

D. Wolff¹, A. Kensche², S. Rupf³, M. Hannig³, C. Hannig²

Der orale Biofilm – neue Perspektiven zu einem alten Thema?

The oral biofilm – new views on an old topic?



D. Wolff

Einleitung: Der kariespathogene Biofilm ist Gegenstand umfassender Studien mit modernen biowissenschaftlichen Techniken.

Material und Methode: Dazu zählen molekularbiologische Verfahren zur Identifizierung des Mikrobioms ebenso wie Untersuchungen zum Metabolom und zur Funktion, Komposition und Ultrastruktur der extrazellulären Matrix. Prinzipiell können mit den teilweise sehr aufwendigen Methoden umfassende Informationen und Daten generiert werden.

Ergebnisse: Für einen tatsächlichen Erkenntnisgewinn zu den Pathomechanismen von Kariesinitiation und Kariesprogression ist es jedoch erforderlich, die Daten adäquat statistisch aufzubereiten und die Ergebnisse der verschiedenen Methoden vernetzt zu interpretieren. Auf diese Weise können neue Strategien zur Früherkennung kariesgefährdeter Individuen aber auch neue Ansätze für die Kariesprävention und für das Biofilmmangement entwickelt werden.

Schlussfolgerung: Die aktuellen Entwicklungen belegen die Relevanz von biowissenschaftlicher Grundlagenforschung in der Zahnmedizin zu den Hintergründen der häufigsten Infektionskrankheit – der Karies. Der vorliegende Übersichtsartikel gibt einen Überblick über aktuelle Studien und methodische Ansätze.

(Dtsch Zahnärztl Z 2014; 69: 658–673)

Schlüsselwörter: Biofilm; Karies; orales Mikrobiom; mikrobielle Diversität.

Introduction: There are many studies on the cariogenic biofilm based on modern methods common in life sciences.

Material and Methodes: This includes molecular biological techniques for the characterization of the microbiome and metabolome of the biofilm as well as investigations on function, composition and ultrastructure of the extracellular matrix.

Results: In principal, these elaborated methods offer broad information and data. However, for a gain in knowledge on patho-mechanisms of caries initiation and progression, it is necessary to evaluate the data statistically in an adequate manner and to combine the information from the different methods using an integrated scientific approach. Thereby, new strategies can be developed for the early diagnosis of individuals with a risk for developing caries. Furthermore, novel approaches for preventive dentistry and for biofilm management can be established.

Conclusion: Recent developments confirm the relevance of life science basic research in dentistry. The present review aims to give an overview on recent studies and methodical approaches.

Keywords: biofilm; caries; oral microbiome, microbial diversity

¹ Poliklinik für Zahnerhaltungskunde, Universitätsklinikum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 400, 69120 Heidelberg

² Poliklinik für Zahnerhaltung mit Bereich Kinderzahnheilkunde, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fetscherstraße 74, 01307 Dresden

³ Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes, Geb. 73, 66421 Homburg/Saar

Peer-reviewed article: eingereicht: 06.10.2014, Fassung akzeptiert: 13.10.2014

DOI 10.3238/dzz.2014.0658–0673

Einleitung

Definition und Bedeutung von Biofilmen

Die Aggregation von Mikroorganismen zu komplexen symbiotischen Gemeinschaften in Form der Biofilme gilt allgemein als die erfolgreichste mikrobielle (Über-)Lebensform [22, 33]. Der Begriff „Biofilm“ bezeichnet das an Oberflächen bzw. an Grenzflächen auftretende Vorkommen adhärenter mikrobieller Populationen, eingebettet in eine extrazelluläre polymere Matrix [22]. Diese wird zu großen Teilen von den Mikroorganismen selbst synthetisiert und besteht aus Polysacchariden, Proteinen, Glycolipiden sowie bakterieller DNA. Die individuelle Zusammensetzung der Biofilmmatrix variiert entsprechend der vorhandenen Mikroorganismen und Umweltbedingungen, ist jedoch essenzielle Voraussetzung für die Bildung einer dynamischen, dreidimensionalen Biofilmstruktur [33]. Die Bildung der extrazellulären Matrix ermöglicht den Mikroorganismen sowohl die feste Adhäsion an Oberflächen als auch die intermikrobielle Kohäsion als Grundlage der Bildung synergistischer Mikrokolonien [33]. Bakterien im Biofilm weisen phänotypische Charakteristika auf, die sich von denen der planktonischen Lebensform deutlich unterscheiden [31]. Verglichen mit ihrer planktonischen Lebensform profitieren die Mikroorganismen im immobilisierten Zustand des Biofilms von einer erhöhten Retention metabolischer relevanter Komponenten wie Enzymen und Nährstoffen im Biofilm, was ihnen eine erhöhte Flexibilität im Hinblick auf das oftmals stark variierende Substratangebot verleiht [131]. Darüber hinaus haben diverse Studien gezeigt, dass die Organisation prokaryontischer Zellen in Biofilmen ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber pH-Wertschwankungen, antibakteriellen Agenden (Antibiotika, Desinfizienten) und mechanischen Abscherkräften erhöht [39, 133]. Da Bakterien an allen Grenzflächen adhären können, sofern Wasser und Nährstoffe vorhanden sind, ist die Biofilmbildung ubiquitär. Genetische Regulations- und Selektionsmechanismen ermöglichen prokaryontischen Zellen eine bemerkenswerte Adaptationsfähigkeit in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen [19]. Darüber hi-

