klassifiziert. Heute weiß man, dass sie multifunktionelle (pleiotrope) Eigenschaften haben und von vielen verschiedenen Zellen produziert werden können. Von einigen Wissenschaftlern werden sie als eine der wichtigsten Strategien der natürlichen Immunantwort des Wirtes gegen eindringende Noxen bezeichnet (Henderson et al. 1996).

Grundsätzlich lässt sich eine Einteilung in proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, IFN γ , TNF α), wie sie in exzessivem Maße in parodontal-entzündeten Geweben zu finden sind (Reinhardt et al. 1993, Tsai et al. 1995, Okada und Murakami 1998), und antiinflammatorische Zytokine (TGF β , IL-10) vornehmen (Henderson et al. 1996). Das Verhältnis dieser beiden Gruppen zueinander bestimmt das Ausmaß der Entzündung.

Interleukin-6

IL-6 gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine, die im Zusammenhang mit parodontalen Entzündungen eine wichtige Rolle spielen. IL-6 weist bei gingivalen Entzündungen ein bedeutend höheres Niveau als bei parodontaler Gesundheit auf (Yamazaki et al. 1994, Chen et al. 1997, Irwin und Myrillas 1998). Quellen der IL-6-Produktion sind Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und T- und B-Zellen (Okada und Murakami 1998).

Eine Hauptfunktion ist die Aktivierung der Osteoklasten und des damit verbundenen Knochenabbaus (Okada und Murakami 1998). Letzterer ist typisch für alle Formen der Parodontitis. Eine zweite wichtige Aufgabe besteht in der Schaffung eines spezifischen Milieus für die Reifung von B-Zellen zu Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen. Der Abbau von IL-6, wie er bei der Parodontitis zu beobachten ist, hat folglich die Einschränkung der humoralen Abwehr zur Folge. Überdies agiert IL-6 bei der Reifung zytotoxischer T-Zellen (Lotz et al. 1988, Barton 1997). Unabhängig davon wurden induktive Effekte auf die Expression von TGF- β 1 and Angiotensin II nachgewiesen (Omori et al. 2004). IL-6 kann durch eine Vielzahl von Proteasen, wie z. B. Gingipain von *P. gingivalis* abgebaut werden (Banbula et al. 1999, Imamura 2003)

Interleukin-8

IL-8 gehört gleichfalls zur Gruppe proinflammatorischer Zytokine. Eigentlich ist IL-8 kein Interleukin, sondern ein der C-X-C-Chemokinfamilie zugehöriges Molekül (Imamura 2003).

Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten, aber auch Epithelzellen gelten als Hauptproduzenten dieses Chemokins (Imamura 2003). Eine erhöhte Sekretion wird z. B. durch Einwirkung von *A. actinomycetemcomitans* und *F. nucleatum* auf Epithelzellen hervorgerufen (Darveau et al. 1998, Huang et al. 1998a, Han et al. 2000).

Das gesunde Parodont ist durch einen exakt geregelten IL-8-Gradienten gekennzeichnet. Produziert wird dieser durch Epithelzellen. Er ist für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (PNM) in den Gingivalsulkus von immenser Bedeutung (Fitzgerald und Kreutzer 1995, Tonetti et al. 1998, Zhang et al. 1999, Huang et al. 2004).

Der Abbau dieses Gradienten hat eine gestörte Migration von PNMs und T-Zellen zur Folge. Dies geht mit der lokalen Immunsuppression des angeborenen Immunsystems einher. Pathogene Bakterien werden nicht länger erkannt (Darveau et al. 1998) und können ungehindert in der subgingivalen Plaque proliferieren, so dass diese Bakterien und deren Toxine und Proteasen die lokale Gewebszerstörung bewirken (Deng et al. 2001). Andererseits geht die Steigerung des lokalen IL-8-Gradienten mit einer vermehrten Migration von Entzündungszellen einher. Dabei tragen die gesteigerte Lyse der PNM und die damit verbundene Freisetzung körpereigener Proteasen entscheidend zur parodontalen Gewebsdestruktion bei (Okada und Murakami 1998).

3 Zielstellung

Epidemiologische Studien weisen immer wieder auf eine hohe Prävalenz von Patienten mit parodontalen Erkrankungen hin. Alle Bakterien sind in Form eines Biofilmes in der subgingivalen Plaque assoziiert. Bisher wurden hauptsächlich bakterielle Einzelinfektionen über nur sehr kurze Beobachtungszeiträume im planktonischen Milieu untersucht. Dem Biofilm und der Etablierung von Mischinfektionen wurde bislang nur wenig Beachtung geschenkt.

Ziel dieser In-vitro-Studie ist es, die Adhärenz und Invasion parodontopathogener Bakterien an Epithelzellen sowie die damit verbundene Freisetzung von Zytokinen im Zusammenhang mit Speichel zu untersuchen. Dabei soll durch Anwendung von künstlichem Speichel ein Biofilm-ähnliches Milieu erzeugt werden, das es gestattet, dem Mundmilieu näher kommende In-vitro-Bedingungen zu schaffen als dies durch alleinige planktonische Versuchsaufbauten möglich ist. KB-Zellen (permanente Zelllinie) sollen hierzu mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 und M5-1-2 (klinisches Isolat), *Tannerella forsythia* ATCC 43037, *Treponema denticola* ATCC 35405 einzeln sowie in Form verschiedener Mischinfektionen im planktonischen Milieu und im Zusammenhang mit künstlichem Speichel infiziert werden. Als Brückenkeim dient *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Zu verschiedenen Versuchszeitpunkten soll die Zahl adhärenter und internalisierter Bakterien anhand von KBE auf Agarplatten bestimmt werden. Die IL-6- und IL-8-Spiegel sollen in den Überständen der KB-Zellen mittels ELISA gemessen werden.

Von Interesse ist dabei, ob es Unterschiede im Adhärenz- und Internalisierungsverhalten parodontopathogener Bakterien zwischen planktonischem Milieu und künstlichem Speichel gibt. Weiterhin soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit *F. nucleatum* als „Brückenkeim“ die Adhärenz der anderen Bakterien beeinflusst. Darüber hinaus gilt es zu klären, welchen Einfluss Speichel („Biofilm“) und die Kombination verschiedener Bakterienspezies auf die Freisetzung von Interleukinen (IL-6 und IL-8) haben. Ein Vergleich der Ergebnisse des planktonischen Milieus und der Versuche mit synthetischem Speichel soll zur Klärung der Frage beitragen, ob die bisher für Einzelinfektionen im planktonischen Milieu ermittelten Daten auf biofilmassoziierte Mischkulturen übertragbar sind oder ob synergistische oder antagonistische Effekte eine Rolle spielen.

4 Material und Methoden

4.1 KB-Zellen und deren Passage

Alle Versuche wurden an Zellen einer immortalisierten permanenten Epithelzelllinie (KB-Zellen) durchgeführt.

Die KB-Zellen wurden in Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) (Bio Whittaker, Verriers, Belgien), welches mit 10%igem fetalen Kälberserum (FCS) (Gibco BRL, Paisley, Großbritannien) versetzt wurde, bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator (Forma Scientific, Dreieich, Deutschland) kultiviert. Die Zellen wurden turnusgemäß jede Woche passagiert und mit neuem Nährmedium versetzt.

Ausgangssituation aller Versuche waren Zellkulturplatten mit jeweils 24 Wells (Greiner, Frickenhausen, Deutschland), auf die die KB-Zellen in nachfolgend beschriebener Weise verteilt wurden:

Zwei Gewebekulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) wurden zu Beginn einer jeden Versuchsdurchführung unter dem Mikroskop auf Vorhandensein einer konfluent gewachsenen Schicht von Epithelzellen überprüft. Alle weiteren Schritte wurden in der Sicherheitswerkbank HeraSafe (Heraeus, Hanau, Deutschland) unter steriler Atmosphäre durchgeführt. Zunächst wurde aus den Gewebekulturflaschen das enthaltene Nährmedium (EMEM + FCS) abgezogen und die Flasche anschließend mit Phosphat-gepufferter Lösung (PBS) gespült.

Durch Zugabe von 1 ml 5%ige EDTA-Trypsinlösung und anschließender Inkubation der Gewebekulturflasche (5-10 min) bei 37°C und 5% CO₂ wurden die von ihrer Unterlage abgelösten Zellen als weißer Schleier sichtbar. Zur Inaktivierung der Trypsinlösung wurde in jede Flasche 2 ml FCS-haltiges EMEM gegeben.

Die auf diese Weise gewonnene Zellsuspension der beiden Gewebekulturflaschen wurde mit 70 ml EMEM+FCS in einem sterilen Becherglas gemischt und dann zu je 1 ml auf jedes Well der drei Zellkulturplatten ausgesät. Dies entsprach einem ungefähren Wert von 10⁵ KB-Zellen/Well. Die Platten wurden daraufhin einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C und 5%

CO₂ im CO₂-Scharank unterzogen. Diese Zeit war notwendig, um eine konfluent gewachsene Monolayer auszubilden.

4.2 Bakterienstämme

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Bakterienreferenzstämme verwendet (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland):

- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 (DSMZ 11123 = ATCC 43718)
- *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586
- *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277
- *Tannerella forsythia* ATCC 43037
- *Treponema denticola* ATCC 35405 (DSMZ 14222)

Weiterhin wurde in die Untersuchungen ein klinisches Isolat einbezogen. Dieses entstammte der Mundhöhlenflora eines Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis und ist durch eine sehr dicke Schleimkapsel gekennzeichnet:

- *Porphyromonas gingivalis* M5-1-2

In Vorbereitung auf die Versuche mussten die benötigten Bakterienstämme 24 h zuvor auf Schaedler-Agar-Platten (Oxoid, Basingstoke, Großbritannien) mit 7% Schafblut überimpft und anaerob mit Hilfe von AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke, Großbritannien) bei 37°C inkubiert werden. Dieses Vorgehen sicherte die Verfügbarkeit der Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase.

Eine Ausnahme stellte *T. denticola* ATCC 35405 dar. Dieses Bakterium konnte nicht auf den oben genannten Schaedler-Agar-Platten kultiviert werden, sondern musste auf einem speziellen Flüssigmedium für die Vorkultur angezüchtet werden. 1 l dieses speziellen Mediums enthielt: Hirn-Herz-Infusionsbrühe (12,5 g), Trypton (10 g), Hefeextrakt (2,5 g), Natriumthioglycolat (0,5 g), L-Cystein-HCl (1 g), L-Asparagin (0,25 g), Glucose (2 g), Agar (3 g) und destilliertes H₂O (1000 ml). Hierzu wurden 45 ml einer Lösung bestehend aus KOH 0,1 N (20 ml), Isobuttersäure (100 µl), Isovaleriansäure (100 µl), Valeriansäure (100 µl), Thiaminpyrophosphat (6 mg), NaHCO₃ (2 g) und destilliertem H₂O (25 ml) hinzugegeben. Außerdem wurden noch 20 ml FCS hinzupipettiert.

4.3 Synthetischer Speichel

Zur Etablierung eines „Biofilmes“ kam in der vorliegenden Studie synthetischer Speichel nach ISO 10993 zum Einsatz.

1 l synthetischer Speichel nach ISO 10993 enthält:

- 0,7 g NaCl
- 0,26 g Na₂HPO₄
- 0,33 g KSCN
- 0,2 g KH₂PO₄
- 1,5 g NaHCO₃
- 1,2 g KCl
- 4 g Muzin (Sigma)
- 1000 ml destilliertes H₂O

Dieses Gemisch wurde nach einer Standzeit von 16 h zu kleinen Mengen portioniert und anschließend sterilfiltriert.

4.4 Vorversuche

Überprüfung der Toleranz der KB-Zellen gegenüber synthetischem Speichel

Zur Überprüfung der Toleranz der KB-Zellen gegenüber synthetischem Speichel wurden 24-Well-Platten mit Monolayern von KB-Zellen vorbereitet. Nach einer Zeitspanne von 24 h wurden die Kontrollwells mit EMEM und PBS im Verhältnis 9:1 versetzt. Die übrigen Wells wurden mit EMEM und synthetischem Speichel im Verhältnis 9:1 bzw. EMEM, synthetischem Speichel und PBS im Verhältnis 18:1:1 versetzt.

Für die mit synthetischem Speichel inkubierten KB-Zellen waren in einer mikroskopischen Untersuchung nach 18 h keine Unterschiede hinsichtlich Adhärenz und Morphologie im Vergleich zu den Referenzansätzen zu beobachten.

Die Anwendbarkeit des Versuchsaufbaus für die weitere Methodik galt somit als gesichert.

Selektive Kultivierung der einzelnen Bakterienstämme auf Agar-Platten

Bei den Einzelinfektionsversuchen erfolgte die Kultivierung der Bakterien auf Schaedler-Agar-Platten mit 7% Schafblut unter anaeroben Verhältnissen und 37°C. Eine Ausnahme hiervon bildete *A. actinomycetemcomitans* Y4, dessen Kultur zwar auf normalem Schaedler-Agar jedoch bei mikroaerophilen Verhältnissen (5% CO₂ und 37°C) im Inkubator stattfand. Eine Kultur von *T. denticola* war im Rahmen dieser Studie nur in Form einer Vorkultur mit Flüssigmedium möglich.

Eine selektive Kultivierung der einzelnen Bakterienstämme bei den Mischinfektionsversuchen wurde durch Modifikation der Zusammensetzung der Schaedler-Agarplatten (Oxoid, Basingstoke, Großbritannien) mit 7% Schafblut erreicht:

- *F. nucleatum* ATCC 25586: Die selektive Kultivierung des Bakteriums in Mischinfektionen wurde durch Zugabe von 7,5 mg Vancomycin / l Schaedleragar erreicht.
- *P. gingivalis* ATCC 33277 und M5-1-2: Beide Stämme wurden durch Anwesenheit von Kanamicin in ihrem Wachstum nicht beeinträchtigt. Alle anderen angewandten Stämme zeigten kein Wachstum unter derartigen Umweltbedingungen. Folglich ergab die Zugabe von 100 mg Kanamicin / l Schaedleragar und anschließender Herstellung von Kanamicin-haltigen Schaedler-Agar-Platten die Möglichkeit zur selektiven Kultivierung dieser beiden Stämme.
- *T. forsythia* ATCC 43037: Im Vorfeld hatte sich die Resistenz des in dieser Studie verwendeten Stammes gegen Metronidazol herausgestellt. In Vorversuchen hatte sich die Zugabe von 5 ml Metronidazol / l Schaedler-Agar als optimale Konzentration herausgestellt. Alle anderen Stämme zeigten Sensibilität gegenüber Metronidazol.

Bestimmung des Ausgangswertes der Bakterienanzahl in der Bakteriensuspension

Die Zahl der Bakterien in einer Suspension mit einer Extinktion von 0,1 wurde bei 640 nm im Photospektrometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, Großbritannien) in Vorversuchen noch einmal bestimmt. Dazu wurden je 100 µl dieser 0,1er Ausgangskonzentration und verschiedener Verdünnungsreihen auf Schaedler-Agar-Platten ausplattiert und nach 7 Tagen anaerober Kultur bei 37°C ausgewertet. Hierbei bestätigten sich die in der Literatur üblichen Werte von 10⁸ Bakterien/ml (Sandros et al. 2000).

4.5 Hauptversuche

Bei der Durchführung der Versuche kamen die im Kapitel 4.2 aufgelisteten Bakterienstämme sowohl in Einzelinfektion als auch in Mischinfektionen zum Einsatz (Tab.1).

Tabelle 1: Darstellung der in dieser Studie experimentell durchgeführten Einzel- bzw. Mischinfektionen

Einzelinfektionen	A. actinomycetemcomitans Y4
	F. nucleatum ATCC 25586
	P. gingivalis ATCC 33277
	P. gingivalis M5-1-2
	T. forsythia ATCC 43037
	T. denticola ATCC 35405
Doppelinfektionen	P. gingivalis ATCC 33277 + F. nucleatum ATCC 25586
	P. gingivalis M5-1-2 + F. nucleatum ATCC 25586
	T. forsythia ATCC 43037 + F. nucleatum ATCC 25586
	P. gingivalis ATCC 33277 + T. forsythia ATCC 43037
Dreifachinfektion	P. gingivalis ATCC 33277 + T. forsythia ATCC 43037 + F. nucleatum ATCC 25586
Vierfachinfektion	P. gingivalis ATCC 33277 + T. forsythia ATCC 43037 + T. denticola ATCC 35405 + F. nucleatum ATCC 25586

Alle Versuche wurden wenigstens zweimal durchgeführt. Für die statistische Analyse standen somit mindestens jeweils vier Einzelwerte zur Verfügung.

Nach 24-stündiger Vorinkubation wurden die Gewebekulturplatten zunächst auf die Ausbildung einer Monolayer von KB-Zellen mikroskopisch überprüft. War dies der Fall, wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und diese mit PBS gewaschen.

Die oberen beiden Reihen der Zellkulturplatten wurden für die Versuche im planktonischen Milieu verwendet. Dagegen dienten die unteren beiden Reihen den Versuchen mit künstlichem Speichel. Alle im Folgenden beschriebenen Versuchsteilschritte wurden ausnahmslos in steriler Atmosphäre unter Verwendung einer Sicherheitswerkbank (Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt.

Zunächst wurde EMEM (ohne FCS) für den planktonischen Versuchsansatz mit PBS bzw. für die „Biofilmversuche“ mit synthetischem Speichel im Verhältnis von 17:1 gemischt. 900 µl dieses Gemisches wurden in die entsprechenden Wells gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ für eine Stunde inkubiert, damit die Ausbildung eines „Biofilms“ bei den entsprechenden Versuchen erfolgte.

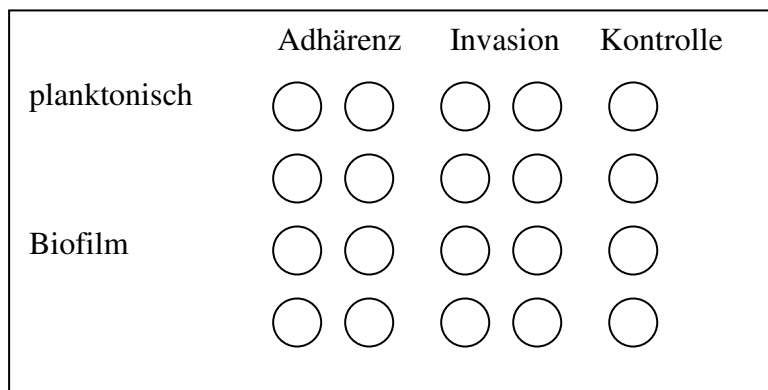


Abbildung 1: Verteilung der Wells für die Versuche

Von den wie im Kapitel 4.2 vorbereiteten Bakterien wurde je eine Suspension aus Medium 199 (Invitrogen, Carlsbad, USA) und der benötigten Bakterienstämme mit einer Extinktion von 0,1 bei 640 nm am Photospektrometer, Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, Großbritannien), hergestellt.

Bei den Einzelinfektionsversuchen wurden 50 µl Bakteriensuspension zu den vorhandenen 900 µl Medium des entsprechenden Wells hinzugegeben und der Rest von 50 µl zu einem Gesamtvolumen von 1000 µl pro Well mit Medium 199 aufgefüllt. Bei den Mischinfektionsversuchen mit zwei Bakterienstämmen wurden jeweils 50 µl der entsprechenden Bakteriensuspension zu den bereits vorhandenen 900 µl hinzugegeben, so dass hier ein vergleichbares Gesamtvolumen von 1 ml pro Well erreicht wurde.

Wurden drei oder vier Bakterienstämme gemischt, wurden ebenfalls je 50 µl jeder Bakteriensuspensionen hinzugegeben. Auch hier wurde zum Zweck der besseren Vergleichbarkeit der Einzelergebnisse das Gesamtvolumen auf 1000 µl festgelegt. Entsprechend der Versuchsanordnung folgte nun eine Inkubation der Zellkulturplatten für 1 h, 6 h und 18 h.

Nach der vorgegebenen Inkubationszeit wurde die Morphologie der Epithelzell-Monolayer unter dem Mikroskop betrachtet und 800 µl der Überstände aus jedem Well entnommen, bei

16 100 g 4 min zentrifugiert und zur späteren Bestimmung der Interleukin-Spiegel in Micro-Tubes (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) abgefüllt und bei -20°C gelagert.

Bestimmung der Zahl adhärenter Bakterien

Die restlichen Überstände wurden entfernt. Die Wells wurden daraufhin fünfmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml eiskaltes Ampuwa (Fresenius, Bad Homburg v. d. H., Deutschland) in jedes der für die Adhärenzversuche bestimmten Wells pipettiert. Darauf erfolgte die Inkubation der Zellkulturplatten für 15 min bei 37°C und 5% CO₂. Eine daran anschließende kräftige Resuspension der Überstände war notwendig, um eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien in der Suspension von 1 ml zu erzielen.

Um später die auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien (KBE) besser zählen zu können, schloss sich eine Verdünnungsreihe mit anschließender Ausplattierung an.

Eine selektive Kultivierung der einzelnen Bakterienstämme wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Alle Agarplatten, mit Ausnahme derjenigen zur Kultur von *A. actinomycetemcomitans* Y4, wurden bei 37°C und unter anaeroben Wachstumsbedingungen für sieben Tage inkubiert. Generiert wurde dieses sauerstofffreie Milieu durch Zugabe von Anaero Gen™ 2,5 l (Oxoid, Basingstoke, Großbritannien) zu Agarplatten in den Anaerobierboxen. Die Überprüfung der anaeroben Kulturbedingungen erfolgte durch Auswertung des Kontrollindikators (Oxoid, Basingstoke, Großbritannien), der gemeinsam mit den Agarplatten in die Anaerobierbox gegeben wurde.

Die mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 beimpften Agarplatten wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator (Forma Scientific, Dreieich, Deutschland) kultiviert und nach 5 Tagen ausgezählt.

Bestimmung der Zahl internalisierter Bakterien

Nach Abfüllen der Überstände (800 µl) in Eppendorf-Tubes wurde analog zu den Adhärenzversuchen verfahren und die Wells fünfmal mit PBS gespült. Daran schloss sich die Behandlung der Zellen mit einem Antibiotikum an. Auswahlkriterium des Antibiotikums war die Eigenschaft, außen an den KB-Zellen anhaftende Bakterien zuverlässig abzutöten ohne jedoch in die Epithelzelle einzudringen.

Bei den Versuchen mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 kam Gentamicin zum Einsatz. Dabei wurden 7,5 mg Gentamicin/ml EMEM vermengt und je 500 µl dieses Gemischs in die entsprechenden Wells pipettiert. Eine Inkubation für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ im CO₂-Schrank schloss sich an.

Bei allen anderen Versuchen fand Penicillin G (Jenaparm®, Jena, Deutschland) Anwendung, welches in einer Konzentration von 10 Mio. IE/ml in EMEM gelöst wurde. Auch dieses Gemisch wurde zu je 500 µl in die entsprechenden Wells verteilt und 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Effektivität der hier angewandten Antibiotika war in Studien am Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena getestet worden. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Wirksamkeit des Antibiotikums nach 1-stündiger Behandlung dem Überstand eine Probe von 10 µl entnommen und auf Schaedler-Agar ausgespatelt und diese nach einer anaeroben Inkubation von 7 Tagen bei 37°C auf Vorhandensein von KBE überprüft. Alle Antibiotika verzeichneten eine Abtötung der adhärennten Bakterien nach einer Einwirkzeit von 60 min.