naus zeigen Biofilme entsprechend der besonderen Merkmale des besiedelten Lebensraumes (Temperatur, Sauerstoff, Abscherkräfte) charakteristische strukturelle Anpassungsmechanismen [39]. Dies hat erhebliche Konsequenzen für die Medizin und Zahnmedizin, aber auch die Werkstoff- und Ingenieurwissenschaften [48]. So ist beispielsweise die Oberflächenmodifikation verschiedener medizinisch relevanter Implantatmaterialien nach wie vor Schwerpunkt zahlreicher kostenintensiver Studien [34, 111].

Das Biotop Mundhöhle

In der Mundhöhle gewonnene Erkenntnisse zur Biofilmbildung sind für das generelle Verständnis des omnipräsenten Phänomens der Bioadhäsion besonders wertvoll [48]. Die Mundhöhle stellt ein gut zugängliches Biotop dar, in dem die physiologischen und pathologischen Prozesse und Mechanismen der Biofilmbildung unter Realbedingungen *in situ* untersucht werden können [48]. Dentale Plaque ist ein dynamischer und äußerst komplexer Biofilm im Sinne eines mikrobiellen Ökosystems [110]. Zahlreiche Studien belegen die dynamische Variabilität der mikrobiellen Besiedelung der Mundhöhle [136]. Diese wird zum einen durch verschiedene postnatale Entwicklungsstadien (Dentitionen, Zahnverlust) aber auch zahnärztliche Maßnahmen (restaurative und prothetische Therapie), zum anderen durch wirtsspezifische Faktoren wie Alter, Ernährung und Immunität beeinflusst [21].

Darüber hinaus existieren in der Mundhöhle, aufgrund ihrer anatomischen Heterogenität, verschiedene Habitate [15, 64, 92, 136]. Diese sind charakteristischen physiko-chemischen Einflussfaktoren ausgesetzt, und ihre mikrobielle Besiedelung variiert nachweislich [136]. Das feuchte Milieu der Mundhöhle wird durch die kontinuierliche Sekretion von Speichel, Sulkusfluid und mukosalem Transsudat aufrechterhalten. Für die bakterielle Kolonisation wesentliche Komponenten des Gesamtspeichels sind prolinreiche Proteine, Phosphoproteine, Agglutinine, α -Amylase oder auch Muzine [43, 56]. Daneben enthält der Speichel diverse antibakterielle Komponenten wie Lysozym, Peroxidase, Laktoferrin, Immun-

globuline (sIgA), Histatine oder Agglutinine (Streptokokken-agglutinierendes MUC-5B und MUC-7) [34, 43, 126]. Sulkusfluid, welches als Transsudat aus dem Blutplasma der Kapillaren entsteht, ist besonders reich an Albumin und Immunglobulinen (IgA, IgG und IgM) [18]. Obgleich die gesamte Mundhöhle durch den Speichel benetzt wird, erfordert die mikrobielle Adhärenz entsprechend der Lokalisation spezifische Rezeptoren und komplementäre bakterielle Adhäsine [80]. Die Biofilmbildung in der Mundhöhle findet sowohl auf den epithelialen Oberflächen der Weichgewebe (Wangen, Zunge, Gaumen, Mundboden, Lippen und Gingiva), als auch auf den in der Mundhöhle exponierten Festkörperoberflächen statt [48, 128]. Im Rahmen der physiologischen Regeneration der Mukosa werden oberflächliche Zellen regelmäßig abgestoßen, was die dauerhafte Adhäsion von Mikroorganismen erschwert (soft-shedding-surface) [80, 136]. Jedoch gewähren die papillären Strukturen der Zunge, die interdentale Papille oder auch der gingivale Sulkus adhärenter Bakterien Schutz vor mechanischer Elimination.

Demgegenüber ist es ein Charakteristikum der Zahnoberfläche, dass sie als non-shedding-surface kein physiologisches Abschilferungs- oder Regenerationspotenzial aufweist [48]. Die intraoral wirksamen Scherkräfte, die masticatorische Funktion, der Weichgewebdruck, Nahrungsbestandteile, die Zusammensetzung von Speichel- und Sulkusfluid sowie Mundhygienemaßnahmen nehmen Einfluss auf die inter- und intraindividuelle Biofilmbildung an der Zahnoberfläche. Aufgrund der differierenden mechanischen und chemischen Milieubedingungen resultieren Unterschiede in der supra- und subgingivalen Biofilmbildung [15, 17, 64]. Auch die supragingivale Biofilmbildung unterliegt innerhalb der Mundhöhle ausgeprägten topischen Unterschieden [54].

Liegen gesunde Verhältnisse vor, so herrscht eine Balance zwischen dem Wirt und den Mikroorganismen des oralen Biofilms. Die in der Mundhöhle vorkommenden Kommensalen (residente Mikroflora) sind als eine Form der körpereigenen Abwehr anzusehen. Eindringenden Mikroorganismen wird der Zugang zum menschlichen Organismus durch den bestehenden oralen Biofilm

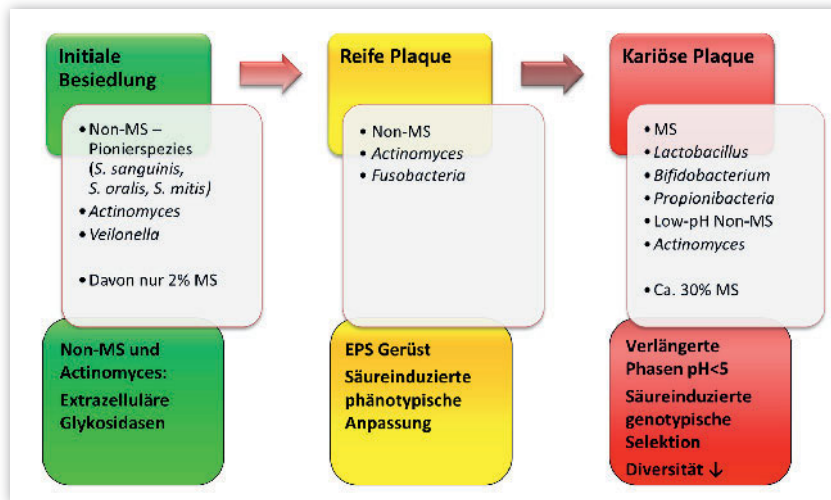


Abbildung 1 Stadien der Plaquereifung von der initialen Besiedelung bis hin zur kariogenen Plaque (modifiziert nach [121]), MS = Mutans Streptokokken.

Figure 1 Stages of oral biofilm formation from initial bacterial colonization up to cariogenic plaque (modified according to [121]), MS = mutans streptococci.

verwehrt. Die Balance zwischen oralem Biofilm und Wirt kann jedoch aus dem Gleichgewicht geraten. Veränderte extrinsische oder intrinsische Faktoren können zur Störung der mikrobiellen Homöostase führen [81, 84]. Zum Beispiel können die hochfrequente Zufuhr von Zucker oder Nikotin, das Unterlassen von Mundhygienemaßnahmen oder ein ungenügendes Speichelangebot, aber auch Veränderungen der körpereigenen Immunabwehr Störungen der mikrobiellen Homöostase verursachen. Sowohl die Entstehung von Karies als auch von Parodontopathien und Schleimhauterkrankungen ist mit der Präsenz eines pathogenen Biofilms assoziiert [16, 23, 56, 113]. Umfangreicher mikrobiologischer und klinischer Forschung ist es zu verdanken, dass unser Wissen zur Entstehung und möglichen Modifikation pathogener Biofilme in der Mundhöhle weiter präzisiert werden konnte. Ein umfassender Überblick des derzeitigen Kenntnisstandes mit besonderer Berücksichtigung des kariogenen Biofilms ist Inhalt der vorliegenden Arbeit.

Das menschliche Mikrobiom

Der menschliche Organismus enthält zehnmal mehr Bakterien als eigene Körperzellen (10^{14} Bakterienzellen, 10^{13} Körperzellen, [84]). Die Gesamtheit der Mikroorganismen, die auf und in unse-

rem Körper leben, wird als Humanes Mikrobiom bezeichnet. Da wir scheinbar als Wirt für einen „mikrobiellen Organismus“ dienen, könnte man von uns Menschen auch als „Superorganismen“ sprechen [10].