Nach Entnahme dieser 10 µl zur Überprüfung der Abtötung der adhärennten Bakterien wurde der restliche Überstand entfernt und die Wells daraufhin dreimal mit PBS gewaschen. Die Lyse der Epithelzellen erfolgte wie auch bei den Versuchen zur Adhärenz durch Zugabe von je 1 ml Ampuwa. Nach 15 min erfolgte eine kräftige Resuspension der lysierten Zellen. Nach Anwendung von Verdünnungsreihen wurden je 100 µl auf entsprechende Agarplatten ausgespatelt und diese für sieben Tage bei 37°C anaerob inkubiert.

4.6 ELISA – Bestimmung der Konzentration von IL-6 und IL-8

Wie in Kapitel 4.5 dargelegt, wurden 800 µl des Überstandes eines jeden Wells nach entsprechender Inkubation der KB-Zellen in Eppendorf-Gefäße abgefüllt und bei -20°C eingefroren.

Nachweis der Interleukine

Zum Nachweis von IL-6 und IL-8 dienten Sandwich-Enzym-Immunoassays.

Messprinzip

Grundlage eines derartigen Tests waren Mikrotiter-Platten, die mit einem gegen ein spezielles Antigen (Interleukin) gerichteten Antikörper beschichtet worden waren. Nach Zugabe der Proben und einer Verdünnungsreihe mit bekannter Antigenkonzentration als Standard bzw. Referenz wurde ein zweiter Antikörper, der mit einem Enzym (=Konjugat) kovalent verbunden war, hinzupipettiert. Antigen (=Interleukin) und Antikörper banden nun gemeinsam im „Sandwich“ an die oberflächenassoziierten Antikörper der Mikrotiter-Platten. Anschließende Waschschritte eliminierten nicht reagierende freie Reaktanten. Danach wurde durch Zugabe eines Substrates die Aktivität der oberflächengebundenen Enzyme gemessen. Es bildete sich zunächst ein blauer Farbumschlag, der sich durch Zugabe einer Säure in einen photometrisch messbaren gelben Farbumschlag umgewandelte. Mit Hilfe der Standardkurve mit bekannter IL-Konzentration konnte nun entsprechend der Farbintensität auf die Menge der Interleukine in der Probe geschlossen werden. Das hieß, je höher die IL-Konzentration in der Probe war, desto intensiver gelb war die Farbe der Lösung.

Durchführung

Die Bestimmung der Konzentration von IL-6 und IL-8 wurde in separaten ELISAs durchgeführt. Zum Einsatz kamen dabei die kommerziell erhältlichen Testkits Human IL-6 CytoSet™ und Human IL-8 CytoSet™ (Biosource, Camarillo, USA). Entsprechend der Gebrauchsanweisung wurde wie folgt vorgegangen:

1. Beschichtung der Mikrotiter-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit Coating-Antikörper
In Vorbereitung dieses Versuchsschrittes wurden 10 µl des spezifisch gegen IL-6 oder IL-8 gerichteten Coating-Antikörpers mit 10 ml PBS gemischt. Nach vorangegangener einmaliger Spülung der Mikrotiter-Platten mit PBS, erfolgte die Zugabe von 100 µl/Well der Antikörperlösung. Anschließend wurden die Platten mit einer Klebefolie bedeckt und für

18h bei 2-8°C inkubiert. Nach Entfernung des Coating Antibody wurden 200 µl Blocking-Puffer (3-4 g Rinderserumalbumin/100 ml PBS) in die Wells pipettiert. Dieser wirkte 2 h bei Raumtemperatur ein, wobei die Platte wiederum mit einer Klebefolie bedeckt wurde. Daran schloss sich ein dreimaliges Waschen der Wells mit 400 µl Waschpuffer (TBS-Tween, Sigma) an.

2. Präparation des Standards und Vorbereitung der Proben

Entsprechend der Vorschriften des Herstellers wurde der Standard mit destilliertem Wasser aufgefüllt, so dass er in einer Konzentration von 10.000 pg/ml vorlag. In einer Verdünnungsreihe wurden nun Standardproben in einer Konzentration von 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml und 15,675 pg/ml mit PBS hergestellt. Von diesen Standardkonzentrationen und den Versuchsproben wurden anschließend je 100 µl auf die entsprechenden Wells verteilt.

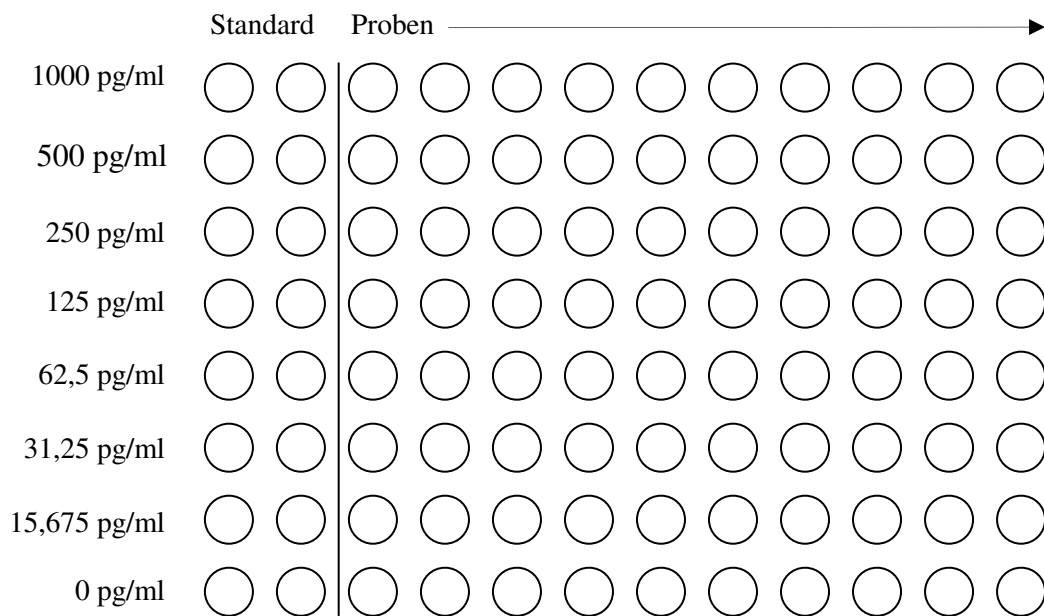


Abbildung 2: Pipettierschema zum Interleukinnachweis

3. Zugabe des Detection-Antikörpers

Dieser wurde mit Standardverdünner (10 ml Blocking Puffer + 90 ml PBS) im Verhältnis 1:1.250 gemischt. Sofort nach Zugabe der Standards und der Proben wurden 50 µl der Detection-antibody-Lösung in jedes Well hinzupipettiert. Die Mikrotiter-Platten wurden anschließend mit Folie bedeckt und unter leichtem Schwenken auf dem Rüttler für 2 h bei Zimmertemperatur inkubiert.

4. Zugabe des Konjugates

Danach schloss sich ein dreimaliges Waschen mit TBS-Tween und die Zugabe von 100 µl Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat an. Dieses wurde für den IL-6-Nachweis mit Standardverdünner im Verhältnis 1:1.250 und für den IL-8-Nachweis mit Standardverdünner im Verhältnis 1:2.500 gemischt. Im Anschluss daran fand nach Abdecken der Platte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur statt.

5. Zugabe des Substrates

Nach erneuter dreimaliger Waschung der Mikrotiter-Platten mit je 400 µl TBS-Tween/Well erfolgte die Zugabe von 100 µl Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zu jedem Well. Diesmal wurde die Inkubation der Platte in völliger Dunkelheit bei Raumtemperatur ohne Abdeckung der Platte durchgeführt. Es wurde 10 – 60 min inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach dem Farbumschlag des Standards. Hierbei sollten die verschiedenen Konzentrationen eindeutig unterscheidbar sein.

6. Zugabe der Stopp-Lösung

Gestoppt wurde die Reaktion der Peroxidase durch sofortiges Hinzufügen von 50 µl 0,5 N H₂SO₄ pro Well.

7. Auswertung der Messergebnisse

Die Messergebnisse wurden unter Zuhilfenahme des ELISA-Readers (Spectra Rainbow, SLT Labinstrument, Österreich) evaluiert. Das dazugehörige Computerprogramm trägt die optische Dichte der Standards bei 450 nm (Ordinate) gegen die Konzentration der Standards auf. Daraus ergibt sich eine Gerade im Koordinatensystem, anhand derer die Konzentration der Proben zweifelsfrei bestimmt werden kann.

4.7 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Zur Herstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von *P. gingivalis* M5-1-2 und *F. nucleatum* ATCC 25586 wurden KB-Zellen wie im Kapitel 4.1 beschrieben in 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Zuvor war es wichtig, noch je ein Cover slip (Glasplättchen) pro Well einzubringen. Nach 24-stündiger Inkubation der KB-Zellen und Ausbildung einer Monolayer wurde die entsprechende Bakteriensuspension wie in 4.5 beschrieben aufgebracht und mit den KB-Zellen gemeinsam für 5 min, 15 min bzw. 1 h inkubiert. Nach Ablauf dieser Versuchszeiten galt es, die Überstände der entsprechenden Wells zu entfernen und die Proben dreimal mit PBS zu waschen. Daraufhin schloss sich die Fixierung mit 2%-igem Glutaraldehyd an. Anschließend wurden die Wells mit 0,1M Cacodylatpuffer gewaschen. Nach Dehydrierung des Probenmaterials mittels aufsteigender Alkoholreihe bis zu 100%-igem Alkohol, wurden die Proben kritischpunkt getrocknet und mit Gold bedampft.

Kritischpunkttrocknung, Bedampfen der Proben und Mikroskopie erfolgte am Elektronenmikroskopischen Zentrum der FSU Jena. Die Aufnahmen wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop LEO 1450 VP durchgeführt.

4.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte mit dem t-Test nach Student. Hierbei galten p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant.

5 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Experimente zu Adhärenz und Internalisierung parodontopathogener Bakterien an KB-Zellen sowie der Bestimmung der Interleukin-6- und Interleukin-8-Spiegel in den Überständen der KB-Zellen dargestellt.

5.1 Adhärenz parodontopathogener Bakterien an KB-Zellen

5.1.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4

Die Zahl adhärenter *A. actinomycetemcomitans* Y4 stieg im planktonischen Experiment mit zunehmender Versuchsdauer bis auf 137.000 Bakterien an (Abb. 3).

Bei Zugabe von künstlichem Speichel („Biofilm“) waren verglichen mit dem planktonischen Versuch nach 6 h die Werte statistisch signifikant geringer ($p < 0,001$).

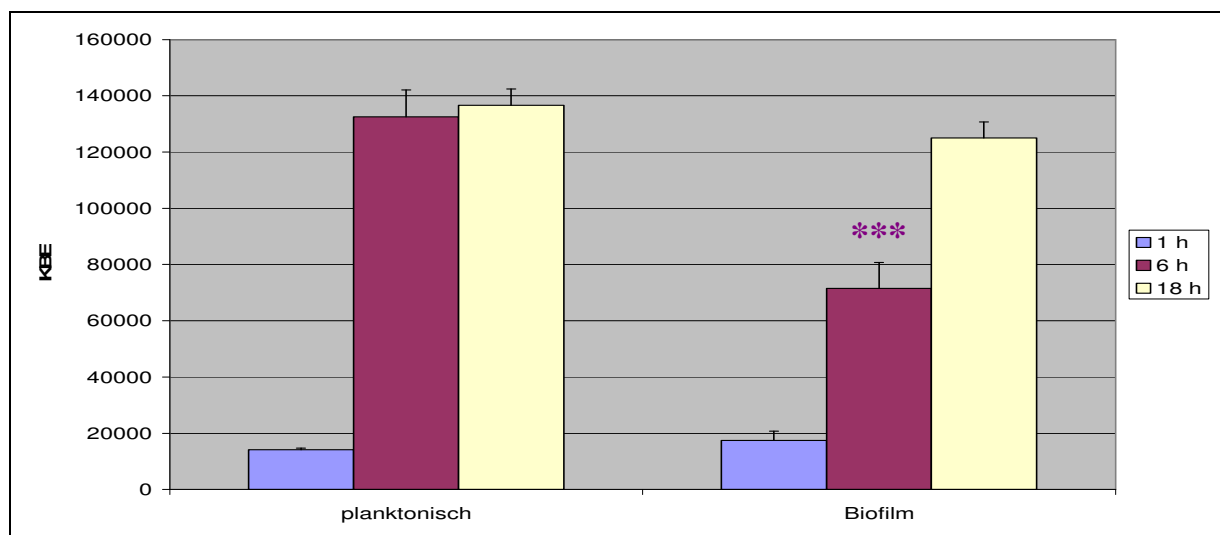


Abbildung 3: Adhärenzwerte der Einzelinfektion von *A. actinomycetemcomitans* Y4; Vergleich „Biofilm“ – planktonisch *** $p < 0,001$

5.1.2 *Porphyromonas gingivalis* und *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586

Sowohl im planktonischen Milieu als auch in den Versuchen mit synthetischem Speichel adhärenzte *P. gingivalis* ATCC 33277 in Einzel- und Mischinfektion (mit *F. nucleatum* ATCC 25586) in ähnlicher Weise. Hierbei wurde die stärkste Adhärenz in allen Experimenten nach 6 h ermittelt. *F. nucleatum* ATCC 25586 adhärenzte deutlich schwächer.

Verglichen mit den Versuchen im planktonischen Milieu hatte der Speichel keinen erkennbaren Einfluss auf die Adhärenz der Bakterien (Abb. 4).

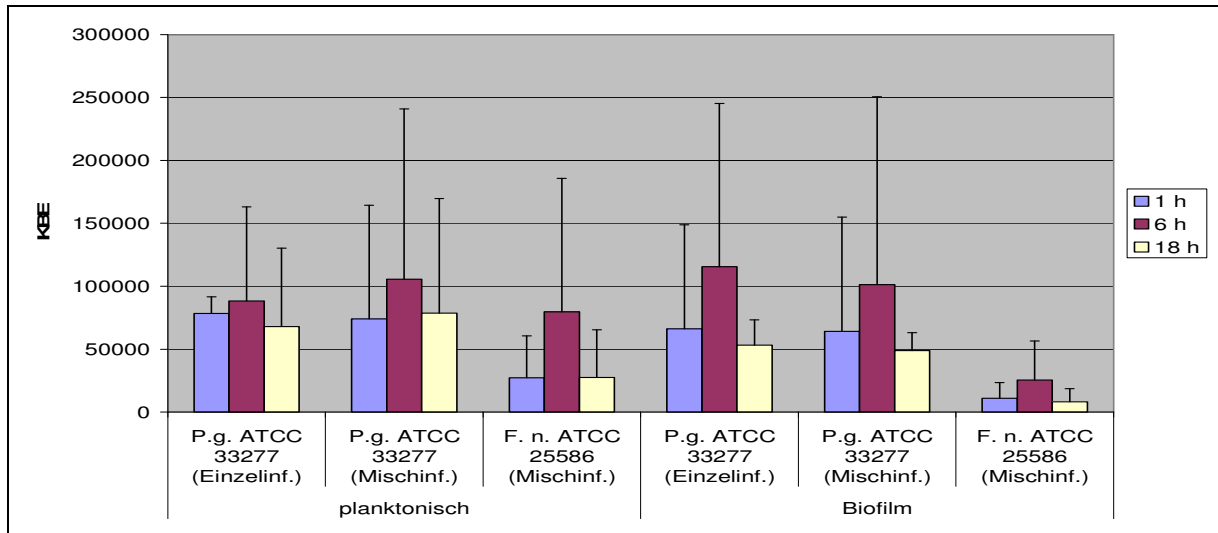


Abbildung 4: Adhärenzwerte der Einzelinfektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 sowie der Mischinfektion von *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586

Im planktonischen Milieu und im „Biofilm“ adhärten bis zu 225.000 *P. gingivalis* M5-1-2 in Mono- und Mischinfektion (mit *F. nucleatum* ATCC 25586) an KB-Zellen. Nach 18 h unterschieden sich die planktonischen Adhärenzwerte der Einzel- und Doppelinfektion statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die Adhärenz von *F. nucleatum* ATCC 25586 war deutlich geringer (Abb. 5, Tabellen 2 und 3 im Anhang).

Verglichen mit den Versuchen ohne Speichel hemmte dieser die Adhärenz von *P. gingivalis* M5-1-2 in der Mischinfektion signifikant (nach 1 h: $p < 0,001$, nach 18 h: $p < 0,01$).

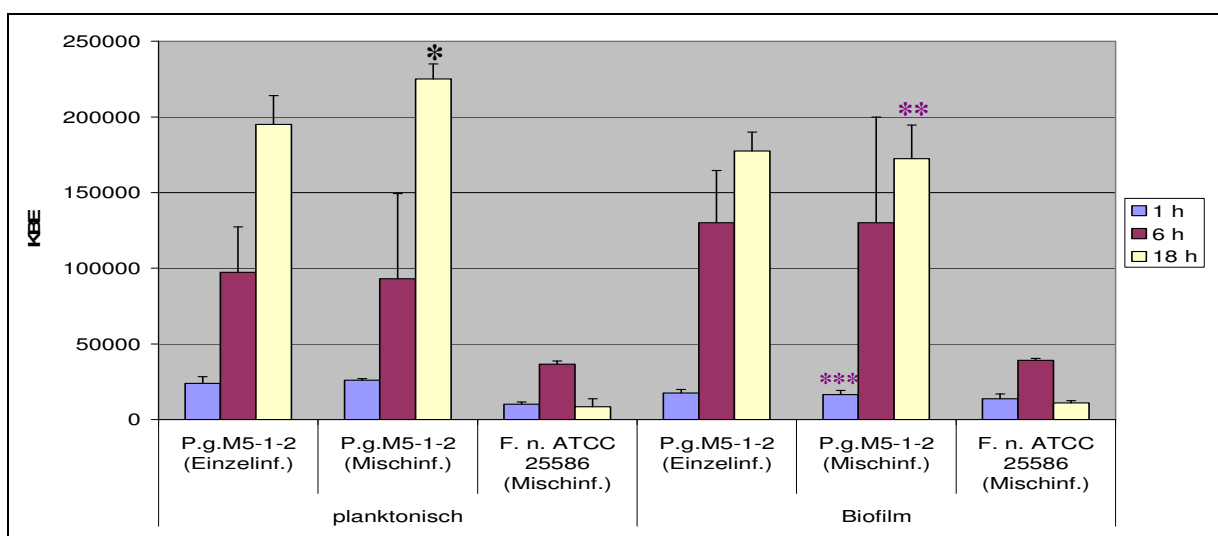


Abbildung 5: Adhärenzwerte der Einzelinfektion mit *P. gingivalis* M5-1-2 sowie der Mischinfektion mit *P. gingivalis* M5-1-2 und *F. nucleatum* ATCC 25586; Vergleich Einzelinfektion – Mischinfektion
* $p < 0,05$; Vergleich „Biofilm“ – planktonisch ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

5.1.3 Mischinfektionen mit *Tannerella forsythia* ATCC 43037

Im planktonischen Milieu stieg die Zahl adhärenter *T. forsythia* ATCC 43037 in Abhängigkeit von der Versuchsdauer in Einzel- und Doppelinfektion (mit *F. nucleatum* ATCC 25586) bis auf 218.000 an (Abb. 6). Generell zeigte sich für die Adhärenz von *T. forsythia* ATCC 43037 ein starker Anstieg von der 1 h- zur 6 h-Messung. *F. nucleatum* ATCC 25586 adhärierte zahlenmäßig weniger stark.

Im „Biofilm“ war die Zahl adhärenter *T. forsythia* ATCC 43037 nach 6 h signifikant ($p < 0,05$) höher als im planktonischen Versuch ($p < 0,05$); alle weiteren Ergebnisse glichen denen ohne Speichel.

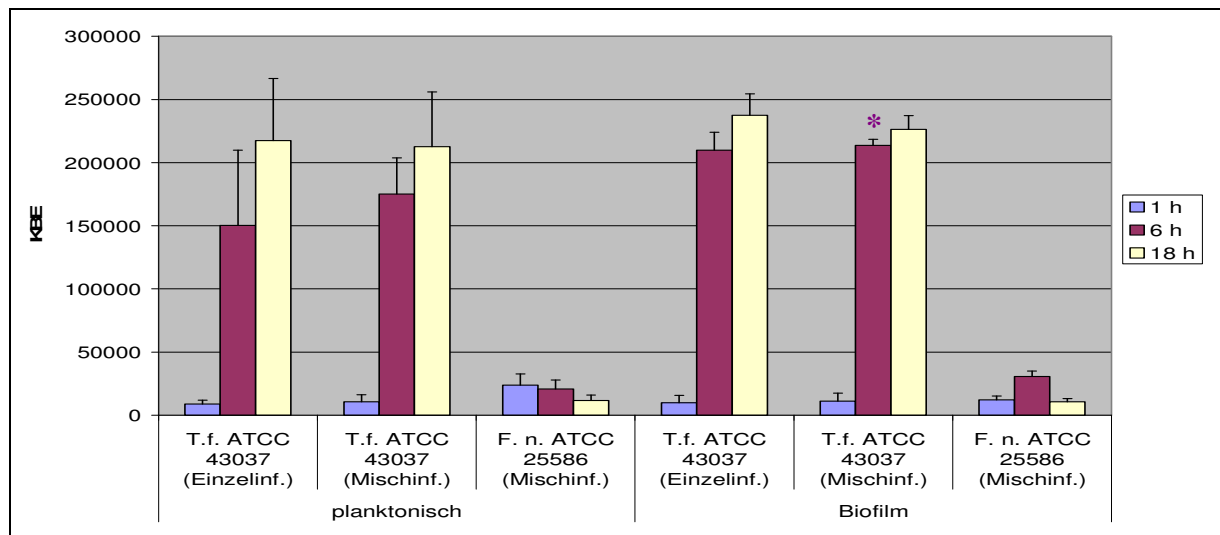


Abbildung 6: Adhärenzwerte der Einzelinfektion mit *T. forsythia* ATCC 43037 sowie der Mischinfektion von *T. forsythia* ATCC 43037 und *F. nucleatum* ATCC 25586, Vergleich „Biofilm“ – planktonisch * $p < 0,05$

Im Rahmen der planktonischen Doppelinfektion von *T. forsythia* ATCC 43037 und *P. gingivalis* ATCC 33277 wurden für *T. forsythia* ATCC 43037 die höchsten Werte nach 6 h und für *P. gingivalis* ATCC 33277 nach 1 h detektiert.

Im Vergleich mit den Werten ohne Speichel steigerte dieser leicht die Adhärenz von *P. gingivalis* ATCC 33277, während die Werte für *T. forsythia* ATCC 43037 nahezu unverändert blieben (Abb. 7).