Interessanterweise ist das humane Mikrobiom dabei nicht nur ein passiver Begleiter des menschlichen Organismus. Studienergebnisse des letzten Jahrzehnts haben eindrucksvoll gezeigt, dass das humane Mikrobiom direkt und indirekt Einfluss auf wichtige physiologische Prozesse, wie die Verdauung und den Stoffwechsel, nimmt [8, 10, 137]. Die Entwicklung des Immunsystems wird ebenfalls vom Mikrobiom beeinflusst [8, 10, 137]. Auch hier gilt, dass beim gesunden Menschen das humane Mikrobiom und der menschliche Körper harmonisch koexistieren. Es entstehen jedoch Erkrankungen, wenn sich das Mikrobiom verändert, dadurch virulent und pathogen wird oder an Stellen vordringt, an denen es nicht vorgesehen ist [81].

Mit der Geburt beginnt die mikrobielle Besiedelung des menschlichen Körpers. Mikroorganismen aus der Umwelt und von Kontaktpersonen kolonisieren die verschiedenen äußeren und inneren Oberflächen des Körpers, wobei aufgrund der spezifischen lokalen biologischen Gegebenheiten (*biotische und abiotische Faktoren*) immer nur eine bestimmte Teilmenge des Mikrobioms in einer Nische zu finden ist. Bemerkens-

werterweise unterliegen die charakteristischen Sub-Mikrobiome in einer Nische dabei einer deutlichen Selektion. Beispielsweise können von den über 700 verschiedenen Arten von Mikroorganismen in der Mundhöhle nur etwas weniger als 30 im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden, obwohl täglich große Mengen über den verschluckten Speichel und den Speisebolus in den Magen-Darm-Trakt transportiert werden [81].

Über das humane Mikrobiom ist noch vergleichsweise wenig bekannt. Im Jahr 2007 wurde deswegen das sogenannte Human Microbiome Project (<http://hmpdacc.org/>) ins Leben gerufen. Ziel des Projektes ist die Bereitstellung einer öffentlich zugänglichen Datenbank, die spezielle Gensequenzen von Mikroorganismen (16S rRNA) zur Verfügung stellt. Wissenschaftler können Informationen eingeben und abrufen und ihre eigenen Daten mit Referenzdaten vergleichen [38]. Bisherige Analysen humaner Mikrobiome zeigten, dass es beträchtliche intra- und interindividuelle Unterschiede gibt [59]. Daher sucht man nach charakteristischen bakteriellen Mustern für bestimmte Habitate. Im Darm konnten beispielsweise schon sogenannte Enterotypen (spezifische Typen des Darm-Mikrobioms) beschrieben werden [8]. Die verschiedenen Enterotypen sind wiederum mit der Zusammensetzung der Nahrung und dem Vorkommen von Adipositas, entzündlichen Darmerkrankungen und Morbus Crohn assoziiert [8, 107, 132]. Bei den Enterotypen der Darmflora wurden vergleichsweise geringe Schwankungen beobachtet, bei der Zusammensetzung der supragingivalen Plaque hingegen sah man aber eine sehr große Streubreite und Variabilität [30].

Die Human Oral Microbiome Database (<http://www.homd.org>) wurde im Jahr 2008 von Wissenschaftlern des Forsyth Institute in Boston und des King's College in London ins Leben gerufen. Diese Datenbank sammelt alle bekannten genomischen Sequenzen, sowie taxonomische, phänotypische, phylogenetische, klinische und bibliografische Informationen oraler Spezies. Die Datenbank soll alle Informationen zum oralen Mikrobiom zusammenführen und die Erforschung der Rolle des oralen Mikrobioms für die Gesundheit und bei Erkrankungen fördern.