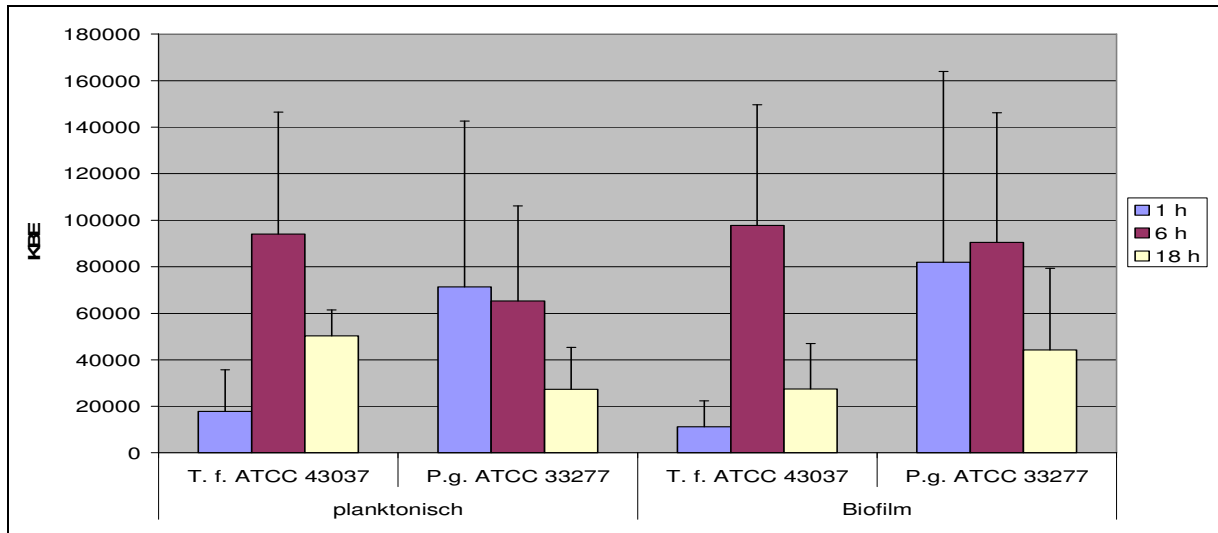


Abbildung 7: Adhärenzwerte der Doppelinfektion von *T. forsythia* ATCC 43037 und *P. gingivalis* ATCC 33277

Im Falle der Dreifachinfektion (*T. forsythia* ATCC 43037, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586) adhärten *T. forsythia* ATCC 43037 und *P. gingivalis* ATCC 33277 sowohl in den planktonischen Versuchen als auch im „Biofilm“ mit ähnlichen Zahlen wie im zuvor beschriebenen Doppelinfektionsversuch. Lediglich die 18 h-Werte lagen im Rahmen der Dreifachinfektion höher. *F. nucleatum* adhärte deutlich geringer (Abb. 8).

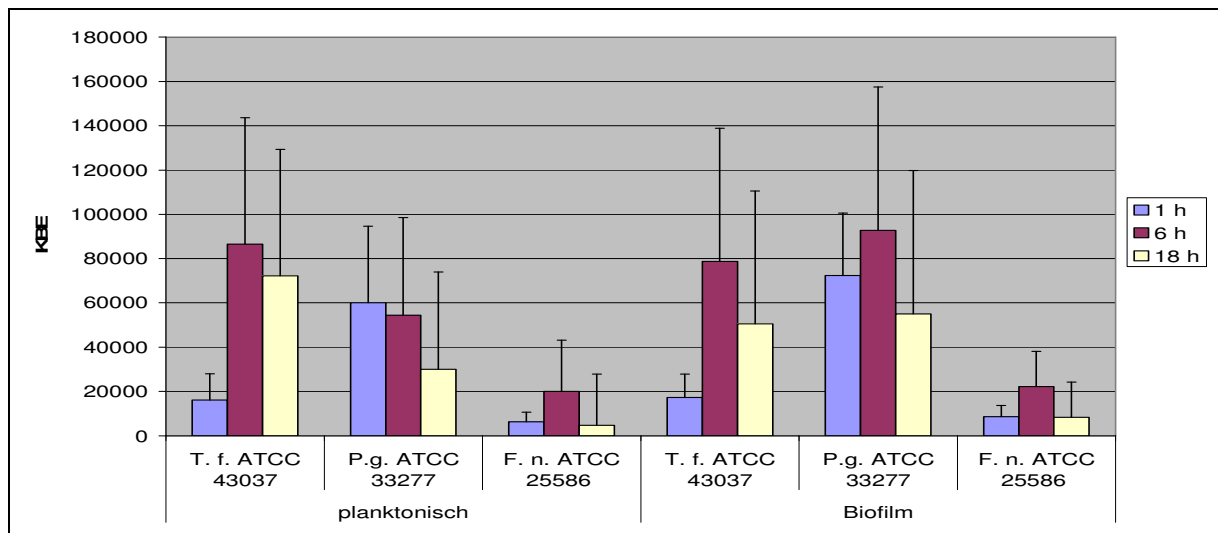


Abbildung 8: Adhärenzwerte der Dreifachinfektion aus *T. forsythia* ATCC 43037, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586

Für die Vierfachinfektion mit *T. denticola* ATCC 35405, *T. forsythia* ATCC 43037, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586 konnten keine Werte bestimmt werden, da die Kultur von *T. denticola* ATCC 35405 auf Agar-Platten nicht möglich war.

5.2 Internalisierung parodontopathogener Bakterien in KB-Zellen

Alles in allem lagen die Werte für die Internalisierung deutlich unter denen der Adhärenz, wobei sie etwa einem Viertel bis einem Drittel der korrespondierenden Adhärenzwerte entsprachen.

5.2.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4

A. actinomycetemcomitans Y4 invadierte ohne Zusatz von Speichel signifikant stärker als in den Versuchen mit künstlichem Speichel (nach 6 h: $p < 0,01$; nach 18 h: $p < 0,05$) (Abb. 9).

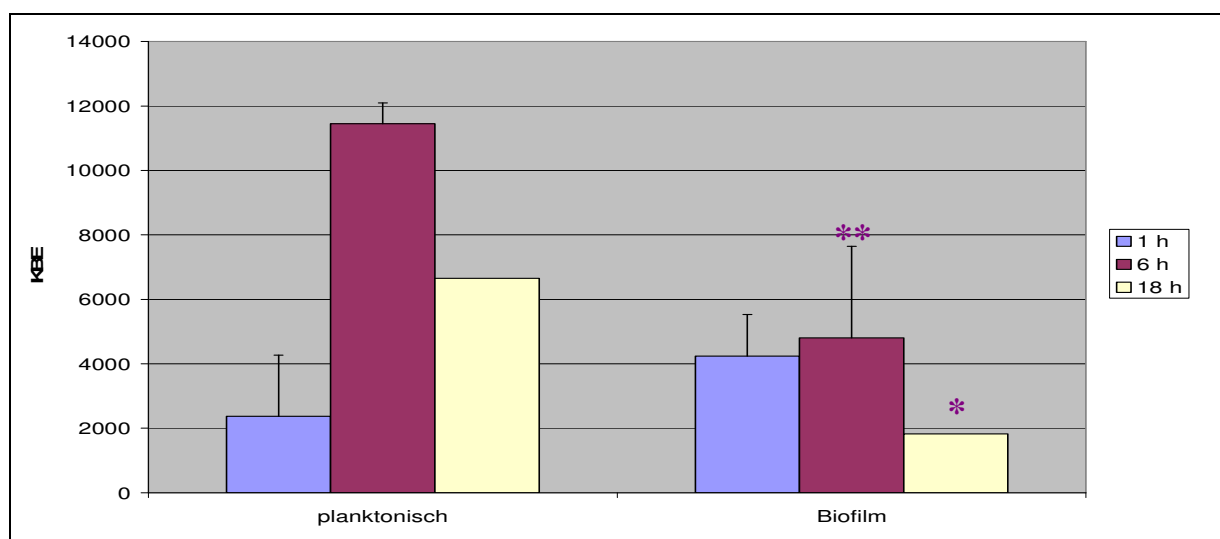


Abbildung 9: Internalisierungswerte von *A. actinomycetemcomitans* Y4 im planktonischen Milieu und im „Biofilm“; Vergleich „Biofilm“ – planktonisch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

5.2.2 *Porphyromonas gingivalis* und *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586

Im planktonischen Milieu internalisierten bis zu 35.000 *P. gingivalis* ATCC 33277 (Einzel- und Doppelinfektion mit *F. nucleatum* ATCC 25586).

Bei Zusatz von synthetischem Speichel verhielten sich die Kurvenverläufe ähnlich den planktonischen. Die Zahl internalisierter Bakterien war allerdings im planktonischen Milieu tendenziell größer als im „Biofilm“ (Abb.10).

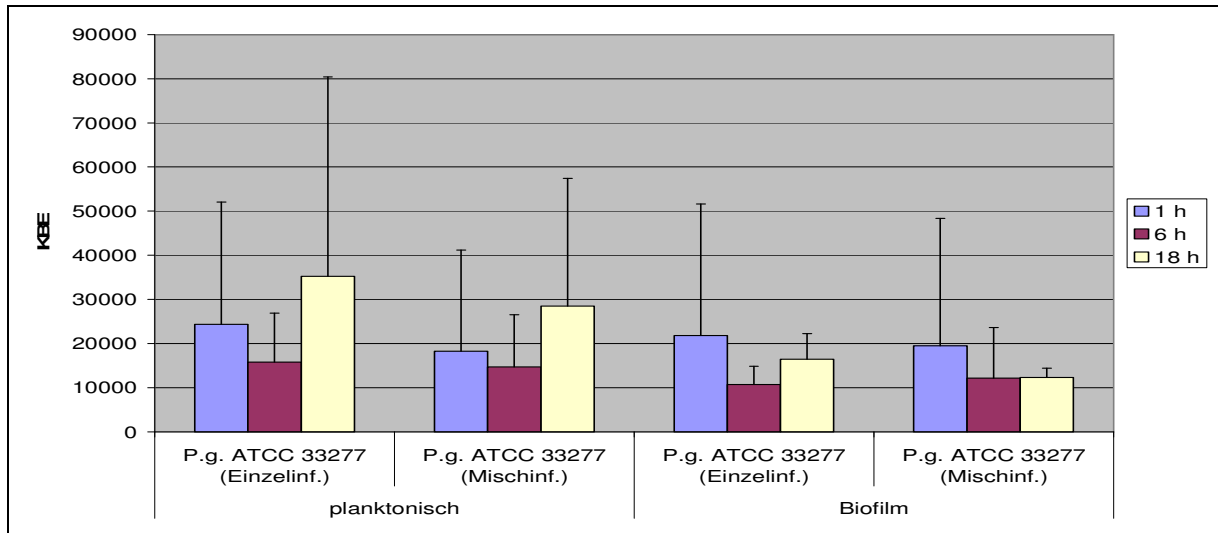


Abbildung 10: Invasionswerte der Einzelinfektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 sowie der Mischinfektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586

Nach nur geringen 1 h- und 6 h-Werten stieg die Zahl internalisierter *P. gingivalis* M5-1-2 im planktonischen Einzelinfektionsversuch nach 18 h stark an (90.000 KBE). Übertroffen ($p < 0,001$) wurde dieses Ergebnis vom 18 h-Wert (150.000 KBE) der Doppelinfektion mit *F. nucleatum* ATCC 25586 (Abb. 11, Tabellen 4 und 5 im Anhang).

Bei Zusatz von Speichel waren die Werte kleiner als im planktonischen Experiment (*P. gingivalis* M5-1-2 in Einzelinfektion nach 1 h und Mischinfektion nach 18 h: $p < 0,001$). Auch im „Biofilm“ stieg die Zahl invadierter Bakterien mit zunehmender Versuchsdauer an.

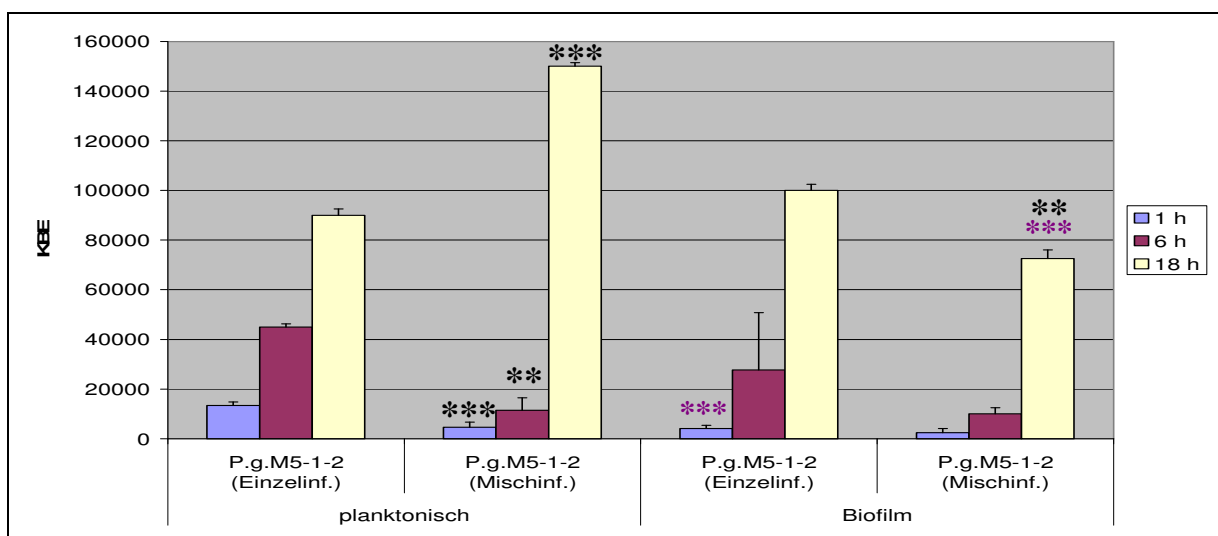


Abbildung 11: Invasionswerte der Einzelinfektion mit *P. gingivalis* M5-1-2 sowie der Mischinfektion mit *P. gingivalis* M5-1-2 und *F. nucleatum* ATCC 25586; Vergleich Einzelinfektion – Mischinfektion ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Vergleich „Biofilm“ – planktonisch *** $p < 0,001$

5.2.3 Mischinfektionen mit *Tannerella forsythia* ATCC 43037

Die Zahl internalisierter *T. forsythia* ATCC 43037 stieg im planktonischen Milieu mit zunehmender Versuchsdauer in Einzel- und Doppelinfektion (mit *F. nucleatum* ATCC 25586) bis auf 94.000 nach 18 h (Doppelinfektion) an.

Für den „Biofilm“ wurden tendenziell höhere Werte detektiert.

Auffallend war in allen Versuchen der deutliche Anstieg internalisierter Bakterien von der 1 h- zur 6 h-Messung (Abb. 12).

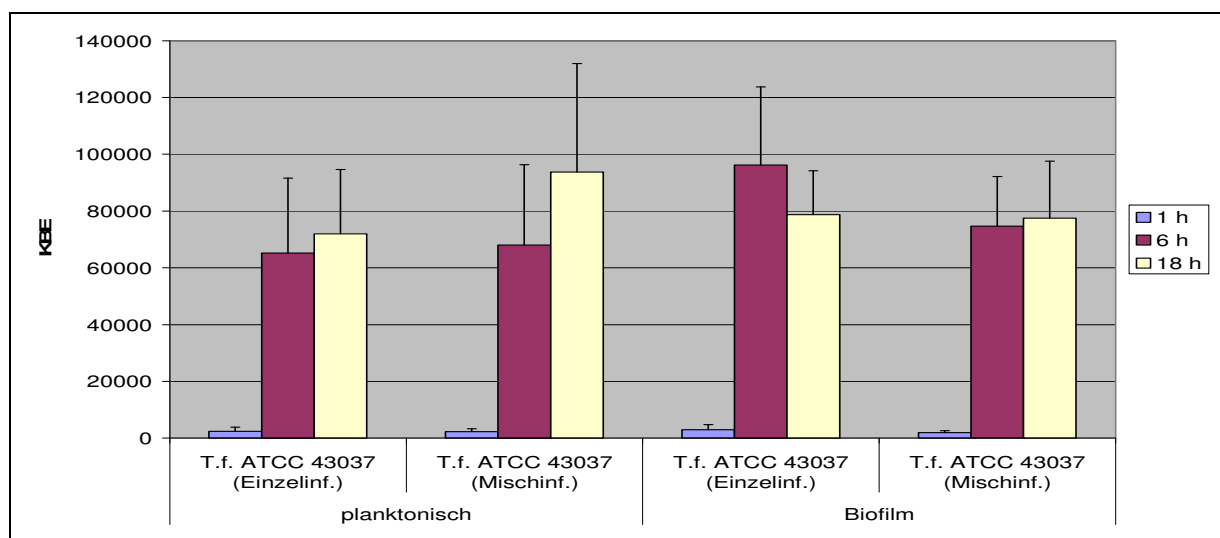


Abbildung 12: Invasionswerte der Einzelinfektion mit *T. forsythia* ATCC 43037 sowie der Mischinfektion mit *T. forsythia* ATCC 43037 und *F. nucleatum* ATCC 25586

Bei der Doppelinfektion von *T. forsythia* ATCC 43037 und *P. gingivalis* ATCC 33277 ergaben sich im planktonischen Milieu für beide Bakterien relativ übereinstimmende Invasionswerte. Die meisten internalisierten Bakterien (ca. 30.000) wurden dabei für beide Spezies nach 6 h detektiert.

In den Versuchen mit synthetischem Speichel invadierte *T. forsythia* ATCC 43037 stärker als *P. gingivalis* ATCC 33277.

Die Gesamtzahl internalisierter Bakterien war in den planktonischen Versuchen tendenziell größer als in den Experimenten mit Speichel (Abb. 13).

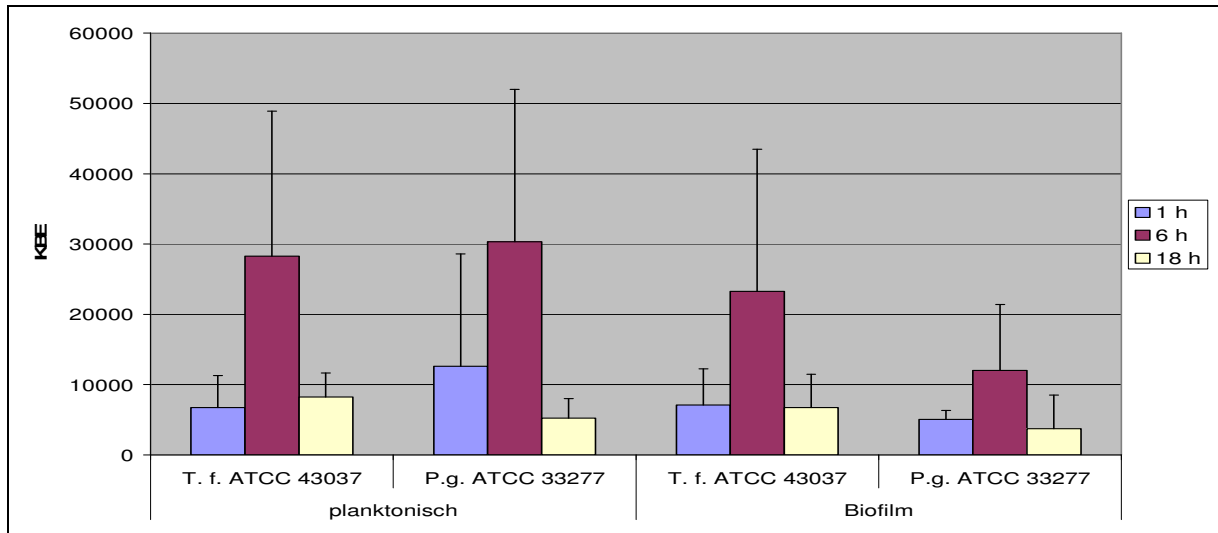


Abbildung 13: Invasionswerte der Doppelinfektion mit *T. forsythia* ATCC 43037 und *P. gingivalis* ATCC 33277

Im Falle der Dreifachinfektion (*T. forsythia* ATCC 43037, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586) stieg die Anzahl internalisierter *T. forsythia* ATCC 43037 mit zunehmender Versuchsdauer an. Dies galt nicht nur für die planktonischen Versuche, sondern auch für die Experimente mit künstlichem Speichel. Die höheren Werte wurden in den planktonischen Versuchen ermittelt (Tabellen 4 und 5 im Anhang).

Die Zahl internalisierter *P. gingivalis* ATCC 33277 blieb generell unter dem Wert von 9.000 (Abb. 14).

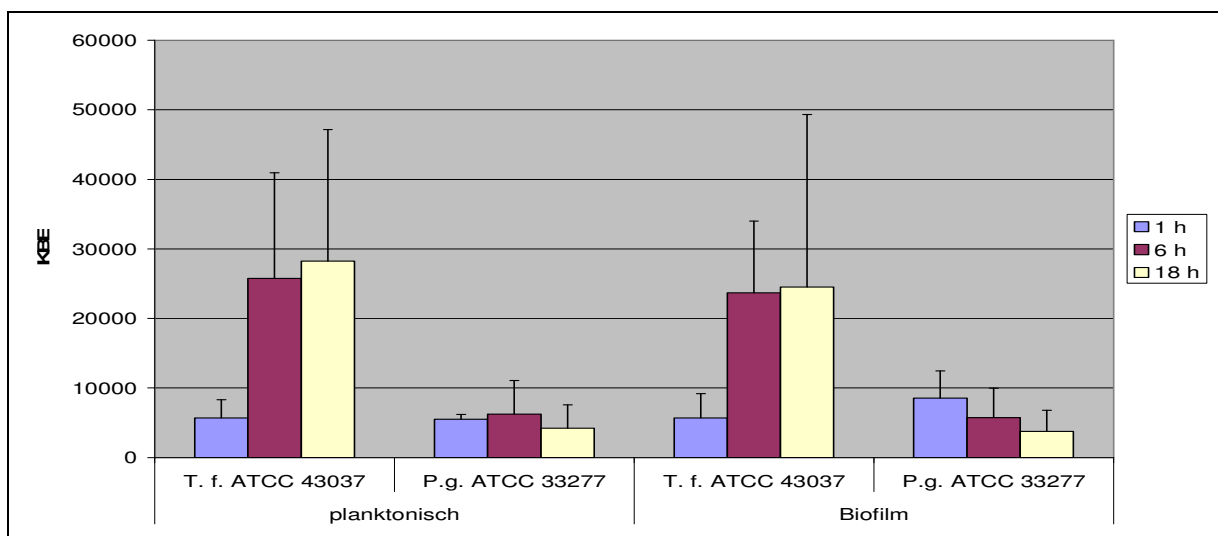


Abbildung 14: Invasionswerte der Dreifachinfektion mit *T. forsythia* ATCC 43037, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586

5.3 Interleukine

Untersucht wurde in der vorliegenden Studie die Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus KB-Zellen 1 h, 6 h und 18 h nach Einzelinfektion bzw. Mischinfektion mit parodontopathogenen Bakterien. Um einen Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Versuche untereinander zu ermöglichen, wurden die Daten auf einen gemeinsamen Ausgangswert bezogen. Zu diesem Zweck wurde jeweils der Mittelwert der 1 h-, 6 h- bzw. 18 h-Referenzwerte der nicht infizierten KB-Zellen (Kontrollkultur) gebildet und dieser mit den speziell für jeden Versuch ermittelten 1 h-, 6 h- und 18 h-Kontrollergebnissen ins Verhältnis gesetzt.

5.3.1 Interleukin-6

Die IL-6-Freisetzung lag nach 1 h für nicht infizierte KB-Zellen im planktonischen Milieu bei 0,7 pg/ml Zellüberstand und im „Biofilm“ bei 1,3 pg/ml ($p < 0,05$). Im Bereich dieser Werte lagen alle 1 h-Resultate mit Ausnahme der Vierfachinfektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277, *T. forsythia* ATCC 43037, *T. denticola* ATCC 35405 und *F. nucleatum* ATCC 25586 im planktonischen Milieu (6,5 pg/ml, $p < 0,05$). Nach 6 h und 18 h konnten für die nicht infizierten KB-Zellen ohne Speichel IL-6-Spiegel von 2,4 pg/ml bzw. 6,6 pg/ml ($p < 0,05$) und mit Speichel Konzentrationen von 3,2 pg/ml bzw. 6,8 pg/ml ($p < 0,05$) ermittelt werden.

Ein Vergleich aller Einzelinfektionen zeigte die höchsten IL-6-Spiegel in den Überständen der mit *F. nucleatum* ATCC 25586 inkubierten KB-Zellen. Hierbei erwies sich der Unterschied verglichen mit den korrespondierenden Kontrollwerten in beiden Milieus für alle Messungen als signifikant ($p < 0,05$). Nach Infektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 stieg der IL-6-Spiegel in den KB-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Versuchsdauer in beiden Milieus ebenfalls deutlich an, erreichte aber die finalen 18 h-Werte von *F. nucleatum* ATCC 25586 nicht (Abb. 15).

Die IL-6-Konzentrationen in den KB-Zellüberständen nach Einzelinfektion mit *T. forsythia* ATCC 43037 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 entsprachen nach 6 h und 18 h weitestgehend den Werten der nicht infizierten Zellkulturen (Tabelle 6 im Anhang).

Für *T. denticola* ATCC 35405 hingegen lagen die Werte unter denen der Kontrolle (nach 6 h ohne Speichel und 18 h mit Speichel $p < 0,05$).

Im Falle der Infektion mit *P. gingivalis* M5-1-2 war kein IL-6 nachweisbar ($p < 0,001$).

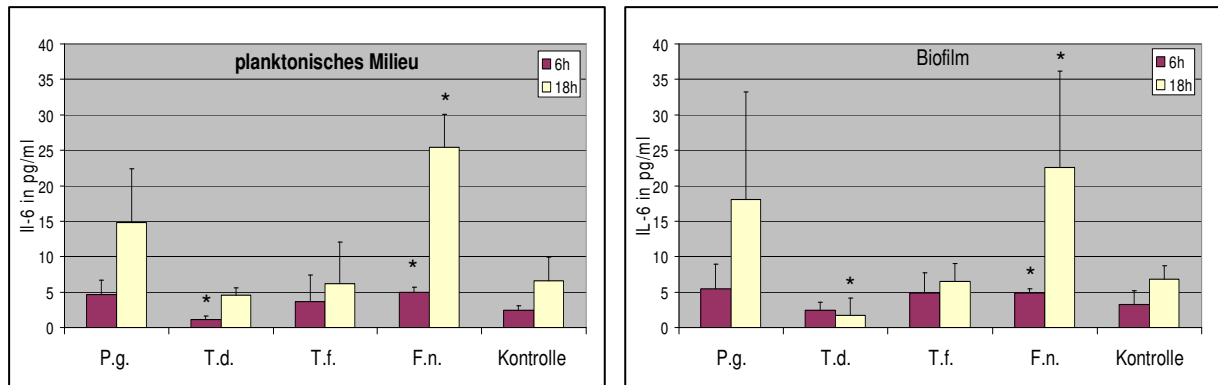


Abbildung 15: IL-6-Konzentrationen in den KB-Zellüberständen nach 6- und 18-stündigen Einzelinfektionen im planktonischen Milieu und im „Biofilm“; *P. gingivalis* ATCC 33277 (*P. g.*), *T. forsythia* ATCC 43037 (*T. f.*), *T. denticola* ATCC 35405 (*T. d.*), *F. nucleatum* ATCC 25586 (*F. n.*); Vergleich Einzelinfektion – Kontrolle * $p < 0,05$

Die höchsten IL-6-Spiegel wurden im planktonischen Milieu für die Doppelinfektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586 detektiert (Abb. 16, Tabelle 7 im Anhang). Dabei entsprach der 18 h-Wert (233 pg/ml) dem 35fachen der Kontrolle ($p < 0,05$). Auch in den Versuchen mit künstlichem Speichel konnten mit zunehmender Versuchsdauer steigende IL-6-Spiegel gemessen werden. Diese blieben jedoch unter den planktonischen Werten (nach 18 h, $p < 0,05$).

Die IL-6-Spiegel der Doppelinfektion mit *T. forsythia* ATCC 43037 und *F. nucleatum* ATCC 25586 überstiegen ebenfalls die Werte der nicht infizierten KB-Zellen (nach 18 h jeweils $p < 0,05$), wobei die Absolutwerte ohne künstlichen Speichel (60 pg/ml nach 18 h) kleiner waren als die mit Speichel (101 pg/ml nach 18 h).

Während die IL-6-Konzentration nach Dreifachinfektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277, *T. forsythia* ATCC 43037 und *F. nucleatum* ATCC 25586 im planktonischen Milieu von der 1 h- zur 18 h-Messung geringfügig anstieg, fiel sie im „Biofilm“ leicht ab. Für die Vierfachinfektion (*P. gingivalis* ATCC, *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*) wurden Werte detektiert, die sowohl ohne als auch mit synthetischem Speichel ähnlich den Kontrollspiegeln waren. Nach 18 h unterschieden sich jedoch Kontrolle und „Biofilmwert“ signifikant ($p < 0,05$).

Nach Doppelinfektion mit *P. gingivalis* M5-1-2 und *F. nucleatum* ATCC 25586 war in beiden Versuchsanordnungen (mit und ohne Speichel) kein IL-6 in den KB-Zellüberständen nachweisbar ($p < 0,01$).

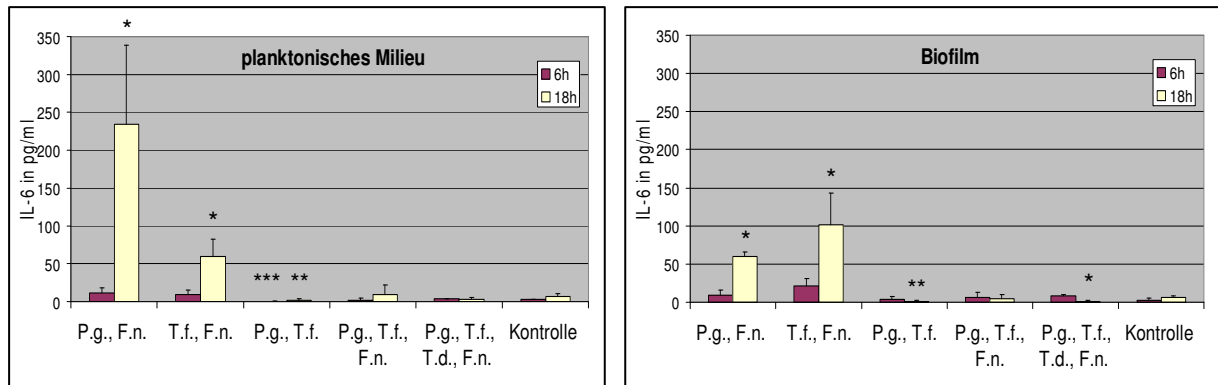


Abbildung 16: IL-6-Konzentrationen in den KB-Zellüberständen nach 6- und 18-stündigen Mischinfektionen im planktonischen Milieu und im „Biofilm“; *P. gingivalis* ATCC 33277 (*P. g.*), *T. forsythia* ATCC 43037 (*T. f.*), *T. denticola* ATCC 35405 (*T. d.*), *F. nucleatum* ATCC 25586 (*F. n.*); Vergleich Mischinfektion – Kontrolle * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

5.3.2 Interleukin-8

Die IL-8-Freisetzung lag nach 1 h für alle Versuche im planktonischen Milieu im Bereich des Kontrollwertes (3,13 pg/ml) der nicht infizierten KB-Zellen. Auch im „Biofilm“ lagen alle 1 h-Messwerte im Bereich des Kontrollwertes von 4,8 pg/ml. Die nicht infizierten KB-Zellen setzten ohne Speichel nach 6 h bzw. 18 h IL-8 in Konzentrationen von 13,5 pg/ml bzw. 29,9 pg/ml frei, mit Speichel hingegen 14,5 pg/ml bzw. 39,1 pg/ml (6 h – 18 h, $p < 0,01$).

Ein Vergleich aller Einzelinfektionen zeigte die höchsten IL-8-Spiegel in den Überständen der mit *F. nucleatum* ATCC 25586 kultivierten KB-Zellen (Abb. 17, Tabelle 8 im Anhang). Nach 18 h wurden im planktonischen Milieu (103 pg/ml) und im „Biofilm“ (136 pg/ml) Werte gemessen, die das Referenzniveau der nicht infizierten KB-Zellkultur überschritten ($p < 0,01$).

Nach Einzelinfektion mit *T. forsythia* ATCC 43037, *P. gingivalis* ATCC 33277 bzw. *T. denticola* ATCC 35405 ($p < 0,05$) lagen sowohl in den planktonischen Versuchen als auch in denen mit künstlichem Speichel die Ergebnisse unter den Kontrollwerten der nicht infizierten KB-Zellen. Für *P. gingivalis* M5-1-2 war in beiden Versuchsanordnungen kein IL-8 in den KB-Zellüberständen nachweisbar (verglichen mit der Kontrolle, $p < 0,001$).

Die Werte für die Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 lagen sowohl im planktonischen Milieu als auch im „Biofilm“ im Bereich der Kontrollwerte (Tabelle 8 im Anhang). Ein Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Speichel konstatierte die größeren Werte im „Biofilm“ (nach 6 und 18 h, $p < 0,05$).

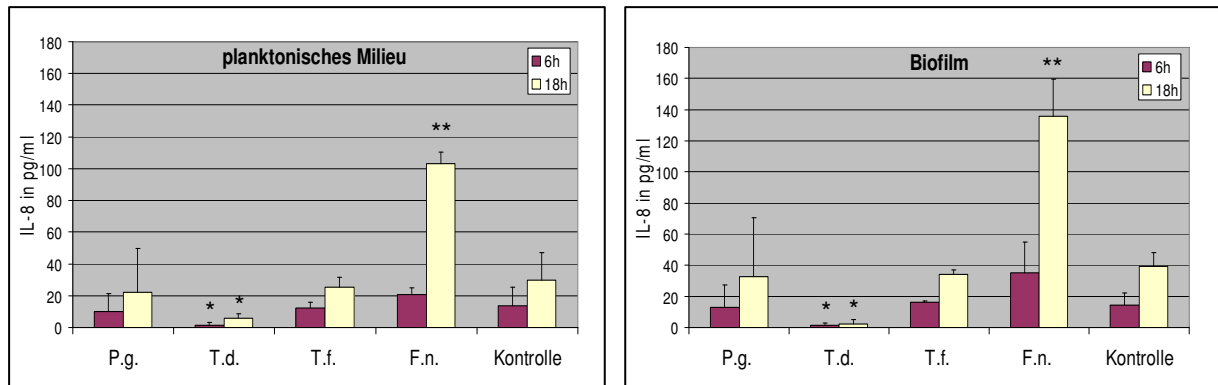


Abbildung 17: IL-8-Konzentrationen in den KB-Zellüberständen nach 6- und 18-stündigen Monoinfektionen im planktonischen Milieu und im „Biofilm“; *P. gingivalis* ATCC 33277 (*P. g.*), *T. forsythia* ATCC 43037 (*T. f.*), *T. denticola* ATCC 35405 (*T. d.*), *F. nucleatum* ATCC 25586 (*F. n.*); Vergleich Einzelinfektion – Kontrolle * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Die größten IL-8-Konzentrationen wurden für die Doppelinfektion von *T. forsythia* ATCC 43037 und *F. nucleatum* ATCC 25586 gemessen (Abb. 18, Tabelle 9 im Anhang). Sowohl im planktonischen Milieu als auch im „Biofilm“ überstiegen die 6 h- und 18 h-Messwerte das Kontrollniveau signifikant ($p < 0,05$), wobei der höchste Spiegel (205 pg/ml) nach 18 h im „Biofilm“ gemessen wurde.

Auch nach Doppelinfektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586 stiegen die IL-8-Konzentrationen mit zunehmender Versuchsdauer in den KB-Zellüberständen an. Sie lagen in beiden Versuchsansätzen (planktonisch, „Biofilm“) über den Kontrollwerten (nach 6 h im „Biofilm“: $p < 0,01$). Die höheren Werte wurden im „Biofilm“ detektiert (nach 18 h mit Biofilm 102 pg/ml, ohne 60,8 pg/ml).

In den Überständen der gemeinsam mit *P. gingivalis* ATCC 33277, *T. forsythia* ATCC 43037 und *F. nucleatum* ATCC 25586 (Dreifachinfektion) inkubierten KB-Zellen wurden mit zunehmender Versuchsdauer steigende IL-8-Konzentrationen ermittelt. Diese lagen in den Versuchen ohne Speichel tendenziell über den Kontrollwerten, in den Experimenten mit künstlichem Speichel hingegen auf Höhe der Kontrolle (Abb. 18, Tabelle 9 im Anhang).

Nach Doppelinfektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 und *T. forsythia* ATCC 43037 wurden IL-8-Konzentrationen ermittelt, die die entsprechenden Referenzwerte nach 6 h und 18 h signifikant unterschritten (ohne Speichel nach 6 h $p < 0,001$, nach 18 h $p < 0,01$; mit Speichel nach 18 h $p < 0,001$). Gleiches traf auf die Doppelinfektion mit *P. gingivalis* M5-1-2 und *F. nucleatum* ATCC 25586 zu (nach 6 h und 18 h $p < 0,05$). Auch nach Vierfachinfektion (*P.*

gingivalis ATCC 33277, T. forsythia ATCC 43037, T. denticola ATCC 35405 und F. nucleatum ATCC 25586) waren im Vergleich mit der Kontrolle die IL-8 Spiegel deutlich niedriger (nach 6 h $p < 0,01$ und nach 18 h $p < 0,001$ in beiden Milieus).

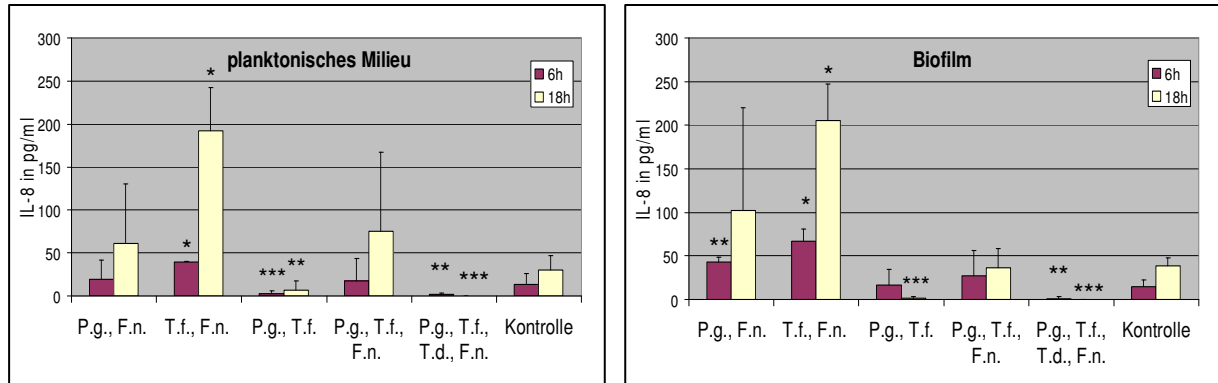


Abbildung 18: IL-8-Konzentrationen in den KB-Zellüberständen nach 6- und 18-stündigen Mischinfektionen im planktonischen Milieu und im „Biofilm“; P. gingivalis ATCC 33277 (P. g.), T. forsythia ATCC 43037 (T. f.), T. denticola ATCC 35405 (T. d.), F. nucleatum ATCC 25586 (F. n.); Vergleich Mischinfektion – Kontrolle * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

5.4 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Abbildung 19 zeigt REM-Aufnahmen von P. gingivalis M5-1-2 nach 15-minütiger und ein-stündiger Inkubation mit KB-Zellen und künstlichem Speichel. Biofilme, wie sie an festen Oberflächen wachsen, bilden sich an Epithelzellen nicht. Dennoch sind biofilmähnliche Strukturen in beiden Teilabbildungen erkennbar. Während nach 15 Minuten nur wenige Bakterien an der Oberfläche der KB-Zellen adhären, sind nach 1 h deutlich mehr zu sehen.

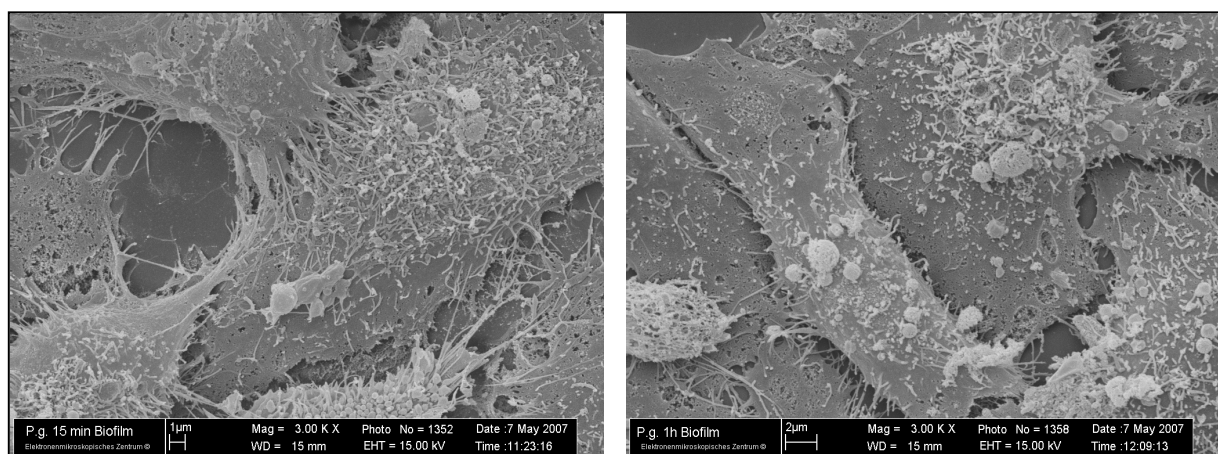


Abbildung 19: REM-Aufnahmen von P. gingivalis M5-1-2 nach 15-minütiger (links) und 1-stündiger (rechts) Inkubation mit KB-Zellen und künstlichem Speichel

REM-Aufnahmen der Doppelinfektion von *P. gingivalis* M5-1-2 und *F. nucleatum* ATCC 25586 sind in Abbildung 20 dargestellt. Dabei ist die Mischinfektion ohne Zusatz von Speichel (planktonisches Milieu - links) derjenigen mit künstlichem Speichel (Biofilm - rechts) nach 1 h gegenübergestellt. Trotz der erkennbaren dreidimensionalen Biofilmstrukturen in der rechten Teilabbildung, bilden sich an Epithelzellen keine komplexen Biofilme wie an glatten Oberflächen. Hinsichtlich der Adhärenz beider Bakterien erkennt man (wie schon anhand der KBE quantitativ festgestellt) keinen Unterschied zwischen den Versuchen mit und ohne künstlichem Speichel. *F. nucleatum* ATCC 25586 und *P. gingivalis* M5-1-2 adhäreren in beiden Milieus zwar an ein und dieselben Epithelzellen, allerdings einzeln, ohne dass eine unmittelbare Koaggregation beider Bakterien nachweisbar wäre.

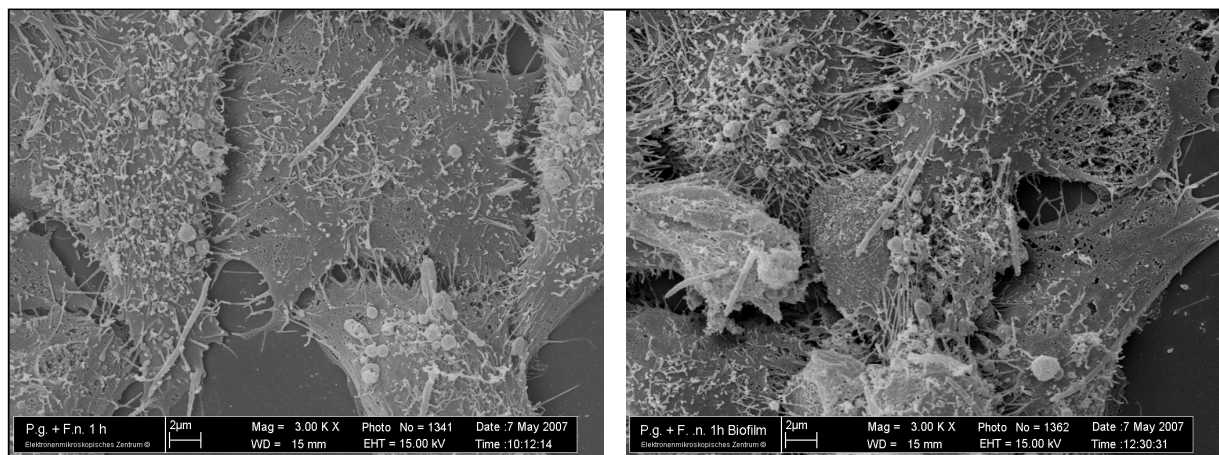


Abbildung 20: REM-Aufnahmen der Doppelinfektion von *P. gingivalis* M5-1-2 und *F. nucleatum* ATCC 25586 nach 1-stündiger Inkubation mit KB-Zellen in planktonischem Milieu (links) und im „Biofilm“ (rechts)

6 Diskussion

6.1 Methodik

Alle Versuche der vorliegenden experimentellen Studie wurden an KB-Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie ist eine permanente Zellkultur. Bei der Durchführung von Adhärenz- und Internalisierungsstudien ist diese Zelllinie ein wissenschaftlich etabliertes Modell, welches in zahlreichen anerkannten Studien zur Anwendung kam (Duncan et al. 1993, Madianos et al. 1997, Yumoto et al. 1999, Agnani et al. 2000, Dorn et al. 2000, Han et al. 2000, Deng et al. 2001, Houalet-Jeanne et al. 2001, Lourbakos et al. 2001, Eick et al. 2002, Tada et al. 2003, Han et al. 2005, Eick et al. 2006).

Ein klarer Vorteil dieser permanenten Epithelzelllinie liegt darin begründet, dass sie in allen Versuchen nahezu gleiche Bedingungen schafft. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch über viele Passagen hinweg ermöglicht. Primäre Epithelzellkulturen garantieren diese vorteilhaften Eigenschaften möglicherweise nicht in diesem Maße. Hier stellen die genetische Disposition des Wirtsorganismus' und andere interindividuelle Modifikationen die Vergleichbarkeit der Messdaten untereinander in Frage. Zudem sind die Kulturbedingungen für direkt aus Probanden gewonnene Epithelzellen sehr viel schwieriger und aufwendiger als diejenigen für KB-Zellen (Sandros et al. 2000).