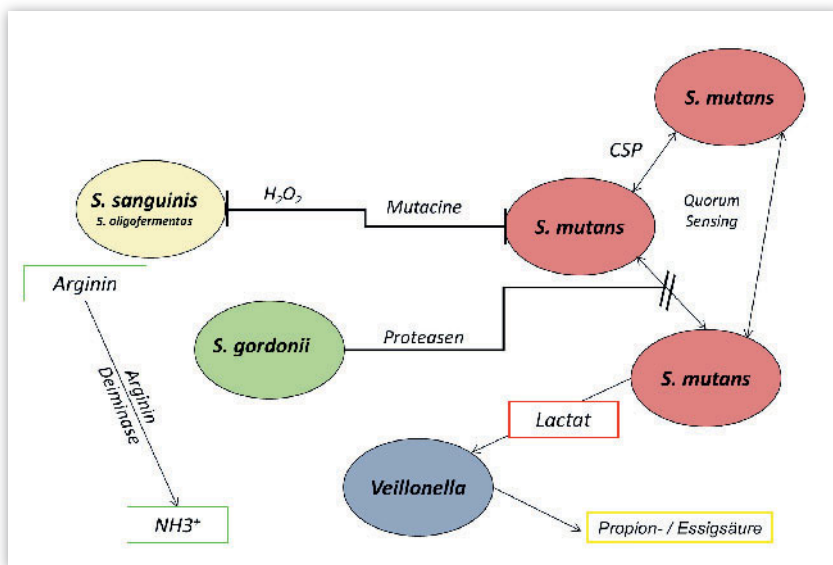


Abbildung 2 Synergistische und antagonistische Effekte ausgewählter Spezies im oralen Biofilm (modifiziert nach [69, 70, 72, 81]).

Figure 2 Synergistic and antagonistic effects of selected species in the oral biofilm (modified according to [69, 70, 72, 81]).

Zusammensetzung und Diversität des oralen Mikrobioms

Die orale Mikroflora weist eine hohe Diversität auf. Zu ihr gehören neben Bakterien auch Viren, Mykoplasmen und Hefen. Die Mundhöhle bietet dabei Nischen mit unterschiedlichem Nahrungs- und Sauerstoffangebot und variierenden pH-Werten, in denen sich differenzielle Subgruppierungen herausbilden [81, 84, 85].

Wegweisende Forschungsarbeiten von Dr. Paster und Dr. Dewhirst (beide Forsyth Institute) zeigten, dass die Mundhöhle von einer bemerkenswerten Vielfalt und Vielzahl von bakteriellen Spezies besiedelt ist (> 700 verschiedene Spezies)[138]. Davon ist mindestens die Hälfte nicht über Kulturmethode extraoral nachweisbar [2, 101, 102].

Neuere Studien zeigen, dass Streptokokken einen großen Anteil der oralen Mikroflora darstellen [105, 139]. Sie waren und sind eine umfangreich untersuchte Bakteriengruppe, da vor allem Mutans Streptokokken lange Zeit als sogenannte Leitkeime der Kariogenese galten. Die wichtigsten Vertreter der Mutans Streptokokken sind *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus*. Sie sind als kariespathogen einzustufen, weil sie die Bildung von löslichen und

unlöslichen extrazellulären Polysacchariden (Glucan, Mutan und Fructan) initiieren [16]. Zudem können sie bei einem Überangebot an Kohlenhydraten intrazelluläre Polysaccharide synthetisieren und nutzen diese als Kohlenhydratspeicher. Als wichtigste Pathogenitätsfaktoren sind Lactatproduktion (azidogen) und hohe Säureresistenz (azidurisch) anzusehen. Zudem wurde nachgewiesen, dass Mutans Streptokokken über extrazelluläre Signalmoleküle miteinander kommunizieren und sich dadurch an verändernde Bedingungen im Biofilm sehr gut anpassen können.

Eine weitere interessante Streptokokken-Gruppe sind die Non-Mutans Streptokokken. Zu ihnen gehören u.a. *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* und *Streptococcus intermedius* [112]. Einige Untersuchungen stufen die Non-Mutans Streptokokken als assoziiert mit oraler Gesundheit ein [20]. Andere haben eine erhebliche Rolle dieser Bakterien bei der Kariesinitiation und Kariesprogression aufgezeigt [11]. Schließlich wurde beschrieben, dass Non-Mutans Streptokokken im Sinne opportunistischer Pathogene azidogene und azidurische Subpopulationen ausbilden können. Diese sind aktiv in den Kariesprozess involviert und werden als sogenannte low-pH Non-Mutans Streptokokken bezeichnet [120].

Aktuell konnte nachgewiesen werden, dass α -Amylase aus dem Speichel über spezifische Proteine an der bakteriellen Zelloberfläche zahlreicher Streptokokkenspezies (u.a. *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. cristatus*, *S. parasanguis*) immobilisiert werden kann. Streptokokken mit dieser Eigenschaft werden als α -Amylase bindende Streptokokken (ABS) bezeichnet [94]. ABS werden interessanterweise nur in den Tierspezies gefunden, die über den Speichel α -Amylase sezernieren [94]. Die Fähigkeit einzelner Streptokokkenspezies, humane Speichelamylase an der Zelloberfläche zu immobilisieren, kann als eine hoch effektive evolutionäre Adaptation der Bakterien an den menschlichen Wirt angesehen werden. ABS profitieren von der an der Zelloberfläche immobilisierten Amylaseaktivität insofern, als dass hochmolekulare Kohlenhydrate aus der menschlichen Ernährung nun hydrolysiert, dem bakteriellen Stoffwechsel zugeführt und zur Energiegewinnung genutzt werden können.