Nachteilig bei Anwendung einer permanenten Zelllinie ist, dass die Zellen neoplastisch verändert sind. Damit besteht die Möglichkeit, dass ihre Eigenschaften etwa in Bezug auf Stoffwechsel und Rezeptorausstattung von primären Epithelzellkulturen abweichen. Dennoch konnte von Sandros et al. (2000) in ähnlich gelagerten Studien die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von KB-Zellen mit physiologisch vorkommenden Zellen bezüglich der in der vorliegenden Studie untersuchten Eigenschaften (z. B. Zytokine) nachgewiesen werden.

Die in der vorliegenden Studie angesetzten Untersuchungszeitpunkte 1 h, 6 h und 18 h stellen einen guten Ansatz für die Evaluation der entscheidenden initialen Ereignisse nach Inkubation von Epithelzellen mit parodontopathogenen Bakterien dar. Um Datenmaterial über einen längeren Zeitraum zu erhalten, wäre in zukünftigen Versuchen ein längerer Beobachtungszeitraum sinnvoll. Dies würde insbesondere im Kontext der Etablierung eines Biofilmes weitere wichtige Langzeitinformationen liefern.

Physiologischerweise ist die Gingiva aus mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel aufgebaut. Keratinozyten stellen den überwiegenden Anteil der beteiligten Zellen dar. Neben diesen Epithelzellen sind noch Langerhans-Zellen und Melanozyten im Epithelzellverbund anzutreffen. Der gesamte Zellverband sitzt einer Basalmembran auf. Die Versuche dieser Studie wurden an einer Epithelzell-Monolayer durchgeführt. Dieser Versuchsaufbau stellt ein probates In-vitro-Modell dar (Sandros et al. 2000, Chen et al. 2001, Eick et al. 2002, Sabet et al. 2003, Umemoto und Hamada 2003). Um die tatsächlichen In-vivo-Bedingungen noch realistischer zu simulieren, könnte in weiterführenden Studien eine Versuchsanordnung gewählt werden, die dem physiologischen Aufbau der Gingiva deutlicher Rechnung trägt. Hier stellt die Etablierung einer jedoch wesentlich aufwendigeren und anfälligeren Multilayer-Methode einen weiterführenden Ansatzpunkt dar.

Physiologischerweise wird die Adhärenz in der Mundhöhle durch ständigen Speichelfluss, mechanische Reinigungsprozesse durch Zunge und Wange, ständiges Abschilfern und Erneuern der Epithelzellen sowie antimikrobielle Faktoren erschwert (Socransky und Haffajee 2002). All diese Einflussfaktoren sind bei In-vitro-Versuchen nicht vorhanden. Daher dürfte bei dieser Art von Experimenten initial mit höheren Ergebnissen als unter In-vivo Bedingungen zu rechnen sein. Mit zunehmender Dauer des Versuches häufen sich jedoch methodenbedingt Stoffwechselendprodukte an, die die Zeitdauer einer solchen Versuchsanordnung limitieren.

Auf die Anwendung synthetischen Speichels (ISO 10993) wurde bewusst orientiert. Durch die definierte Zusammensetzung dieses Mediums konnten in diesem Zusammenhang zu erwartende methodische Fehler weitgehend minimiert werden. Anstelle des künstlichen Speichels wäre auch der Einsatz von natürlichem Speichel möglich. Hier gilt es jedoch die Probleme zu bedenken, die mit einem derartigen Versuchsaufbau verbunden sind: individuell unterschiedliche Speichelzusammensetzung, Gewinnung und Konservierung des Probandenspeichels sowie Immunglobuline des Patienten.

In der vorliegenden Studie wurden die üblicherweise eingesetzten Referenzstämme der jeweiligen Bakterien *A. actinomycetemcomitans* Y4 (Kachlany et al. 2000a, Komatsuzawa et al. 2002), *F. nucleatum* ATCC 25586 (Han et al. 2005), *P. gingivalis* ATCC 33277 (Chen et al. 2001, Huang et al. 2004, Hosogi und Duncan 2005, Eick et al. 2006), *T. denticola* ATCC

35405 (Kuramitsu et al. 2005, Yamada et al. 2005, Miyamoto et al. 2006) und *T. forsythia* ATCC 43037 (Munemasa et al. 2000, Inagaki et al. 2005, Sharma et al. 2005) verwendet.

Unabhängig davon wurde ein Patientenisolat von *P. gingivalis* mit der Bezeichnung M5-1-2 verwendet. Dieser Stamm wurde aus der Mundhöhlenflora eines Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis gewonnen. Das Bakterium zeichnet sich durch eine dicke Schleimkapsel aus (Müller 2003). Auf die Anwendung eines solchen klinischen Isolates wurde bewusst orientiert, um die an den Laborstämmen getesteten Parameter auch an einem klinischen Beispiel zu untersuchen.

Die Ermittlung von KBE von *T. denticola* ATCC 35405 gelang nicht. Diese Spezies konnte nur in Halbflüssigmedien für den Einsatz im Versuch kultiviert werden. Die aktuelle Literatur bestätigt die nahezu unmögliche Kultur dieses Bakteriums (Chan et al. 1993, Ellen und Galimanas 2005).

6.2 Adhärenz und Invasion parodontopathogener Bakterien an KB-Zellen

Für alle untersuchten Bakterien konnte die Fähigkeit zu Adhärenz und Invasion an KB-Zellen nachgewiesen werden. Diese Eigenschaften variierten stammspezifisch unterschiedlich stark.

Die Zahl adhärenter *P. gingivalis* ATCC 33277 in Einzel- und Mischinfektion war nach 1 h verglichen mit den anderen Bakterien relativ hoch. Für *P. gingivalis* M5-1-2 waren die Werte hingegen bedeutend geringer. Überraschenderweise zeigte ein Vergleich der Adhärenzwerte von *P. gingivalis* in Einzelinfektion und Mischinfektion mit *F. nucleatum* ATCC 25586 keine signifikanten Unterschiede. REM-Aufnahmen der Mischinfektion von *P. gingivalis* M5-1-2 und *F. nucleatum* ATCC 25586 konnten zudem keine Koaggregation beider Bakterien nachweisen. Annähernd gleiche Ergebnisse waren nach 6 h für *P. gingivalis* ATCC 33277 und M5-1-2 erkennbar. Nach 18 h übertraf die Anzahl adhärenter *P. gingivalis* M5-1-2 (4% der angeimpften Bakterienzahl) diejenige des Referenzstammes ATCC 33277 bei weitem ($p < 0,01$).

Aus der Gegenüberstellung der Stämme ATCC 33277 und M5-1-2 ist ersichtlich, dass die Fähigkeit zur Adhärenz innerhalb einer Spezies stammspezifisch stark variieren kann (Duncan et al. 1993, Eick et al. 2002). Zwar wird *P. gingivalis* ATCC 33277 in der Literatur

schon als adhärenz und invasiv beschrieben (Dorn et al. 2000, Huang et al. 2001), dennoch adhärenzte *P. gingivalis* M5-1-2 in noch stärkerem Ausmaß an die KB-Zellen.

Grundsätzlich wird die Adhärenz von *P. gingivalis* an Epithelien über vielfältige Strukturen vermittelt. Fimbrien stellen unter diesen den wichtigsten Faktor dar (Lamont und Jenkinson 1998, Umemoto und Hamada 2003, Amano et al. 2004). Besonders potent sind die Stämme mit Typ II-Fimbrien, zu denen auch das klinische Isolat *P. gingivalis* M5-1-2 gehört (Nakagawa et al. 2002, Asano et al. 2003). Eine weitere wichtige Rolle spielen die Adhäsionsdomänen der Gingipaine (Chen und Duncan 2004). In Studien von Park und Lamont (1998) ging eine verminderte Gingipain-Aktivität mit deutlich verringerter Invasionsbereitschaft einher. Eick et al. (2006) ermittelten für den Stamm ATCC 33277 eine reduzierte Expression von Arg-Gingipainen nach Kontakt mit KB-Zellen. Dies könnte die geringeren 18-stündigen Adhärenz- und Invasionswerte im Vergleich zum Stamm M5-1-2 erklären. Die für M5-1-2 im Zusammenhang mit IL-8 spekuliertere stärkere proteolytische Aktivität begünstigte ebenfalls die Adhärenz durch Erschließung kryptischer Bindungsdomänen. Bestärkt wird diese These durch Studien mit *P. gingivalis*, in denen ein radikaler IL-8-Abbau mit vermehrter Adhäsions- und Invasionsbereitschaft korrelierte (Madianos et al. 1997). Chen et al. (2001) zeigten übereinstimmend mit den hier erzielten Ergebnissen nach 1 h eine Adhärenz von 1-2% der angeimpften Bakterien. Huang et al. (2001) ermittelten hingegen für die Adhärenz des Stammes ATCC 33277 an Epithelzellen niedrigere Werte. Vergleichbare Werte im Sinne der hier vorliegenden Verlaufsstudie über einen längeren Inkubationszeitraum wurden in der Literatur nicht gefunden.

Neben der oben spekulierten ungleichen proteolytischen Aktivität ist die unterschiedliche Sauerstofftoleranz beider Stämme eine weitere mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse. Während sie für *P. gingivalis* ATCC 33277 sehr niedrig ist (Lamont und Jenkinson 1998, Hosogi und Duncan 2005), scheint sie im Falle von *P. gingivalis* M5-1-2 wesentlich höher zu sein. Methodenbedingt waren keine ausschließlich anaeroben Verhältnisse erzielbar. Somit musste im Verlauf der Versuche mit einem verstärkten Absterben von *P. gingivalis* ATCC 33277 gerechnet werden. Wahrscheinlichste Ursache für die ausgeprägtere Sauerstofftoleranz von *P. gingivalis* M5-1-2 ist dessen dicke Polysaccharidkapsel (Müller 2003). Diese ist für viele Stämme typisch und schützt das Bakterium gegen Milieuveränderungen (Slots 1998).

Für *P. gingivalis* ATCC 33277 fiel die Zahl intrazellulärer Bakterien nach vergleichsweise hohen 1 h-Werten nach 6 h leicht ab, um dann nach 18 h erneut anzusteigen. Für *P. gingivalis* M5-1-2 konnte übereinstimmend mit den Adhärenzwerte ein starker Anstieg intrazellulärer Bakterien während der 18-stündigen Versuchsdauer nachgewiesen werden. Auffallend war jedoch, dass bei der Adhärenz der enorme Anstieg von der 1 h- zur 6 h-Messung im Falle der Internalisierung auf den Zeitraum zwischen 6 h und 18 h verschoben war. Beide Bakterien invadierten bei Zusatz von künstlichem Speichel weniger als im planktonischen Milieu. Dieses Phänomen trifft für alle Bakterien (mit Ausnahme von *T. forsythia* ATCC 43037 in Einzelinfektion) zu, weshalb ein internalisierungshemmender Effekt von Biofilmen spekuliert wird. Die Bakterien benötigen im Biofilm zunächst mehr Zeit, an Epithelzellen zu adhären, so dass der Invasionsprozess erst zeitversetzt beginnt.

Voraussetzung für die Invasion in Epithelzellen ist die Adhärenz (Dorn et al. 2000). Die Gegenüberstellung beider Stämme verdeutlicht die Abhängigkeit der Invasion sowohl von der Adhärenz als auch von der Koloniemorphologie. Die Ergebnisse zeigen, dass *P. gingivalis* M5-1-2 anfänglich nur sehr langsam in KB-Zellen eindringt. Dies ist der Schleimkapsel zuzuschreiben (Dierickx et al. 2002, Müller 2003). Für wenig bekapselte Stämme (*P. gingivalis* ATCC 33277) ist hingegen, wie auch hier beobachtet, eine initial hohe Invasion typisch (Dierickx et al. 2002). Die für beide Bakterien nach 18 h ermittelten höchsten Werte dürften im Wesentlichen zwei Prozessen zuzuschreiben sein. Einerseits internalisieren in Abhängigkeit von der Versuchsdauer permanent weitere Bakterien. Andererseits ist eine intrazelluläre Vermehrung von *P. gingivalis* in KB-Zellen zu vermuten (Sandros et al. 1993, Madianos et al. 1996, Lamont und Jenkinson 1998, Houalet-Jeanne et al. 2001, Eick et al. 2006).

Für *T. forsythia* ATCC 43037 war mit zunehmender Versuchsdauer im Falle der Experimente mit Speichel ein stärkerer Anstieg der Zahl adhärenter Bakterien sowohl für die Einzel- als auch Doppelinfektion mit *F. nucleatum* ATCC 25586 zu beobachten gewesen als in den Versuchen ohne Speichel. Das unterstreicht für beide Infektionen die Aussagen von Donalan und Costerton (2002) bzw. Socransky und Haffajee (2002), die die erheblich pathogeneren Eigenschaften von Biofilmen der höheren Anzahl von Bakterien zuschrieben. Die von Inagaki et al. (2005) beschriebene größere Anzahl adhärenter *T. forsythia* in Mischinfektionen konnte für die Doppelinfektion mit *F. nucleatum* ATCC 25586 allerdings nicht bestätigt werden.

Die in beiden Versuchen zunächst signifikant geringeren Adhärenzwerte von *T. forsythia* ATCC 43037, verglichen mit *P. gingivalis* ATCC 33277 ($p < 0,05$) nach 1 h, zeugen von anfänglich schlechteren adhäsiven Fähigkeiten. Eine Ursache könnten Anpassungsvorgänge an die in Gegenwart von KB-Zellen veränderten Umwelteinflüsse sein. Vorstellbar ist außerdem eine mit der Versuchsdauer gesteigerte und von *F. nucleatum* ATCC 25586 beeinflusste Expression von Strukturen, die die Adhärenz an Epithelzellen vermitteln: BspA und S-Layer (Sabet et al. 2003, Inagaki et al. 2006). Die für *T. forsythia* ATCC 43037 ermittelten Ergebnisse stehen in Kontrast zu den Werten von Han et al. (2000). Während sie nach 1 h eine Adhäsionsquote von 1,9% an HGEC bestimmten, waren hier lediglich 0,2% zu beobachten. Diese Diskrepanz könnte auf die Verwendung unterschiedlicher Epithelzellkulturen zurückzuführen sein (HGEC vs. KB-Zellen).

Die Doppelinfektion mit *T. forsythia* ATCC 43037 und *P. gingivalis* ATCC 33277 zeigte anders als die oben beschriebenen Kombinationen ein progressives Absterben der beteiligten Bakterien mit zunehmender Versuchsdauer. Zu spekulieren ist eine metabolische Beeinflussung mit schnellerem Verbrauch der Nährlösung und beschleunigter Anreicherung von Stoffwechselprodukten. Ein derart veränderter Metabolismus dürfte für die Kombination von *T. forsythia* ATCC 43037 und *F. nucleatum* ATCC 25586 nicht zutreffen, da für sie eine Abnahme adhärenter Bakterien nicht nachweisbar war. Denkbar ist hier die Erschließung anderer Nährstoffquellen und die Etablierung und Aufrechterhaltung einer *T. forsythia* ATCC 43037 schützenden Atmosphäre durch *F. nucleatum* ATCC 25586, wie sie von Sharma et al. (2005) beschrieben wurde. Die Ergebnisse der Dreifachinfektion (*T. forsythia* ATCC 43037, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586) bekräftigen die Vermutung, dass die gemeinsame Inkubation von *T. forsythia* ATCC 43037 und *F. nucleatum* ATCC 25586 einen langzeitprotektiven Einfluss auf *T. forsythia* ATCC 43037 ausübt. Verglichen mit der Doppelinfektion von *T. forsythia* ATCC 43037 und *P. gingivalis* ATCC 33277 ist nach nahezu identischen 1 h- und 6 h-Werten der Abfall des 18 h-Messwertes hier nicht ganz so gravierend.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (Rudney et al. 2001, Rudney et al. 2005, Inagaki et al. 2006) war *T. forsythia* ATCC 43037 zur Internalisierung in Epithelzellen fähig. Das Ausmaß war jedoch unterschiedlich in den einzelnen Infektionskombinationen. In den gemeinsam mit *F. nucleatum* ATCC 25586 durchgeführten Infektionen internalisierte *T. forsythia* ATCC 43037 in Abhängigkeit von der Versuchsdauer mit steigender Zahl. *F. nucleatum* ATCC 25586 scheint daher neben der Adhärenz auch auf die Invasion von *T. forsythia* ATCC 43037

einen fördernden Effekt auszuüben (Sharma et al. 2005). Demgegenüber wurden für die Mischinfektion von *T. forsythia* ATCC 43037 und *P. gingivalis* ATCC 33277 fallende Werte nach 18 h ermittelt. Die von Han et al. (2000) beschriebene lediglich geringe Fähigkeit zur Invasion konnte nicht bestätigt werden. Nach Abgleich aller in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse erwies sich *T. forsythia* ATCC 43037 in dieser Eigenschaft nicht weniger invasiv als andere Bakterien.

A. actinomycetemcomitans Y4 adhärierte sehr schnell an KB-Zellen, so dass die 6 h-Werte im planktonischen Milieu schon fast den finalen 18 h-Werten entsprachen. Im „Biofilm“ hingegen nahm die Zahl adhärenter Bakterien über die Versuchsdauer hinweg kontinuierlich zu. Der 18 h-Wert lag dabei aber unter dem des planktonischen Versuches von ca. 140.000. Aus dem Vergleich dieser Werte ist ersichtlich, dass die Anlagerung von *A. actinomycetemcomitans* Y4 im „Biofilm“ einen längeren Zeitraum benötigt. Stämme mit Fimbrien adhäreren besser an Epithelzellen als Stämme ohne Fimbrien (Rosan et al. 1988). Da *A. actinomycetemcomitans* Y4 eine Morphologie ohne Fimbrien aufweist, wurde diesem Stamm ein schwaches Adhärenzverhalten zugeschrieben (Kachlany et al. 2000b). Allerdings war es im Rahmen der vorliegenden Studie nicht möglich die gewonnenen Ergebnisse zu vergleichen, da kein anderer Stamm (mit Fimbrien) zur Anwendung kam. Auffallend waren die Werte für die Internalisierung von *A. actinomycetemcomitans* Y4. Diese stellten in beiden Milieus nur einen Bruchteil der entsprechenden Adhärenzwerte dar. Glatte Kolonievarianten sind invasiver als diejenigen mit Fimbrien (Lepine et al. 1998). Dies zeigt speziell für *A. actinomycetemcomitans* im Gegensatz zu den Ergebnissen von Dorn et al. (2000) für *P. gingivalis*, dass die Invasion unabhängig von der Adhäsion rezeptorvermittelt abläuft (Henderson et al. 2003). Die geringe Zahl intrazellulärer Bakterien ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass *A. actinomycetemcomitans* nach Eintritt in eine Epithelzelle diese sofort wieder verlässt (Meyer et al. 1996, Meyer et al. 1999). *A. actinomycetemcomitans* Y4 bewirkt die Apoptose infizierter Epithelzellen, die allerdings erst nach 72 h eintritt (Kato et al. 2000). Dieser Prozess ist für die Initiation und Progression der lokalisierten aggressiven Parodontitis sehr wichtig.

6.3 Interleukine

Interleukine sind Botenstoffe, die wie im Kapitel 2.4.2 beschrieben für die Pathogenese der Parodontitis eine fundamentale Rolle spielen (Okada und Murakami 1998).

Nicht infizierte KB-Zellen wiesen unter „Biofilmverhältnissen“ eine tendenziell erhöhte basale IL-8-Sekretion im Vergleich zum planktonischen Milieu auf. Dies lässt vermuten, dass Epithelzellen schon bei bloßem Kontakt mit Speichel eine gesteigerte IL-8-Produktion aufweisen. Die Ergebnisse für die basale IL-6-Produktion zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchen mit und ohne Speichel. Das gibt Anlass zu der Vermutung, dass Speichel für die Freisetzung von IL-6 aus KB-Zellen eine nur untergeordnete Rolle spielt. Eine Erhöhung der IL-8-Konzentrationen in den Überständen der KB-Zellen konnte nach Einzelninfektion mit folgenden Bakterien nachgewiesen werden: *F. nucleatum* ATCC 25586 und *A. actinomycetemcomitans* Y4. Erhöhte IL-6-Spiegel konnten für *F. nucleatum* ATCC 25586 und *P. gingivalis* ATCC 33277 und zum Teil für *A. actinomycetemcomitans* Y4 gemessen werden.

F. nucleatum ATCC 25586 förderte die epitheliale IL-6- und IL-8-Sekretion mehr als alle anderen Einzelninfektionen. Nach bereits deutlich erhöhten 6 h-Werten wurden nach 18 h im „Biofilm“ um ein Drittel höhere IL-8-Konzentrationen als im planktonischen Milieu erzielt. Diese Werte deuten auf ein erheblich stärkeres entzündungsauslösendes Potential für *F. nucleatum* ATCC 25586 im „Biofilm“ hin. Ursache könnte eine für Biofilme typische veränderte bakterielle Genexpression (Donlan und Costerton 2002) sein, in deren Folge es zur vermehrten Bildung Interleukin-induktiver Strukturen kommt. Auch eine im Biofilm verstärkte Koaggregationsbereitschaft verbunden mit synergistischen Effekten im Sinne des „quorum sensing“ (Sanderink et al. 2004) könnten als Erklärung herangezogen werden.

Darveau et al. (1998) untersuchten gleichermaßen die durch *F. nucleatum* ATCC 25586 induzierte IL-8-Freisetzung aus KB-Zellen und primären Epithelzellkulturen (HGEC), jedoch in leicht abgewandelter Methodik. Für beide Zelltypen zeigten sie in Übereinstimmung mit unseren Werten nach 18-stündiger Inkubation im planktonischen Milieu eine beträchtliche IL-8-Sekretion. Han et al. (2000) ermittelten an HGEC für den Stamm *F. nucleatum* 12230 ein ähnlich gelagertes IL-8-induktives Potential. Auf molekularbiologischer Ebene untersuchten Huang et al. (2004) die Expression von IL-8-mRNA in Epithelzellen nach Infektion mit *F. nucleatum* 12230. Auch sie zeigten eine starke Fähigkeit zur Freisetzung von IL-8. Es konnten jedoch keine verlässlichen Angaben gefunden werden, welche Strukturen im Einzelnen für diese interleukininduktiven Eigenschaften verantwortlich sind.

P. gingivalis ATCC 33277, als Vertreter des roten Komplexes, spielt bei der Beeinflussung lokaler IL-8-Konzentrationen eine ambivalente Rolle. Einerseits gibt es Faktoren, die in isolierter Form eine vermehrte IL-8-Expression in Epithelzellen bewirken können (Bainbridge und Darveau 2001, Hajishengallis et al. 2002). Andererseits wird IL-8 durch Gingipaine (insbesondere Arg-Gingipaine) abgebaut (Wilson et al. 1996, Fletcher et al. 1997, Darveau et al. 1998, Huang et al. 1998b, Zhang et al. 1999, Huang et al. 2001). In der hier durchgeführten Studie war zwar ein Abbau von IL-8 zu verzeichnen, jedoch nicht vollständig wie er in den Studien von Deng et al. (2001) und Darveau et al. (1998) nach 8 h bzw. 18 h beschrieben wird. Es zeigten sich in beiden Versuchsansätzen nach 6 h und 18 h IL-8-Spiegel, die ca. 75% der jeweiligen Kontrollwerte entsprachen. Daten von Han et al. (2000) untermauern diese Ergebnisse. Sie konstatierten für ihren Stamm nach 4-stündiger Inkubation ebenfalls keinen vollständigen IL-8-Abbau. Mit der vorliegenden Arbeit konnte die These von Huang et al. (2001, 2004) bestätigt werden, wonach eine kontinuierliche Inkubation von Epithelzellen mit *P. gingivalis* Voraussetzung für eine IL-8-Abnahme ist. Sie postulierten für eine 4-stündige Inkubation von Epithelzellen mit *P. gingivalis* eine verminderte Expression von IL-8-mRNA, nach kurzfristiger Koinfektion (1 h) hingegen eine erhöhte Expression. Letzteres Ergebnis (1 h) korreliert ebenfalls mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. In dieser wurde in Analogie zu obigen Ergebnissen nach 1 h im planktonischen Milieu ein Wert ermittelt, der die IL-8-Ausschüttung der nicht infizierten KB-Zellen um ca. 30% übertraf.