Ein ähnlich opportunistisches Verhalten, wie es bei Non-Mutans Streptokokken beobachtet wird, ist auch für Lactobazillen beschrieben worden. Im Rahmen der frühen Biofilmbildung werden Lactobazillen eher mit gesunden Verhältnissen assoziiert. Man weist bei einigen Spezies sogar positive Interferenzeffekte nach, wie beispielsweise die Produktion von H_2O_2 oder Bakteriozinen. Kommt es jedoch zu einem Abfall des pH-Wertes, dann profitieren einige *Lactobacillus* Spezies von dem sauren Milieu, stellen ihren Metabolismus um und tragen selbst deutlich zur Säureproduktion bei [115, 140].

Plaqueschypothesen – oder wie erklärt man den Zusammenhang zwischen oralen Biofilmen und Erkrankung?

In der Vergangenheit wurde postuliert, dass die alleinige Ansammlung großer Mengen von Mikroorganismen als Biofilm in der Mundhöhle eine Entzündung oder Erkrankung hervorrufen würde, man sprach hier von der sogenannten unspezifischen Plaqueschypothese [114, 124]. Diese Annahme musste jedoch teilweise revidiert werden, als man in späteren mikrobiologischen Experimenten bestimmte Keime in stark erhöhter Anzahl bei Erkrankungen wie

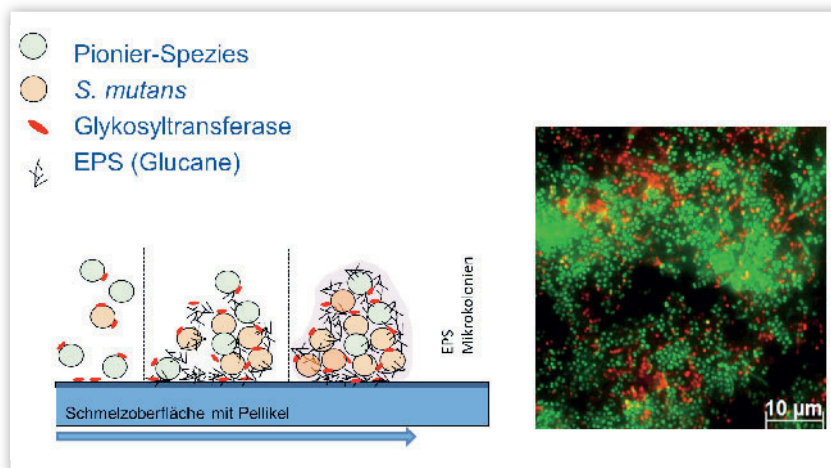


Abbildung 3 Biofilmbildung (adaptiert nach [68]), Kolonisierung der Pellicel-bedeckten Schmelzoberfläche durch Pionier-Spezies; Immobilisierung von Glykosyltransferasen und weiterführende Kolonisierung mit *S. mutans*; es kommt zur Glucanbildung (EPS); eine EPS-reiche Matrix und EPS-Mikrokolonien werden ausgebildet; Mikrokolonien im fluoreszenzmikroskopischen Bild einer Schmelzprobe nach 8 h oraler Exposition, Vitalfärbung (BaLightBacterial Viability Kit).

Figure 3 Biofilm formation (adapted according to [68]), bacterial adherence to the pellicle coated enamel surface by pioneer species; immobilization of extracellular glycosyltransferases and further colonization by *S. mutans*; glucans are synthesized (EPS), a matrix rich in EPS and EPS-microcolonies is formed; fluorescence microscopic image of microcolonies on an enamel sample after 8 h of oral exposure, life-dead staining (BaLightBacterial Viability Kit).

Karies und Parodontitis nachweisen konnte. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde die sogenannte spezifische Plaquehypothese formuliert [77, 122]. Diese leitete sich aus der ursprünglichen chemoparasitären Theorie von *Wil-loughby D. Miller* ab [88]. Eine dritte Hypothese wurde dann von *Marsh* formuliert [82]. Faktoren wie die Ökologie der Mundhöhle und die spezifische bakterielle Zusammensetzung des Biofilms beeinflussen die Entstehung einer Erkrankung. Diese sogenannte ökologische Plaquehypothese hat bis heute weitgehend Gültigkeit [121]. Gesundheit ist gleichzusetzen mit mikrobieller Homöostase, d.h. unter physiologischen Bedingungen leben der Wirt und die residente Mikroflora in einer stabilen und harmonischen symbiotischen Beziehung [84]. Die durch den Wirt vorgegebenen Milieubedingungen determinieren dabei die Zusammensetzung und Genexpression der residenten Mikroflora im Biofilm [84]. Veränderungen der oralen Milieubedingungen durch extrinsische oder intrinsische Einflussfaktoren können jedoch zur nachhaltigen Veränderung der symbiotischen Beziehung zwischen Wirt und Mikroflora und da-

mit zu einer Dysbalance im Biofilm führen. Aus dieser Dysbiose resultiert ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Biofilm-assoziierten Erkrankungen [84].