Eine mögliche Erklärung für den unvollständigen Abbau von IL-8 ist die geringe Sauerstofftoleranz von *P. gingivalis* ATCC 33277 (Lamont und Jenkinson 1998, Hosogi und Duncan 2005). Methodenbedingt waren während der Versuche keine ausschließlich anaeroben Verhältnisse erzielbar. Daher musste im Verlauf der Versuche mit einem verstärkten Absterben der Bakterien gerechnet werden, weshalb kein vollständiger Abbau der untersuchten Zytokine erfolgt. Eine zweite Erklärung liefern die Ergebnisse von Eick et al. (2006). Sie fanden heraus, dass *P. gingivalis* ATCC 33277 nach Kontakt mit KB-Zellen die Expression von Arg-Gingipainen herunterreguliert. Für dieses Phänomen machten sie die in KB-Zellen internalisierten Bakterien verantwortlich. Die daraus resultierende geringere Konzentration proteolytisch aktiver Gingipaine erklärte ihrerseits den weniger starken Abbau von IL-8.

Für die Mischinfektion von *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586 wurden Werte ermittelt, die zwischen denen der Einzelinfektionen lagen. Die 18 h-Werte waren verglichen mit der Einzelinfektion von *F. nucleatum* ATCC 25586 ohne Speichel 40% und

mit Speichel 25% niedriger. Denselben Trend wiesen die Daten von Darveau et al. (1998) auf. Der geringere Prozentsatz (nur ca. 10%) könnte auf der niedrigeren Ausgangskonzentration von 10^6 *P. gingivalis* (im Vergleich zu den 10^8 der vorliegenden Studie) beruhen.

Huang et al. (2001) untersuchten die IL-8-mRNA-Expression zeitlich aufeinander folgender Mischinfektionen von *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* 12230 an HOK-18A (orale Keratinozyten-Zelllinie). Sie stellten dabei verglichen mit der Einzelinfektion von *F. nucleatum* 12230 niedrigere IL-8-mRNA-Werte fest. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Werte ermittelt, die auf posttranskriptionaler Ebene an diese Ergebnisse anknüpfen.

Insgesamt lagen die IL-8-Konzentrationen von *P. gingivalis* ATCC 33277 im „Biofilm“ deutlich über denen der planktonischen Experimente. Die Werte für die Doppelinfektion von *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* ATCC 25586 waren mit Speichel teilweise sogar doppelt so hoch. Dies lässt vermuten, dass im Biofilm der IL-8-induzierende Effekt von *F. nucleatum* das IL-8-abbauenden Potential von *P. gingivalis* ATCC 33277 übersteigt

Die IL-6-Konzentrationen im Falle der Einzelinfektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 überstiegen die Kontrollwerte der nicht infizierten KB-Zellkultur. Dieser Trend war zu allen untersuchten Zeitpunkten feststellbar. Dieselben IL-6-induktiven Fähigkeiten postulierten Loubakos et al. für gereinigte Arg-Gingipaine. Nach ihrer Erklärung wird dies über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) auf KB-Zellen vermittelt (Loubakos et al. 2001). Dagegen konstatierten ähnlich gelagerte Studien einen sofortigen Abbau von IL-6 durch Gingipaine (Fletcher et al. 1997, Banbula et al. 1999, Imamura 2003). Ebenso wiesen Eick et al. (2006) nach einstündiger Inkubation von KB-Zellen mit *P. gingivalis* ATCC 33277 im anschließenden dreitägigen Untersuchungszeitraum kein IL-6 in den KB-Zellüberständen nach.

Anders verhielt sich *P. gingivalis* M5-1-2. Für dieses Bakterium waren weder IL-6 noch IL-8 in den Überständen der KB-Zellen nachweisbar. Für diesen Stamm konnten die Aussagen von Deng et al. (2001) und Darveau et al. (1998) bestätigt werden. Gegenüber Sauerstoff scheint *P. gingivalis* M5-1-2 wesentlich unempfindlicher zu sein als der Referenzstamm ATCC 33277. Die permanent steigende Zahl adhärenter Bakterien während der 18 h (im Vergleich zu den fallenden Zahlen adhärenter *P. gingivalis* ATCC 33277) bestätigt diese Annahme. Ursache könnte die dicke schützende Kapsel des Stammes M5-1-2 sein (Slots 1998). Außerdem

könnte eine stärkere proteolytische Aktivität für den vollständigen Interleukinabbau verantwortlich sein, wodurch sich das Bakterium der lokalen Abwehr entzieht.

Für *T. forsythia* ATCC 43037, als weiteren Vertreter des „roten Komplexes“, waren in den Einzelinfektionsversuchen generell IL-6- und IL-8-Werte feststellbar, die leicht unter denen der nicht infizierten KB-Zellkultur lagen. Dies deutet auf einen Abbau der Interleukine durch bakterielle Proteasen, wie sie von Saito et al. (1997) beschrieben worden waren, hin. Damit scheint die Interleukin-abbauende Kinetik die Interleukin-induzierenden Effekte von LPS und BspA zu übertreffen (Hajishengallis et al. 2002). Bemerkenswerte Ergebnisse wurden für die Mischinfektionen von *T. forsythia* ATCC 43037 mit *F. nucleatum* ATCC 25586 erzielt. In beiden Versuchsansätzen (planktonisch, Biofilm) wurden die IL-8-Konzentrationen der nicht infizierten KB-Zellkultur nach 6 h und 18 h signifikant übertroffen ($p < 0,05$). Für IL-6 galt dies gleichermaßen nach 18 h. Im Biofilm zeichnete sich dabei das deutlichere Bild ab. Dieses synergistische Verhalten beider Bakterien könnte für eine akute Exazerbation parodontaler Erkrankungen mitverantwortlich sein. Unterstützt wird diese These durch Studien von Sharma et al. (2005). Sie konstatierten eine sehr ausgeprägte Koaggregations- und Biofilmbildungsbereitschaft zwischen *T. forsythia* und *F. nucleatum*.

Einerseits wäre eine durch Mischinfektion gesteigerte Expression von BspA oder einer anderen Interleukin-induzierenden Komponente möglich. Dies erklärte gemeinsam mit der durch *F. nucleatum* hervorgerufenen IL-6- bzw. IL-8-Sekretion die erhöhten Zytokinkonzentrationen. Sie widerspräche aber für BspA den Ergebnissen von Inagaki et al. (2005), die einen Abbau dieses Proteins nachgewiesen hatten. Andererseits ist eine Abnahme der proteolytischen Aktivität von *T. forsythia* im Sinne des „dormant stage“ verbunden mit einer synergistisch erhöhten Interleukin-induzierenden Fähigkeit von *F. nucleatum* denkbar. Da zu dieser Thematik in der Literatur derzeit keine verlässlichen Daten zu finden sind, sind die Ergebnisse gegenwärtig nicht zu vergleichen und unterliegen in ihrer Interpretation der Spekulation.

Beachtlich waren die Interleukin-Konzentrationen für die Doppelinfektion von *P. gingivalis* ATCC 33277 und *T. forsythia* ATCC 43037. IL-6 und IL-8 konnten verglichen mit der Kontrolle in nur sehr geringen Mengen nachgewiesen werden (IL-8: 18 h $p < 0,01$; IL-6: 18 h $p < 0,01$). Zwar lagen die Werte der Einzelinfektionen beider Bakterien leicht unter den Kontrollspiegeln, doch waren nach bloßer Addition dieser Zahlen die ermittelten Ergebnisse nicht unbedingt zu erwarten gewesen. Dieser synergistische Effekt könnte auf einer gegenseitigen

metabolischen Beeinflussung (Yoneda et al. 2005) oder einer verstärkten Expression Interleukin-abbauender Strukturen beruhen. Letztere Vermutung erhärtet sich durch Untersuchungen von Yoneda et al. (2005). Sie postulierten für die Etablierung von Abszessen im Mäusemodell ein gegenüber den Einzelinfektionen synergistisches Verhalten beider Bakterien in Doppelinfektion. Beim Einsatz von *P. gingivalis* ATCC 33277-Mutanten mit fehlender Gingipain-Aktivität zeigte sich ein bedeutend geringeres Ausmaß der Abszedierung (Yoneda et al. 2001). Diese extreme Potenzierung der proteolytischen Aktivität bei Kombination der Bakterien des roten Komplexes könnte auch für die in der vorliegenden Studie ermittelten niedrigen Interleukinkonzentrationen mitverantwortlich sein.

Ähnlich müssen die Ergebnisse der Dreifachinfektion von *P. gingivalis* ATCC 33277, *T. forsythia* ATCC 43037 und *F. nucleatum* ATCC 25586 interpretiert werden. Auch hier scheint der Interleukin-destruktive synergistische Effekt von *P. gingivalis* ATCC 33277 und *T. forsythia* ATCC 43037 dem induzierenden Effekt von *F. nucleatum* ATCC 25586 weitaus überlegen zu sein. Besonders deutlich ist dies im „Biofilmexperiment“. Das deutet darauf hin, dass der Biofilm für diese Bakterienkonstellation eine besonders wichtige Rolle spielt und die pathogenen Eigenschaften nochmals potenziert.

Die Versuche mit *T. denticola* ATCC 35405, dem dritten Vertreter des „roten Komplex“, ergaben für beide Interleukine zu allen Zeitpunkten sehr geringe Konzentrationen in den Überständen der KB-Zellen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Bakterien wiesen die Daten zwischen den planktonischen Versuchen und dem „Biofilm“ keine grundlegenden Unterschiede auf. Dies lässt vermuten, dass der Einfluss des Biofilms auf die Interleukin-abbauende Kinetik von *T. denticola* ATCC 35405 nur gering einzuschätzen ist. Unterstützende Literaturangaben hierzu konnten nicht gefunden werden. Die äußerst niedrigen Ergebnisse könnten einerseits auf der mangelnden Fähigkeit zur Induktion von Interleukinen beruhen, andererseits auf einen verstärkten Abbau durch bakterienzelluläre Proteasen (Dentilysin) hindeuten. Letztere Mutmaßung wird durch Versuche von Deng et al. (2001) bekräftigt. Sie wiesen einen starken proteolytischen Abbau von IL-8 in den Überständen von KB-Zellen nach. Auch Asai et al. (2003) detektierten nach Infektion von HGEC mit *T. denticola* keine IL-8 nach 6 h und 12 h, obwohl sie in PCR-Untersuchungen eine durch *T. denticola* hervorgerufene Expression von IL-8-mRNA in Epithelzellen nachgewiesen hatten. Als einzige Literaturstelle deuteten Versuchen mit mononukleären Blutzellen auf den proteolytischen Abbau von IL-6 hin (Miyamoto et al. 2006). In Versuchen mit Fibroblasten (Nixon et al. 2000) induziert *T. denti-*

cola sowohl IL-6 als auch IL-8. In einem kombinierten Makrophagen/Epithelzell-Modell konnte die Freisetzung von IL-8 nachgewiesen werden (Bodet et al. 2006). *T. denticola* ATCC 35405 verfügt über die wahrscheinlich stärkste Fähigkeit aller in dieser Studie untersuchten Bakterien zum Abbau von IL-8.

Die in beiden Versuchsansätzen verglichen mit den Kontrollen signifikant geringeren IL-8-Signale in den Überständen der Vierfachinfektion (*T. forsythia* ATCC 43037, *T. denticola* ATCC 35405, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *F. nucleatum* 25586) waren nach Analyse der Einzelinfektionen nicht unbedingt zu erwarten gewesen. Sie erscheinen jedoch im Kontext der synergistischen Effekte von *P. gingivalis* ATCC 33277 und *T. forsythia* ATCC 43037 und der starken IL-8-destruktiven Eigenschaften von *T. denticola* ATCC 35405 nicht verwunderlich. Die Koaggregation mit *P. gingivalis* (Onagawa et al. 1994) und *F. nucleatum* (Kolenbrander et al. 1995) geht mit der Exazerbation parodontaler Erkrankungen einher. Weitere analoge Literaturergebnisse zu dieser erstmalig durchgeführten Mischinfektion konnten nicht gefunden werden. Lediglich die Arbeitsgruppe um Deng (2001) wies für die Doppelinfektion von *T. denticola* und *F. nucleatum* eine Reduktion von IL-8 nach.

Um den Überblick über die wichtigsten parodontopathogener Bakterien zu vervollständigen, wurde auch der Einfluss von *A. actinomycetemcomitans* Y4 auf Interleukine untersucht. Hierbei wurden IL-6- und IL-8-Konzentrationen gemessen, die tendenziell leicht über den Kontrollwerten der nicht infizierten KB-Kultur lagen. Insgesamt ist nur wenig über die Freisetzungsmechanismen proinflammatorischer Zytokine aus Epithelzellen durch *A. actinomycetemcomitans* bekannt. Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie ermittelten Huang et al. (1998, 2001) in einem leicht differenten Versuchsaufbau gleichfalls einen Anstieg der IL-8-Konzentrationen in verschiedenen Epithelzellen. Während eines 30-stündigen Beobachtungszeitraumes, welcher sich an eine 2-stündige Inkubation mit *A. actinomycetemcomitans* anschloss, wurde das Maximum nach 6h erreicht. Das Ausmaß der IL-8-Induktion schien dabei unabhängig vom Grad der Invasion zu sein. Auch Sfakianakis et al. (2001) postulierten die Freisetzung von IL-8 durch Extrakte dieses Bakteriums. Uchida et al. (2001) wiesen demgegenüber in Epithelzellen eine erhöhte Expression von IL-8-mRNA, nicht aber von IL-6-mRNA nach. Für die leicht gesteigerte Expression von IL-6 ist möglicherweise das Oberflächenmolekül Omp100 verantwortlich (Asakawa et al. 2003). In anderen Studien konnten IL-6-induktive Fähigkeiten gegenüber Fibroblasten nachgewiesen werden (Huang et al. 2001, Uchida et al. 2001). Durch die Hochregulation von IL-8 trägt *A. actinomycetemcomitans* zur

initialen Rekrutierung von PNM in entzündete Gewebe bei (Huang et al. 1998a, Huang et al. 1998b).

7 Schlussfolgerungen

Parodontopathogene Bakterien internalisieren im planktonischen Milieu deutlich stärker als im „Biofilm“. Dies zeigt einen invasionsinhibierenden Effekt von Biofilmen.

Nicht infizierte KB-Zellen bilden unter Zusatz von künstlichem Speichel (Biofilm) mehr IL-8. Speichelbestandteile fördern somit die Freisetzung von IL-8 aus KB-Zellen. Für die Freisetzung von IL-6 spielt der Speichel keine Rolle.

Mischinfektionen unter Beteiligung von Bakterien des „Roten Komplexes“ verändern massiv die Freisetzung von Interleukinen. Proteasen von *T. denticola* ATCC 35405 und *P. gingivalis* M5-1-2 können IL-8 vollständig abbauen.

Verglichen mit dem Laborstamm – *P. gingivalis* ATCC 33277 – besitzt das klinische Isolat *P. gingivalis* M5-1-2 das stärkere Virulenzpotential (stärkere Invasion, deutlicherer proteolytischer IL-8-Abbau).

F. nucleatum ATCC 25586 hat weder im planktonischen Milieu noch im „Biofilm“ signifikanten Einfluss auf die Adhärenz der anderen Bakterien an KB-Zellen.

Mit der Methodik dieser Studie können Adhärenz, Internalisierung und Beeinflussung von Interleukinen durch Bakterienmischinfektionen untersucht werden.

Alle Ergebnisse zeigen deutlich die immunmodulatorische Wirkung des Speichels und dessen Einfluss auf die Interaktion von Bakterien und Wirtszellen.

Ein komplexer Biofilm wie an festen Oberflächen bildet sich nicht. Trotzdem zeigen die Experimente, dass bisher für Einzelinfektionen im planktonischen Milieu ermittelten Werte nicht einfach auf biofilmassoziierte Mischkulturen übertragbar sind.

Literaturverzeichnis

- Abe N, Kadowaki T, Okamoto K, Nakayama K, Ohishi M, Yamamoto K. 1998. Biochemical and functional properties of lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *J Biochem (Tokyo)*, 123 (2):305-312.
- Agnani G, Tricot-Doleux S, Du L, Bonnaure-Mallet M. 2000. Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to gingival epithelial cells: modulation of bacterial protein expression. *Oral Microbiol Immunol*, 15 (1):48-52.
- Amano A. 2003. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, 74 (1):90-96.
- Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. 2004. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res*, 39 (2):136-142.
- Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. 1999. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol*, 37 (5):1426-1430.
- Amano A, Sharma A, Lee JY, Sojar HT, Raj PA, Genco RJ. 1996. Structural domains of *Porphyromonas gingivalis* recombinant fimbriin that mediate binding to salivary proline-rich protein and statherin. *Infect Immun*, 64 (5):1631-1637.
- Amano A, Shizukuishi S, Horie H, Kimura S, Morisaki I, Hamada S. 1998. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to proline-rich glycoproteins in parotid saliva via a domain shared by major salivary components. *Infect Immun*, 66 (5):2072-2077.
- Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. 2000. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* and periodontal health status. *J Dent Res*, 79 (9):1664-1668.
- Amano A, Kuboniwa M, Kataoka K, Tazaki K, Inoshita E, Nagata H, Tamagawa H, Shizukuishi S. 1995. Binding of hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 134 (1):63-67.
- Amin M, Ho AC, Lin JY, Batista da Silva AP, Glogauer M, Ellen RP. 2004. Induction of de novo subcortical actin filament assembly by *Treponema denticola* major outer sheath protein. *Infect Immun*, 72 (6):3650-3654.
- Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. 2004. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 72 (8):4689-4698.
- Argueta JG, Shiota S, Yamaguchi N, Masuhiro Y, Hanazawa S. 2006. Induction of *Porphyromonas gingivalis* GroEL signaling via binding to Toll-like receptors 2 and 4. *Oral Microbiol Immunol*, 21 (4):245-251.
- Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4 (1):1-6.
- Asai Y, Jinno T, Ogawa T. 2003. Oral treponemes and their outer membrane extracts activate human gingival epithelial cells through toll-like receptor 2. *Infect Immun*, 71 (2):717-725.
- Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Goncalves RB, Izumi S, Fujiwara T, Nakano Y, Suzuki N, Uchida Y, Ouhara K, Shiba H, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M. 2003. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycescomitans*. *Mol Microbiol*, 50 (4):1125-1139.
- Asano H, Ishihara K, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. 2003. Relationship between transmission of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* type in spouses. *J Periodontol*, 74 (9):1355-1360.

- Asikainen S, Chen C, Alaluusua S, Slots J. 1997. Can one acquire periodontal bacteria and periodontitis from a family member? *J Am Dent Assoc*, 128 (9):1263-1271.
- Bainbridge BW, Darveau RP. 2001. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand*, 59 (3):131-138.
- Banbula A, Bugno M, Kuster A, Heinrich PC, Travis J, Potempa J. 1999. Rapid and efficient inactivation of IL-6 gingipains, lysine- and arginine-specific proteinases from Porphyromonas gingivalis. *Biochem Biophys Res Commun*, 261 (3):598-602.
- Barton BE. 1997. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol*, 85 (1):16-20.
- Bauer C, Schoonbroodt D, Wagner C, Horsmans Y. 2000. Liver abscesses due to Fusobacterium species. *Liver*, 20 (3):267-268.
- Baumgartner JC, Falkler WA, Jr., Beckerman T. 1992. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol*, 7 (4):253-256.
- Belton CM, Izutsu KT, Goodwin PC, Park Y, Lamont RJ. 1999. Fluorescence image analysis of the association between Porphyromonas gingivalis and gingival epithelial cells. *Cell Microbiol*, 1 (3):215-223.
- Bodet C, Chandad F, Grenier D. 2006. Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia. *Microbes Infect*, 8 (1):27-35.
- Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. 1996. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of Fusobacterium nucleatum. *Clin Microbiol Rev*, 9 (1):55-71.
- Brissette CA, Simonson LG, Lukehart SA. 2004. Resistance to human beta-defensins is common among oral treponemes. *Oral Microbiol Immunol*, 19 (6):403-407.
- Bultink IE, Dorigo-Zetsma JW, Koopman MG, Kuijper EJ. 1999. Fusobacterium nucleatum septicemia and portal vein thrombosis. *Clin Infect Dis*, 28 (6):1325-1326.
- Burgess NA, Kirke DF, Williams P, Winzer K, Hardie KR, Meyers NL, Aduse-Opoku J, Curtis MA, Camara M. 2002. LuxS-dependent quorum sensing in Porphyromonas gingivalis modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiology*, 148 (Pt 3):763-772.
- Busscher HJ, Bos R, van der Mei HC. 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett*, 128 (3):229-234.
- Chan EC, Siboo R, Touyz LZ, Qui YS, Klitorinos A. 1993. A successful method for quantifying viable oral anaerobic spirochetes. *Oral Microbiol Immunol*, 8 (2):80-83.
- Chen CC, Chang KL, Huang JF, Huang JS, Tsai CC. 1997. Correlation of interleukin-1 beta, interleukin-6, and periodontitis. *Kaohsiung J Med Sci*, 13 (10):609-617.
- Chen T, Duncan MJ. 2004. Gingipain adhesin domains mediate Porphyromonas gingivalis adherence to epithelial cells. *Microb Pathog*, 36 (4):205-209.
- Chen T, Nakayama K, Belliveau L, Duncan MJ. 2001. Porphyromonas gingivalis gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infect Immun*, 69 (5):3048-3056.
- Chi B, Qi M, Kuramitsu HK. 2003. Role of dentilisin in Treponema denticola epithelial cell layer penetration. *Res Microbiol*, 154 (9):637-643.
- Chiang CY, Fu E, Shen EC. 2002. The role of interleukin-1beta in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced bone resorption. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*, 65 (5):225-230.
- Christensen BB, Sternberg C, Andersen JB, Eberl L, Moller S, Givskov M, Molin S. 1998. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl Environ Microbiol*, 64 (6):2247-2255.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49:711-745.

- Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ. 1998. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 66 (4):1660-1665.
- Dashper SG, Cross KJ, Slakeski N, Lissel P, Aulakh P, Moore C, Reynolds EC. 2004. Hemoglobin hydrolysis and heme acquisition by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 19 (1):50-56.
- De Filippo AB, Ellen RP, McCulloch CA. 1995. Induction of cytoskeletal rearrangements and loss of volume regulation in epithelial cells by *Treponema denticola*. *Arch Oral Biol*, 40 (3):199-207.
- DeCarlo AA, Grenett HE, Harber GJ, Windsor LJ, Bodden MK, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. 1998. Induction of matrix metalloproteinases and a collagen-degrading phenotype in fibroblasts and epithelial cells by secreted *Porphyromonas gingivalis* proteinase. *J Periodontal Res*, 33 (7):408-420.
- Deng QD, Han Y, Xia X, Kuramitsu HK. 2001. Effects of the oral spirochete *Treponema denticola* on interleukin-8 expression from epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol*, 16 (3):185-187.
- Dierickx K, Pauwels M, Van Eldere J, Cassiman JJ, Van Steenberghe D, Quirynen M. 2002. Viability of cultured periodontal pocket epithelium cells and *Porphyromonas gingivalis* association. *J Clin Periodontol*, 29 (11):987-996.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8 (9):881-890.
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15 (2):167-193.
- Dorn BR, Dunn WA, Jr., Progulske-Fox A. 1999. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun*, 67 (11):5792-5798.
- Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. 2000. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 187 (2):139-144.
- Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. 1993. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun*, 61 (5):2260-2265.
- Dzink JL, Sheenan MT, Socransky SS. 1990. Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., nom. rev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 40 (1):74-78.
- Eick S, Rödel J, Einax JW, Pfister W. 2002. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiol Immunol*, 17 (4):201-208.
- Eick S, Reissmann A, Rödel J, Schmidt KH, Pfister W. 2006. *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol Immunol*, 21 (4):231-237.
- Ellen RP, Galimanas VB. 2005. Spirochetes at the forefront of periodontal infections. *Periodontol 2000*, 38:13-32.
- Elwell CA, Dreyfus LA. 2000. DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol Microbiol*, 37 (4):952-963.
- Ezzo PJ, Cutler CW. 2003. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000*, 32:24-35.
- Fenno JC, Lee SY, Bayer CH, Ning Y. 2001. The *opdB* locus encodes the trypsin-like peptidase activity of *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 69 (10):6193-6200.
- Fenno JC, Hannam PM, Leung WK, Tamura M, Uitto VJ, McBride BC. 1998. Cytopathic effects of the major surface protein and the chymotrypsinlike protease of *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 66 (5):1869-1877.

- Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. 2006. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. *Periodontol* 2000, 42:114-157.
- Fitzgerald JE, Kreutzer DL. 1995. Localization of interleukin-8 in human gingival tissues. *Oral Microbiol Immunol*, 10 (5):297-303.
- Flemming HC, Wingender J. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol*, 43 (6):1-8.
- Fletcher J, Reddi K, Poole S, Nair S, Henderson B, Tabona P, Wilson M. 1997. Interactions between periodontopathogenic bacteria and cytokines. *J Periodontal Res*, 32 (1 Pt 2):200-205.
- Fong KP, Chung WO, Lamont RJ, Demuth DR. 2001. Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. *Infect Immun*, 69 (12):7625-7634.
- Frias J, Olle E, Alsina M. 2001. Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. *Infect Immun*, 69 (5):3431-3434.
- Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M. 2005. *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*. 2. Auflage Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Genco CA, Van Dyke T, Amar S. 1998. Animal models for *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Trends Microbiol*, 6 (11):444-449.
- Genco CA, Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J. 1999. Role of gingipains R in the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Clin Infect Dis*, 28 (3):456-465.
- Genco R, Offenbacher S, Beck J. 2002. Periodontal disease and cardiovascular disease: epidemiology and possible mechanisms. *J Am Dent Assoc*, 133 Suppl:14S-22S.
- Genco RJ. 1996. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*, 67 (10 Suppl):1041-1049.
- Gilbert P, Das J, Foley I. 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*, 11 (1):160-167.
- Greenstein G, Lamster I. 1997. Bacterial transmission in periodontal diseases: a critical review. *J Periodontol*, 68 (5):421-431.
- Gregory RL, Kim DE, Kindle JC, Hobbs LC, Lloyd DR. 1992. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. *J Periodontal Res*, 27 (3):176-183.
- Grenier D. 1996. Degradation of host protease inhibitors and activation of plasminogen by proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Microbiology*, 142 (Pt 4):955-961.
- Grenier D, Mayrand D. 2001. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 203 (2):161-164.
- Grenier D, Uitto VJ, McBride BC. 1990. Cellular location of a *Treponema denticola* chymotrypsinlike protease and importance of the protease in migration through the basement membrane. *Infect Immun*, 58 (2):347-351.
- Grossi SG. 2001. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol*, 6 (1):138-145.
- Hajishengallis G, Martin M, Sojar HT, Sharma A, Schifferle RE, DeNardin E, Russell MW, Genco RJ. 2002. Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9 (2):403-411.
- Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H, Genco RJ. 2000. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect Immun*, 68 (6):3140-3146.

- Han YW, Ikegami A, Rajanna C, Kawsar HI, Zhou Y, Li M, Sojar HT, Genco RJ, Kuramitsu HK, Deng CX. 2005. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *J Bacteriol*, 187 (15):5330-5340.
- Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, Ishikura H, Golenbock DT, Sugaya T, Tsuchida N, Kawanami M, Hara Y, Shibata K. 2004. Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infect Immun*, 72 (3):1318-1325.
- Hashimoto M, Ogawa S, Asai Y, Takai Y, Ogawa T. 2003. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to *Treponema denticola* dentilisin. *FEMS Microbiol Lett*, 226 (2):267-271.
- Hausner M, Wuertz S. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol*, 65 (8):3710-3713.
- Henderson B, Poole S, Wilson M. 1996. Microbial/host interactions in health and disease: who controls the cytokine network? *Immunopharmacology*, 35 (1):1-21.
- Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. 2003. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol*, 57:29-55.
- Higuchi N, Murakami Y, Moriguchi K, Ohno N, Nakamura H, Yoshimura F. 2000. Localization of major, high molecular weight proteins in *Bacteroides forsythus*. *Microbiol Immunol*, 44 (9):777-780.
- Hinode D, Nagata A, Ichimiya S, Hayashi H, Morioka M, Nakamura R. 1992. Generation of plasma kinin by three types of protease isolated from *Porphyromonas gingivalis* 381. *Arch Oral Biol*, 37 (10):859-861.
- Hintermann E, Haake SK, Christen U, Sharabi A, Quaranta V. 2002. Discrete proteolysis of focal contact and adherens junction components in *Porphyromonas gingivalis*-infected oral keratinocytes: a strategy for cell adhesion and migration disabling. *Infect Immun*, 70 (10):5846-5856.
- Holt SC, Ebersole JL. 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*, 38:72-122.
- Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*, 20:168-238.
- Holtta P, Alaluusua S, Saarela M, Asikainen S. 1994. Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scand J Dent Res*, 102 (2):113-119.
- Hosogi Y, Duncan MJ. 2005. Gene expression in *Porphyromonas gingivalis* after contact with human epithelial cells. *Infect Immun*, 73 (4):2327-2335.
- Houalet-Jeanne S, Pellen-Mussi P, Tricot-Doleux S, Apiou J, Bonnaure-Mallet M. 2001. Assessment of internalization and viability of *Porphyromonas gingivalis* in KB epithelial cells by confocal microscopy. *Infect Immun*, 69 (11):7146-7151.
- Hoyle BD, Costerton JW. 1991. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res*, 37:91-105.
- Huang GT, Haake SK, Park NH. 1998a. Gingival epithelial cells increase interleukin-8 secretion in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* challenge. *J Periodontol*, 69 (10):1105-1110.
- Huang GT, Haake SK, Kim JW, Park NH. 1998b. Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection. *Oral Microbiol Immunol*, 13 (5):301-309.

- Huang GT, Zhang HB, Dang HN, Haake SK. 2004. Differential regulation of cytokine genes in gingival epithelial cells challenged by *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog*, 37 (6):303-312.
- Huang GT, Kim D, Lee JK, Kuramitsu HK, Haake SK. 2001. Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms. *Infect Immun*, 69 (3):1364-1372.
- Hughes CV, Malki G, Loo CY, Tanner AC, Ganeshkumar N. 2003. Cloning and expression of alpha-D-glucosidase and N-acetyl-beta-glucosaminidase from the periodontal pathogen, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*). *Oral Microbiol Immunol*, 18 (5):309-312.
- Ikegami A, Honma K, Sharma A, Kuramitsu HK. 2004. Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 72 (8):4619-4627.
- Imamura T. 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, 74 (1):111-118.
- Imamura T, Potempa J, Tanase S, Travis J. 1997. Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 272 (25):16062-16067.
- Imamura T, Tanase S, Hamamoto T, Potempa J, Travis J. 2001. Activation of blood coagulation factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem J*, 353 (Pt 2):325-331.
- Inagaki S, Kuramitsu HK, Sharma A. 2005. Contact-dependent regulation of a *Tannerella forsythia* virulence factor, BspA, in biofilms. *FEMS Microbiol Lett*, 249 (2):291-296.
- Inagaki S, Onishi S, Kuramitsu HK, Sharma A. 2006. *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "*Tannerella forsythia*". *Infect Immun*, 74 (9):5023-5028.
- Inoue T, Tanimoto I, Ohta H, Kato K, Murayama Y, Fukui K. 1998. Molecular characterization of low-molecular-weight component protein, Flp, in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Microbiol Immunol*, 42 (4):253-258.
- Irwin CR, Myrillas TT. 1998. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis*, 4 (1):43-47.
- Ishihara K, Okuda K. 1999. Molecular pathogenesis of the cell surface proteins and lipids from *Treponema denticola*. *FEMS Microbiol Lett*, 181 (2):199-204.
- Ishihara K, Miura T, Kuramitsu HK, Okuda K. 1996. Characterization of the *Treponema denticola* prtP gene encoding a prolyl-phenylalanine-specific protease (dentilisin). *Infect Immun*, 64 (12):5178-5186.
- Ishikura H, Arakawa S, Nakajima T, Tsuchida N, Ishikawa I. 2003. Cloning of the *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) siaHI gene and purification of the sialidase enzyme. *J Med Microbiol*, 52 (Pt 12):1101-1107.
- Isogai H, Isogai E, Yoshimura F, Suzuki T, Kagota W, Takano K. 1988. Specific inhibition of adherence of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae. *Arch Oral Biol*, 33 (7):479-485.
- Izutsu KT, Belton CM, Chan A, Fatherazi S, Kanter JP, Park Y, Lamont RJ. 1996. Involvement of calcium in interactions between gingival epithelial cells and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 144 (2-3):145-150.
- Jeong SJ, Yee ST, Jo WS, Yu SH, Lee SH, Lim YJ, Yoo YH, Kim JM, Lee JD, Jeong MH. 2000. A novel factor isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates mouse B cells and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*, 68 (9):5132-5138.
- Kachlany SC, Fine DH, Figurski DH. 2000a. Secretion of RTX leukotoxin by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 68 (11):6094-6100.

- Kachlany SC, Planet PJ, Desalle R, Fine DH, Figurski DH, Kaplan JB. 2001. flp-1, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol*, 40 (3):542-554.
- Kachlany SC, Planet PJ, Bhattacharjee MK, Kollia E, DeSalle R, Fine DH, Figurski DH. 2000b. Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in bacteria and archaea. *J Bacteriol*, 182 (21):6169-6176.
- Kadowaki T, Nakayama K, Okamoto K, Abe N, Baba A, Shi Y, Ratnayake DB, Yamamoto K. 2000. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *J Biochem (Tokyo)*, 128 (2):153-159.
- Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, Reznik G, Los T, Lykidis A, Bhattacharyya A, Bartman A, Gardner W, Grechkin G, Zhu L, Vasieva O, Chu L, Kogan Y, Chaga O, Goltsman E, Bernal A, Larsen N, D'Souza M, Walunas T, Pusch G, Haselkorn R, Fonstein M, Kyrpides N, Overbeek R. 2002. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol*, 184 (7):2005-2018.
- Kaplan JB, Perry MB, MacLean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. 2001. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun*, 69 (9):5375-5384.
- Kato S, Nakashima K, Inoue M, Tomioka J, Nonaka K, Nishihara T, Kowashi Y. 2000. Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *J Med Microbiol*, 49 (8):739-745.
- Katz J, Yang QB, Zhang P, Potempa J, Travis J, Michalek SM, Balkovetz DF. 2002. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Infect Immun*, 70 (5):2512-2518.
- Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. 2003. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol*, 41 (2):558-563.
- Kharazmi A. 1991. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol Lett*, 30 (2):201-205.
- Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. 1995. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodontal Res*, 30 (5):332-341.
- Kinane DF. 2001. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 25:8-20.
- Kitamura Y, Matono S, Aida Y, Hirofuji T, Maeda K. 2002. Gingipains in the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis* cleave CD4 and CD8 on human T cells. *J Periodontal Res*, 37 (6):464-468.
- Kleivdal H, Benz R, Jensen HB. 1995. The *Fusobacterium nucleatum* major outer-membrane protein (FomA) forms trimeric, water-filled channels in lipid bilayer membranes. *Eur J Biochem*, 233 (1):310-316.
- Kolenbrander PE. 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol*, 54:413-437.
- Kolenbrander PE, London J. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol*, 175 (11):3247-3252.
- Kolenbrander PE, Parrish KD, Andersen RN, Greenberg EP. 1995. Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infect Immun*, 63 (12):4584-4588.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66 (3):486-505, table of contents.

- Kolodrubetz D, Spitznagel J, Jr., Wang B, Phillips LH, Jacobs C, Kraig E. 1996. cis Elements and trans factors are both important in strain-specific regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 64 (9):3451-3460.
- Komatsuzawa H, Asakawa R, Kawai T, Ochiai K, Fujiwara T, Taubman MA, Ohara M, Kurihara H, Sugai M. 2002. Identification of six major outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene*, 288 (1-2):195-201.
- Korostoff J, Wang JF, Kieba I, Miller M, Shenker BJ, Lally ET. 1998. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect Immun*, 66 (9):4474-4483.
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. 2000. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun*, 68 (5):2907-2915.
- Kroes I, Lepp PW, Relman DA. 1999. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (25):14547-14552.
- Kumagai Y, Yagishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K. 2005. Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 73 (5):2655-2664.
- Kuramitsu HK, Chen W, Ikegami A. 2005. Biofilm formation by the periodontopathic bacteria *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*, 76 (11 Suppl):2047-2051.
- Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Fukushima K. 2000. Butyric-acid-induced apoptosis in murine thymocytes and splenic T- and B-cells occurs in the absence of p53. *J Dent Res*, 79 (12):1948-1954.
- Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, Nozaki T, Ozawa Y, Nakahira Y, Saho T, Ogo H, Shimabukuro Y, Okada H, Murakami S. 2004. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *J Periodontol*, 75 (3):370-379.
- Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. 1999. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol*, 7 (9):356-361.
- Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green CL, Rosenbloom J, Korostoff J, Wang JF, Shenker BJ, Ortlepp S, Robinson MK, Billings PC. 1997. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem*, 272 (48):30463-30469.
- Lamont RJ, Jenkinson HF. 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62 (4):1244-1263.
- Lamont RJ, Jenkinson HF. 2000. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 15 (6):341-349.
- Lamont RJ, Yilmaz O. 2002. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol 2000*, 30:61-69.
- Lamont RJ, Oda D, Persson RE, Persson GR. 1992. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol*, 7 (6):364-367.
- Lamont RJ, Bevan CA, Gil S, Persson RE, Rosan B. 1993. Involvement of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in adherence to *Streptococcus gordonii*. *Oral Microbiol Immunol*, 8 (5):272-276.
- Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 63 (10):3878-3885.
- Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, Page RC, Papanou P, Tonetti M, Van Dyke T. 1999. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *Ann Periodontol*, 4 (1):53.

- Lara-Tejero M, Galan JE. 2000. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science*, 290 (5490):354-357.
- Lee W, Pankoski L, Zekavat A, Shenker BJ. 2004. *Treponema denticola* immunoinhibitory protein induces irreversible G1 arrest in activated human lymphocytes. *Oral Microbiol Immunol*, 19 (3):144-149.
- Lepine G, Caudry S, DiRienzo JM, Ellen RP. 1998. Epithelial cell invasion by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains from restriction fragment-length polymorphism groups associated with juvenile periodontitis or carrier status. *Oral Microbiol Immunol*, 13 (6):341-347.
- Li M, Liu Z, Umemoto T. 1999. [Collagen-binding proteins of human oral spirochetes]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 34 (3):165-167.
- Licht TR, Christensen BB, Krogfelt KA, Molin S. 1999. Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology*, 145 (Pt 9):2615-2622.
- Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. 2000. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J Bacteriol*, 182 (5):1374-1382.
- Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, Carson DA. 1988. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med*, 167 (3):1253-1258.
- Lourbakos A, Potempa J, Travis J, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Santulli R, Mackie EJ, Pike RN. 2001. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun*, 69 (8):5121-5130.
- Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. 1997. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infect Immun*, 65 (10):3983-3990.
- Madianos PN, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G, Sandros J. 1996. *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. *Infect Immun*, 64 (2):660-664.
- Makinen PL, Makinen KK, Syed SA. 1995. Role of the chymotrypsin-like membrane-associated proteinase from *Treponema denticola* ATCC 35405 in inactivation of bioactive peptides. *Infect Immun*, 63 (9):3567-3575.
- Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. 1996. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun*, 64 (8):2988-2997.
- Meyer DH, Rose JE, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. 1999. Microtubules are associated with intracellular movement and spread of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 67 (12):6518-6525.
- Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J, Potempa J. 1998. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS Lett*, 440 (3):282-286.
- Miller MB, Bassler BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55:165-199.
- Mintz KP. 2004. Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. *Microbiology*, 150 (Pt 8):2677-2688.
- Miyamoto M, Ishihara K, Okuda K. 2006. The *Treponema denticola* surface protease dentilisin degrades interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*, 74 (4):2462-2467.
- Moller S, Sternberg C, Andersen JB, Christensen BB, Ramos JL, Givskov M, Molin S. 1998. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl Environ Microbiol*, 64 (2):721-732.

- Moore WE, Moore LV. 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000, 5:66-77.
- Müller A. 2003. Invasion und Überleben von *Porphyromonas gingivalis* in KB-Zellen und Freisetzung proinflammatorischer Interleukine [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Munemasa T, Takemoto T, Dahlen G, Hino T, Shiba H, Ogawa T, Kurihara H. 2000. Adherence of *Bacteroides forsythus* to host cells. *Microbios*, 101 (399):115-126.
- Murakami Y, Iwahashi H, Yasuda H, Umemoto T, Namikawa I, Kitano S, Hanazawa S. 1996. *Porphyromonas gingivalis* fimbriin is one of the fibronectin-binding proteins. *Infect Immun*, 64 (7):2571-2576.
- Nagata H, Amano A, Ojima M, Tanaka M, Kataoka K, Shizukuishi S. 1994. Effect of binding of fibrinogen to each bacterium on coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis*. *Oral Microbiol Immunol*, 9 (6):359-363.
- Naito Y, Gibbons RJ. 1988. Attachment of *Bacteroides gingivalis* to collagenous substrata. *J Dent Res*, 67 (8):1075-1080.
- Nakagawa I, Amano A, Kimura RK, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. 2000. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene. *J Clin Microbiol*, 38 (5):1909-1914.
- Nakagawa I, Amano A, Kuboniwa M, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. 2002. Functional differences among *FimA* variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infect Immun*, 70 (1):277-285.
- Nakhjiri SF, Park Y, Yilmaz O, Chung WO, Watanabe K, El-Sabaeny A, Park K, Lamont RJ. 2001. Inhibition of epithelial cell apoptosis by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 200 (2):145-149.
- Nelson D, Potempa J, Kordula T, Travis J. 1999. Purification and characterization of a novel cysteine proteinase (periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for a role in the inactivation of human alpha1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem*, 274 (18):12245-12251.
- Nixon CS, Steffen MJ, Ebersole JL. 2000. Cytokine responses to *treponema pectinovorum* and *treponema denticola* in human gingival fibroblasts. *Infect Immun*, 68 (9):5284-5292.
- Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. 1997. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun*, 65 (5):1980-1984.
- Noiri Y, Li L, Ebisu S. 2001. The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *J Dent Res*, 80 (10):1930-1934.
- Norskov-Lauritsen N, Kilian M. 2006. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56 (Pt 9):2135-2146.
- O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. 2004. Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontol* 2000, 35:101-134.
- Ogawa AT, Brasil de Souza Tde A, de Uzeda M, Jankevicius JV, Jankevicius SI. 2006. Characterization of proteolytic activities of *Fusobacterium nucleatum*. *J Endod*, 32 (6):521-523.
- Okada H, Murakami S. 1998. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9 (3):248-266.
- Okada M, Hayashi F, Soda Y, Zhong X, Miura K, Kozai K. 2004. Intra-familial distribution of nine putative periodontopathogens in dental plaque samples analyzed by PCR. *J Oral Sci*, 46 (3):149-156.

- Oleksy A, Banbula A, Bugno M, Travis J, Potempa J. 2002. Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation. *Microb Pathog*, 32 (4):173-181.
- Omori K, Naruishi K, Nishimura F, Yamada-Naruishi H, Takashiba S. 2004. High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. *J Biol Chem*, 279 (8):6643-6649.
- Onagawa M, Ishihara K, Okuda K. 1994. Coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Bull Tokyo Dent Coll*, 35 (4):171-181.
- Papapanou PN, Sandros J, Lindberg K, Duncan MJ, Niederman R, Nannmark U. 1994. *Porphyromonas gingivalis* may multiply and advance within stratified human junctional epithelium in vitro. *J Periodontal Res*, 29 (5):374-375.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, 183 (12):3770-3783.
- Pattamapun K, Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Kuwatanasuchat J, Pavasant P. 2003. Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, 38 (2):115-121.
- Popadiak K, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. 2007. Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *J Immunol*, 178 (11):7242-7250.
- Potempa J, Banbula A, Travis J. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 2000, 24:153-192.
- Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. 2003. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr Protein Pept Sci*, 4 (6):397-407.
- Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi JI, Kalkwarf KL, Allison AC. 1993. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*, 20 (3):225-231.
- Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol*, 11 (2):94-100.
- Roberts AP, Pratten J, Wilson M, Mullany P. 1999. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Lett*, 177 (1):63-66.
- Roberts FA, Darveau RP. 2002. Beneficial bacteria of the periodontium. *Periodontol* 2000, 30:40-50.
- Rosan B, Slots J, Lamont RJ, Listgarten MA, Nelson GM. 1988. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Oral Microbiol Immunol*, 3 (2):58-63.
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. 2001. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun*, 69 (4):2700-2707.
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. 2005. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res*, 84 (1):59-63.
- Saarela MH, Dogan B, Alaluusua S, Asikainen S. 1999. Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain(s). *J Periodontol*, 70 (5):504-509.
- Sabet M, Lee SW, Nauman RK, Sims T, Um HS. 2003. The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. *Microbiology*, 149 (Pt 12):3617-3627.