Orale Mikroflora und systemische Auswirkungen

Es gilt als gesichert, dass die Biofilme der Mundhöhle nicht isoliert vom Rest des Körpers betrachtet werden können. Der Übergang von Keimen im Bereich der Gingiva und des marginalen Sulkus in den Blutkreislauf ist möglich. Zusammenhänge zwischen oralen Pathogenen und systemischen Infektionen und Entzündungen wurden vielfach dokumentiert [40, 41, 60, 91, 100, 137]. Dies betrifft kardiovaskuläre Erkrankungen und Parodontalpathogene, wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis*, oder *Streptococcus mutans* (Serotyp *k*) [41], oder die Initiation infektiöser Endokarditis durch Streptokokken, vor allem *S. sanguinis*, *S. gordonii* und *S. oralis* [81]. Weitere Zusammenhänge wurden für das „Adverse Pregnancy Outcome“ und *Fusobacterium nucleatum* (vor allem

subs.p animalis), *Porphyromonas gingivalis* oder auch unkultivierte orale *Bergeyella spp.* [41], sowie Rheumatoide Arthritis und *Porphyromonas gingivalis* aufgezeigt [41]. Entzündliche Darmerkrankungen werden durch *Fusobacterium nucleatum* und *Campylobacter concisus* (*Enteric invasive*) initiiert bzw. begünstigt. Gehirn-, Lungen, Leber- und Nierenabszesse sowie entzündliche Appendizitis stehen im Zusammenhang mit *Fusobacteria spp.* [41]. Aufgrund der nachweisbaren systemischen Auswirkungen kommensaler Mikroorganismen, welche oral als Opportunisten, jenseits der Mundhöhle jedoch als Pathogene auftreten, spricht man heute auch vom „Mobilen Oralen Mikrobiom“ [41]. Die adäquate Therapie oraler Biofilme gewinnt vor diesem Hintergrund noch mehr an Bedeutung, nämlich nicht nur zur Gesunderhaltung der Mundhöhle, sondern auch zur Minimierung der systemischen Wirkungen oraler Bakterien.

Entstehung und Aufbau des oralen Biofilms

Die Pellicel – mehr als ein conditioning film?

Grundlage der Biofilmbildung auf „non-shedding“-Oberflächen innerhalb der Mundhöhle ist die Adsorption spezifischer Speichelkomponenten an der Grenzfläche zwischen Festkörper und Mundhöhle [56]. Die darauf basierend innerhalb kürzester Zeit gebildete bakterienfreie Schicht aus Proteinen, Glykoproteinen, Lipiden und anderen Makromolekülen des Speichels wird als Pellicel bezeichnet [24, 56]. Die initiale Bioadhäsion zwischen Zahnoberfläche und Speichelkomponenten wird durch elektrostatische, hydrophobe und thermodynamische Wechselwirkungen bestimmt, später dominieren Protein-Protein-Interaktionen den Prozess der Pellicelbildung [56]. Insbesondere Phosphoproteine wie Statherin und Histatin sowie prolinreiche Proteine zeigen eine hohe Affinität zu den Phosphat- und Calcium-Ionen der Zahnoberfläche. Darüber hinaus wurden auch Amylase, Lysozym, Peroxidase, Glycosyltransferasen, Muzine und Glycoproteine bereits nach wenigen Minuten bei der Pellicelbildung nachgewiesen [43, 56]. In aktuellen Untersuchungen zum Proteom der