- Saito T, Ishihara K, Kato T, Okuda K. 1997. Cloning, expression, and sequencing of a protease gene from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037 in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 65 (11):4888-4891.
- Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. 2002. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52 (Pt 3):841-849.
- Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R. 2004. *Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie*. Aufl. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH.
- Sandros J, Papapanou P, Dahlen G. 1993. *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells in vitro. *J Periodontal Res*, 28 (3):219-226.
- Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papapanou PN. 2000. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res*, 79 (10):1808-1814.
- Schultz CP, Wolf V, Lange R, Mertens E, Wecke J, Naumann D, Zahringer U. 1998. Evidence for a new type of outer membrane lipid in oral spirochete *Treponema denticola*. Functioning permeation barrier without lipopolysaccharides. *J Biol Chem*, 273 (25):15661-15666.
- Scott D, Siboo R, Chan EC, Siboo R. 1996. An extracellular enzyme with hyaluronidase and chondroitinase activities from some oral anaerobic spirochaetes. *Microbiology*, 142 (Pt 9):2567-2576.
- Sela MN. 2001. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12 (5):399-413.
- Sfakianakis A, Barr CE, Kreutzer D. 2001. Mechanisms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced expression of interleukin-8 in gingival epithelial cells. *J Periodontol*, 72 (10):1413-1419.
- Shapiro SD. 1998. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol*, 10 (5):602-608.
- Sharma A, Inagaki S, Sigurdson W, Kuramitsu HK. 2005. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol*, 20 (1):39-42.
- Sharma A, Sojar HT, Glurich I, Honma K, Kuramitsu HK, Genco RJ. 1998. Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. *Infect Immun*, 66 (12):5703-5710.
- Shenker BJ, Hoffmaster RH, McKay TL, Demuth DR. 2000. Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: evidence that the CdtB protein is responsible for G2 arrest of the cell cycle in human T cells. *J Immunol*, 165 (5):2612-2618.
- Shenker BJ, Hoffmaster RH, Zekavat A, Yamaguchi N, Lally ET, Demuth DR. 2001. Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *J Immunol*, 167 (1):435-441.
- Slots J. 1998. Casual or causal relationship between periodontal infection and non-oral disease? *J Dent Res*, 77 (10):1764-1765.
- Slots J. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. *Periodontol 2000*, 20:7-13.
- Slots J, Ting M. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*, 20:82-121.
- Socransky SS, Haffajee AD. 1992. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*, 63 (4 Suppl):322-331.
- Socransky SS, Haffajee AD. 1994. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*, 5:7-25.

- Socransky SS, Haffajee AD. 2002. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000, 28:12-55.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25 (2):134-144.
- Sojar HT, Hamada N, Genco RJ. 1998. Structures involved in the interaction of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and human lactoferrin. *FEBS Lett*, 422 (2):205-208.
- Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM. 1993. Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 61 (4):1239-1245.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 56:187-209.
- Sugiyama A, Uehara A, Iki K, Matsushita K, Nakamura R, Ogawa T, Sugawara S, Takada H. 2002. Activation of human gingival epithelial cells by cell-surface components of black-pigmented bacteria: augmentation of production of interleukin-8, granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and expression of intercellular adhesion molecule 1. *J Med Microbiol*, 51 (1):27-33.
- Sutherland IW. 2001. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*, 9 (5):222-227.
- Tada H, Sugawara S, Nemoto E, Imamura T, Potempa J, Travis J, Shimauchi H, Takada H. 2003. Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains. *J Dent Res*, 82 (10):796-801.
- Takahashi N, Sato T, Yamada T. 2000. Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 182 (17):4704-4710.
- Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL, Jr. 1998. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol*, 25 (2):85-98.
- Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. 1979. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol*, 6 (5):278-307.
- Thorup AK, Dabelsteen E, Schou S, Gil SG, Carter WG, Reibel J. 1997. Differential expression of integrins and laminin-5 in normal oral epithelia. *Apmis*, 105 (7):519-530.
- Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. 1998. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol*, 69 (10):1139-1147.
- Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. 1997. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodontol Res*, 32 (1 Pt 2):120-125.
- Tsai CC, Ho YP, Chen CC. 1995. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol*, 66 (10):852-859.
- Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Takemoto T, Sakata M, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M, Kurihara H. 2001. Expression of IL-1 beta and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine*, 14 (3):152-161.
- Umemoto T, Hamada N. 2003. Characterization of biologically active cell surface components of a periodontal pathogen. The roles of major and minor fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*, 74 (1):119-122.
- Umemoto T, Li M, Namikawa I. 1997. Adherence of human oral spirochetes by collagen-binding proteins. *Microbiol Immunol*, 41 (12):917-923.
- van Winkelhoff AJ, Slots J. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol* 2000, 20:122-135.
- Vesey PM, Kuramitsu HK. 2004. Genetic analysis of *Treponema denticola* ATCC 35405 biofilm formation. *Microbiology*, 150 (Pt 7):2401-2407.

- Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. 2001. Effect of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* protease on the proliferation of gingival epithelial cells. *Oral Dis*, 7 (4):233-237.
- Watanabe K, Yilmaz O, Nakhjiri SF, Belton CM, Lamont RJ. 2001. Association of mitogen-activated protein kinase pathways with gingival epithelial cell responses to *Porphyromonas gingivalis* infection. *Infect Immun*, 69 (11):6731-6737.
- Weinberg A, Holt SC. 1990. Interaction of *Treponema denticola* TD-4, GM-1, and MS25 with human gingival fibroblasts. *Infect Immun*, 58 (6):1720-1729.
- Weinberg A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. 1997. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 65 (1):313-316.
- White PA, Nair SP, Kim MJ, Wilson M, Henderson B. 1998. Molecular characterization of an outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* belonging to the OmpA family. *Infect Immun*, 66 (1):369-372.
- Wilson M, Henderson B. 1995. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *FEMS Microbiol Rev*, 17 (4):365-379.
- Wilson M, Reddi K, Henderson B. 1996. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res*, 31 (6):393-407.
- Wyss C. 1989. Dependence of proliferation of *Bacteroides forsythus* on exogenous N-acetylmuramic acid. *Infect Immun*, 57 (6):1757-1759.
- Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*, 146 (Pt 3):547-549.
- Yamada M, Ikegami A, Kuramitsu HK. 2005. Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 250 (2):271-277.
- Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. 1994. IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med*, 23 (8):347-353.
- Yang HW, Huang YF, Chou MY. 2004. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol*, 75 (8):1077-1083.
- Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. 2002. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol*, 4 (5):305-314.
- Yilmaz O, Jungas T, Verbeke P, Ojcius DM. 2004. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 72 (7):3743-3751.
- Yin L, Dale BA. 2007. Activation of protective responses in oral epithelial cells by *Fusobacterium nucleatum* and human beta-defensin-2. *J Med Microbiol*, 56 (Pt 7):976-987.
- Yoneda M, Hirofuji T, Anan H, Matsumoto A, Hamachi T, Nakayama K, Maeda K. 2001. Mixed infection of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in a murine abscess model: involvement of gingipains in a synergistic effect. *J Periodontal Res*, 36 (4):237-243.
- Yoneda M, Hirofuji T, Motooka N, Nozoe K, Shigenaga K, Anan H, Miura M, Kabashima H, Matsumoto A, Maeda K. 2003. Humoral immune responses to S-layer-like proteins of *Bacteroides forsythus*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10 (3):383-387.
- Yoneda M, Yoshikane T, Motooka N, Yamada K, Hisama K, Naito T, Okada I, Yoshinaga M, Hidaka K, Imaizumi K, Maeda K, Hirofuji T. 2005. Stimulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* by cell extracts from *Tannerella forsythia*. *J Periodontal Res*, 40 (2):105-109.
- Yumoto H, Nakae H, Fujinaka K, Ebisu S, Matsuo T. 1999. Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 are induced in human oral epithelial cells in response to exposure to periodontopathic *Eikenella corrodens*. *Infect Immun*, 67 (1):384-394.

Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ. 1999. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb Pathog*, 26 (5):275-280.

9 Anhang

Tabelle 2 (zu Kap. 5.1): Zahl der adhärennten Bakterien (in KBE/Well) nach 1 h, 6 h und 18 h im planktonischen Milieu (die eingeklammerten Bakterien sind die, mit denen das Erstgenannte in Mischinfektion untersucht wurde; SD = Standardabweichung)

		1h	6h	18h	SD 1h	SD 6h	SD 18h
Einzelfektion	A.a.Y4	14225	132500	136667	519	9574	5774
	P.g.ATCC 33277	78375	88350	68000	13147	74568	62251
	P.g.M5-1-2	23875	97333	195000	4553	30022	19149
	T.f. ATCC 43037	8850	150400	217500	2927	59425	49244
Doppelfektion	P.g.ATCC (+ F.n.)	74125	105525	78600	90249	135312	90939
	F.n.(+ P.g ATCC)	27250	79683	27583	33215	106097	37752
	P.g.M5-1-2 (+ F.n.)	26000	93000	225000	1000	56415	10000
	F.n.(+ P.g. M5-1-2)	10100	36500	8333	1543	2121	5346
	T.f.(+ F.n.)	10425	175000	212500	5793	28868	43493
	F.n.(+ T.f.)	23775	20767	11667	9030	6933	4102
	P.g.ATCC (+ T.f.)	71275	65250	27250	48726	40868	18102
	T.f.(+ P.g ATCC)	17825	94000	50333	6347	52428	11146
Dreifachinfektion	P.g.ATCC(+ T.f.+ F.n.)	60050	54500	30000	34562	44014	13766
	T.f.(+ P.g.ATCC+ F.n.)	16200	86500	72250	11803	57138	34608
	F.n.(+ P.g.ATCC+ T.f.)	6325	20000	4725	4369	23184	2444

Tabelle 3 (zu Kap. 5.1): Zahl der adhärennten Bakterien (in KBE/Well) nach 1 h, 6 h und 18 h im „Biofilm“ (die eingeklammerten Bakterien sind die, mit denen das Erstgenannte in Mischinfektion untersucht wurde; SD = Standardabweichung)

		1h	6h	18h	SD 1h	SD 6h	SD 18h
Einzelfektion	A.a.Y4	17400	71500	125000	3382	9256	5774
	P.g.ATCC 33277	66208	115571	53125	82717	129827	20230
	P.g.M5-1-2	17500	130000	177500	2291	34641	12583
	T.f. ATCC 43037	9800	210000	237500	5743	14142	17078
Doppelfektion	P.g.ATCC (+ F.n.)	64080	101250	48886	90897	149346	14108
	F.n.(+ P.g ATCC)	11054	25500	8066	12420	30964	10644
	P.g.M5-1-2 (+ F.n.)	16433	130000	172500	2892	70000	22174
	F.n.(+ P.g. M5-1-2)	13775	39000	11000	3269	1414	1414
	T.f.(+ F.n.)	11100	213750	226250	6363	4787	11087
	F.n.(+ T.f.)	12100	30650	10650	2968	4190	2574
	P.g.ATCC (+ T.f.)	82000	90500	44250	31016	55684	34996
	T.f.(+ P.g ATCC)	11200	97750	27500	5862	51848	19513
Dreifachinfektion	P.g.ATCC(+ T.f.+ F.n.)	72425	92750	55000	28078	64712	46239
	T.f.(+ P.g.ATCC+ F.n.)	17275	78750	50500	10633	60081	24439
	F.n.(+ P.g.ATCC+ T.f.)	8600	22250	8300	5101	15928	3548

Tabelle 4 (zu Kap. 5.2): Zahl der internalisierten Bakterien (in KBE/Well) nach 1 h, 6 h und 18 h im planktonischen Milieu (die eingeklammerten Bakterien sind die, mit denen das Erstgenannte in Mischinfektion untersucht wurde; SD = Standardabweichung)

		1h	6h	18h	SD 1h	SD 6h	SD 18h
Einzelfektion	A.a.Y4	2375	11450	6650	1893	1292	2579
	P.g.ATCC 33277	24388	15788	35225	27684	11112	45161
	P.g.M5-1-2	13500	45000	90000	1260	1234	2568
	T.f. ATCC 43037	2375	65250	72000	1493	26323	22642
Doppelfektion	P.g.ATCC (+ F.n.)	18288	14725	28463	22868	11849	28994
	F.n.(+ P.g ATCC)	18773	54978	19401	24439	70364	24601
	P.g.M5-1-2 (+ F.n.)	4600	11500	150000	2121	4950	1435
	F.n.(+ P.g. M5-1-2)	12875	21525	5250	2597	10381	354
	T.f.(+ F.n.)	2288	68000	93750	1023	28317	38161
	F.n.(+ T.f.)	21250	25325	3467	2986	10731	1012
	P.g.ATCC (+ T.f.)	12600	30333	5250	15971	21638	2773
	T.f.(+ P.g ATCC)	6750	28250	8250	4539	20669	3419
Dreifachinfektion	P.g.ATCC(+ T.f.+ F.n.)	5500	6250	4250	712	4815	3345
	T.f.(+ P.g.ATCC+ F.n.)	5675	25750	28250	2625	15188	18913
	F.n.(+ P.g.ATCC+ T.f.)	12700	33333	1675	7027	20758	1512

Tabelle 5 (zu Kap. 5.2): Zahl der internalisierten Bakterien (in KBE/Well) nach 1 h, 6 h und 18 h im „Biofilm“ (die eingeklammerten Bakterien sind die, mit denen das Erstgenannte in Mischinfektion untersucht wurde; SD = Standardabweichung)

		1h	6h	18h	SD 1h	SD 6h	SD 18h
Einzelfektion	A.a.Y4	4233	4800	1825	643	2844	1090
	P.g.ATCC 33277	21863	10775	16500	29745	4072	5806
	P.g.M5-1-2	4100	27750	100000	1273	22981	2500
	T.f. ATCC 43037	2975	96250	78750	1723	27427	15478
Doppelfektion	P.g.ATCC (+ F.n.)	19481	12150	12338	28863	11482	2056
	F.n.(+ P.g ATCC)	9203	20494	15298	9761	25010	8134
	P.g.M5-1-2 (+ F.n.)	2500	10000	72500	1578	2569	3536
	F.n.(+ P.g. M5-1-2)	14750	30000	8150	1485	1000	778
	T.f.(+ F.n.)	1867	74625	77500	764	17518	20108
	F.n.(+ T.f.)	14125	25925	6750	4553	6305	2872
	P.g.ATCC (+ T.f.)	5050	12000	3750	1270	9416	4763
	T.f.(+ P.g ATCC)	7075	23250	6750	5159	20228	4710
Dreifachinfektion	P.g.ATCC(+ T.f.+ F.n.)	8533	5750	3750	3942	4206	3031
	T.f.(+ P.g.ATCC+ F.n.)	5675	23667	24500	3522	10339	24804
	F.n.(+ P.g.ATCC+ T.f.)	5150	24000	4425	3482	18358	3105

Tabelle 6 (zu Kap. 5.3): IL-6-Konzentration (in pg/ml) in den KB-Zellüberständen nach Einzelinfektion mit parodontopathogenen Bakterien nach 1 h, 6 h und 18 h im planktonischen Milieu und im „Biofilm“ (SD = Standardabweichung)

		1h	6h	18h	SD 1h	SD 6h	SD 18h
planktonisch	Kontrolle	0,7	2,4	6,6	0,5	0,6	3,4
	A.a. Y4	0,7	2,4	7,2	0,0	0,3	2,2
	F.n. ATCC 25586	0,0	5,0	25,5	0,0	0,7	4,6
	P.g. ATCC 33277	1,3	4,7	14,8	1,4	2,0	7,7
	P.g. M5-1-2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T.f. ATCC 43037	0,4	3,7	6,1	0,4	3,7	5,9
	T.d. ATCC 35405	0,3	1,1	4,6	0,5	0,5	0,9
Biofilm	Kontrolle	1,3	3,2	6,8	0,8	2,0	1,8
	A.a. Y4	1,5	4,6	6,6	0,0	0,0	1,4
	F.n. ATCC 25586	0,8	4,8	22,6	0,4	0,6	13,6
	P.g. ATCC 33277	1,5	5,5	18,0	1,3	3,4	15,2
	P.g. M5-1-2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
	T.f. ATCC 43037	0,7	4,8	6,5	0,8	2,8	2,6
	T.d. ATCC 35405	0,4	2,4	1,7	0,5	1,1	2,4

Tabelle 7 (zu Kap. 5.3): IL-6-Konzentrationen (in pg/ml) in den KB-Zellüberständen nach Mischinfektionen mit parodontopathogenen Bakterien nach 1 h, 6 h und 18 h im planktonischen Milieu und im „Biofilm“ (SD = Standardabweichung)

		1h	6h	18h	SD 1h	SD 6h	SD 18h
planktonisch	Kontrolle	0,7	2,4	6,6	0,5	0,6	3,4
	P.g. ATCC, F.n.	1,4	11,6	234,0	1,4	6,8	104,5
	P.g. M5-1-2, F.n.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T.f., F.n.	0,4	9,8	59,8	0,4	5,6	23,1
	P.g. ATCC, T.f.	0,1	0,3	1,7	0,1	0,3	1,7
	P.g. ATCC, T.f., F.n.	0,1	1,6	9,7	0,3	2,9	11,7
	P.g. ATCC, T.f., T.d., F.n.	6,5	3,6	2,8	0,9	0,0	2,8
Biofilm	Kontrolle	1,3	3,2	6,8	0,8	2,0	1,8
	P.g. ATCC, F.n.	1,6	9,1	60,6	1,5	6,9	5,6
	P.g. M5-1-2, F.n.	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1
	T.f., F.n.	0,7	22,0	101,3	0,8	9,0	41,4
	P.g. ATCC, T.f.	0,5	3,5	0,9	0,5	4,1	1,8
	P.g. ATCC, T.f., F.n.	0,7	6,2	4,7	0,9	7,2	5,7
	P.g. ATCC, T.f., T.d., F.n.	2,5	8,0	1,1	0,8	2,3	1,6

Tabelle 8 (zu Kap. 5.3): IL-8-Konzentrationen (in pg/ml) in den KB-Zellüberständen nach Einzelinfektion mit parodontopathogenen Bakterien nach 1 h, 6 h und 18 h im planktonischen Milieu und im „Biofilm“ (SD = Standardabweichung)

		1h	6h	18h	SD 1h	SD 6h	SD 18h
planktonisch	Kontrolle	3,1	13,5	29,9	2,1	12,1	17,0
	A.a. Y4	4,7	14,8	34,7	0,5	0,8	1,9
	F.n. ATCC 25586	3,9	20,6	103,2	0,0	4,4	7,1
	P.g. ATCC 33277	4,6	9,8	22,4	5,3	11,4	27,3
	P.g. M5-1-2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T.d. ATCC 35405	0,6	1,4	6,0	0,9	1,9	2,8
	T.f. ATCC 43037	1,7	12,2	25,3	0,3	3,5	6,6
Biofilm	Kontrolle	4,8	14,5	39,1	3,7	7,9	9,1
	A.a. Y4	5,8	16,0	42,8	1,1	1,3	2,2
	F.n. ATCC 25586	3,7	35,0	135,9	0,8	19,9	23,8
	P.g. ATCC 33277	3,1	12,8	32,6	2,9	14,3	38,1
	P.g. M5-1-2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T.d. ATCC 35405	0,5	1,2	2,2	0,7	1,7	3,0
	T.f. ATCC 43037	7,1	16,1	34,0	0,6	1,0	3,0

Tabelle 9 (zu Kap. 5.3): IL-8-Konzentrationen (in pg/ml) in den KB-Zellüberständen nach Mischinfektionen mit parodontopathogenen Bakterien nach 1 h, 6 h und 18 h im planktonischen Milieu und im „Biofilm“ (SD = Standardabweichung)

		1h	6h	18h	SD 1h	SD 6h	SD 18h
planktonisch	Kontrolle	3,1	13,5	29,9	2,1	12,1	17,0
	P.g. ATCC, F.n.	2,0	19,3	60,8	2,3	22,4	69,7
	P.g. M5-1-2, F.n.	0,1	0,0	0,4	0,1	0,0	0,5
	T.f., F.n.	2,7	39,1	192,0	1,1	1,1	50,5
	P.g. ATCC, T.f.	0,0	2,3	6,9	0,0	3,4	10,5
	P.g. ATCC, T.f., F.n.	0,1	17,6	74,9	0,1	25,5	92,0
	P.g. ATCC, T.f., T.d., F.n.	0,0	1,4	0,0	0,0	1,9	0,0
Biofilm	Kontrolle	4,8	14,5	39,1	3,7	7,9	9,1
	P.g. ATCC, F.n.	5,2	42,8	102,4	2,1	5,8	117,7
	P.g. M5-1-2 + F.n.	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1
	T.f., F.n.	5,3	67,0	205,0	0,2	13,7	42,4
	P.g. ATCC, T.f.	1,3	16,7	1,6	0,9	18,2	2,1
	P.g. ATCC, T.f., F.n.	2,1	27,2	36,6	0,8	28,8	21,6
	P.g. ATCC, T.f., T.d., F.n.	0,0	1,2	0,0	0,0	1,7	0,0

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Michael Kirschbaum
Geburtsdatum, -ort 8. August 1982 in Gotha
Familienstand ledig
wohnhaft in Georgenthaler Str. 14, 99867 Gotha

Schulbildung

09/1989 – 07/1991 Theodor-Neubauer-Schule, Gotha
09/1991 – 07/1993 Staatliche Grundschule „Josias Friedrich Christian Löffler“, Gotha
09/1993 – 06/2001 Gymnasium Ernestinum, Gotha
06/2001 Abitur mit der Gesamtnote 1,0

Zivildienst

08/2001 – 05/2002 HELIOS-Klinik Gotha/Ohrdruf GmbH im pflegerisch-stationären Bereich (chirurgische Wachstation, HNO-ärztliche Station)

Studium

10/2002 – 12/2007 Zahnmedizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
12/2007 Zahnmedizinisches Staatsexamen, Gesamtergebnis: sehr gut (1,0)
Approbation als Zahnarzt

Beruflicher Werdegang

seit 01/2008 Assistenz Zahnarzt/wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau), Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Auszeichnungen

2007 Adolph-Witzel-Stipendium 2007 der Thüringer Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde am Klinikum der FSU Jena für die vorliegende wissenschaftliche Arbeit
2008 Absolventenpreise der Thüringer Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde am Klinikum der FSU Jena (Vorsitzender: PD Dr. W. Reinhardt) und des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der FSU Jena (Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Küpper)

Jena, 08.02.2008

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube danke ich für die uneingeschränkte Nutzung aller Einrichtungen seines Institutes.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister und Frau Priv.-Doz. Dr. med. dent. habil. S. Eick für die Überlassung des Themas sowie die exzellente Unterstützung sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch bei der Verfassung der schriftlichen Arbeit. Beide hatten während der gesamten Zeit ein immer offenes Ohr für anstehende Fragen und waren stets zu unkomplizierter Hilfestellung bereit.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente möchte ich mich ebenfalls bei allen beteiligten Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena und im Besonderen bei Frau Claudia Ranke, MTA im Forschungsbereich „Orale Mikrobiologie“, bedanken.

Dank für die Herstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen gilt den beiden MTA Frau Kaiser und Frau Linde am Elektronenmikroskopischen Zentrum der FSU Jena.

Für die Verleihung des Adolph-Witzel-Stipendiums 2007 möchte ich mich bei der Thüringer Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde am Klinikum der FSU Jena (1. Vorsitzender: Priv.-Doz. Dr. W. Reinhardt) bedanken.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, Frau Dr. Helga Kirschbaum und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. Eberhard Kirschbaum, für die Unterstützung während des gesamten Studiums und im Besonderen für die Motivation während der Bearbeitung dieser Studie.

Natürlich möchte ich auch meiner Freundin, Elke Illhardt, für ihr Verständnis danken, das sie mir im Rahmen der Erstellung dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. S. Eick und Prof. Dr. W. Pfister

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 08.02.2008

Michael Kirschbaum