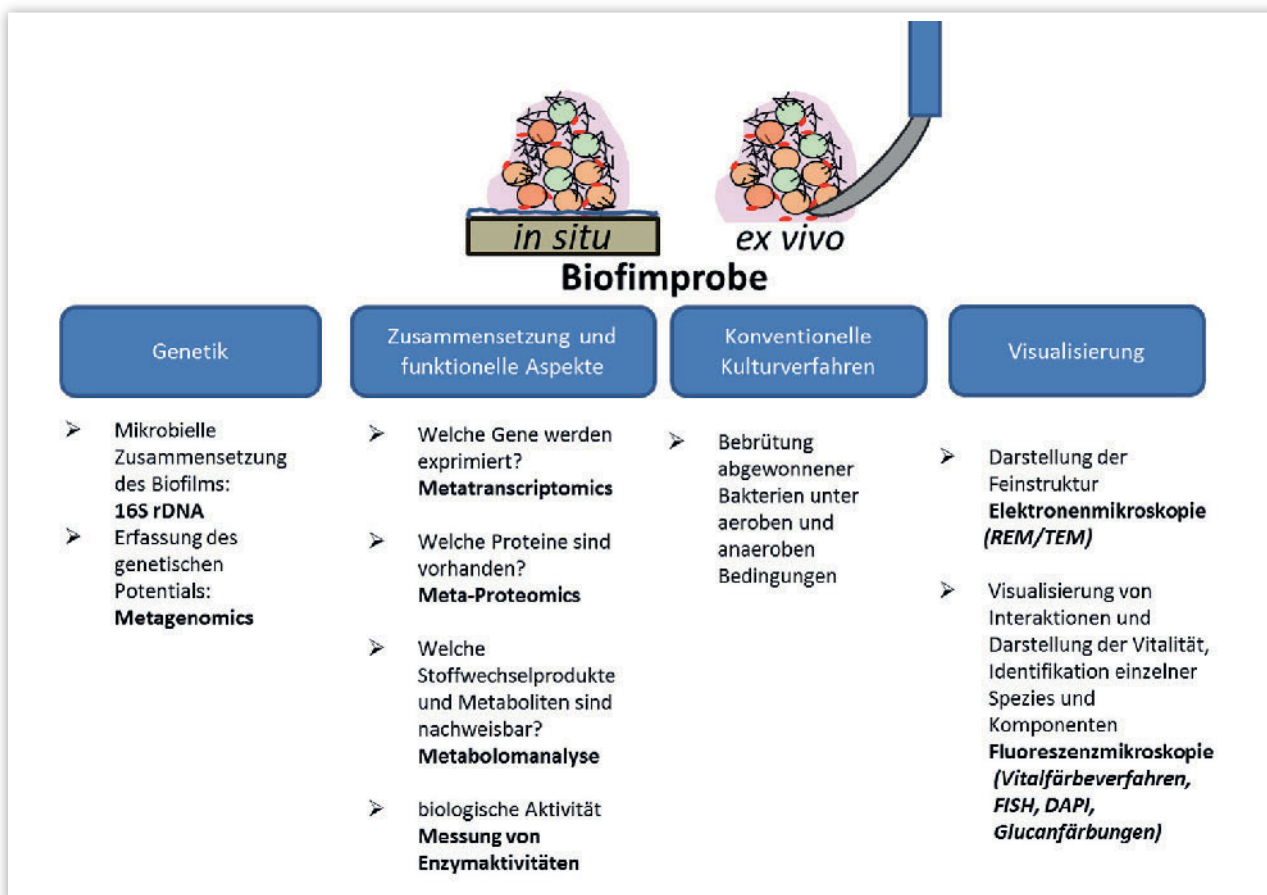


Abbildung 4 Auswahl aktueller Methoden in der Biofilmbiosforschung und ihre Hintergründe, modifiziert nach Nyvad et al. [96]; DNA kann aus den Proben extrahiert werden, zur Erfassung der taxonomischen Zusammensetzung wird eine 16S rDNA-Analyse vorgenommen. Andererseits können die Funktionen der codierenden Gen-Sequenzen evaluiert werden. Massenspektrometrische Verfahren werden angewendet, um die vorhandenen Proteine und Metaboliten (Kohlenhydrate, Lipide) zu bestimmen. Wenn metagenomische Verfahren die Untersuchung des gesamten genetischen Repertoires der Bakterien erlauben, so können mit den anderen Verfahren Rückschlüsse zur generellen Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft gezogen werden. Die tatsächliche biologische Aktivität kann durch die Messung von Enzymaktivitäten erfasst werden. Trotz der rasanten methodischen Entwicklung der vergangenen Jahre sind klassische Kulturverfahren nach wie vor von elementarer Bedeutung ebenso wie elektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Verfahren.

Figure 4 Recent methods in biofilm research and their background (modified according to [96]); DNA can be extracted from the samples, 16S rDNA-analysis is performed to evaluate the taxonomic composition. Furthermore, the function of the encoding gene sequences can be investigated. The proteins and metabolites in the biofilm specimen are analyzed by mass spectrometry techniques (lipids, carbohydrates). If metagenomic approach allows identification of the whole genetic repertoire of the bacteria, other methods allow insights about the active organisms and functions of the respective bacterial community. The actual biologic activity is determined by the measurement of enzyme activities. Despite the rapid development of the methods in the last years, conventional culture based methods are still of essential relevance as well as fluorescence-microscopy and electron microscopic techniques for visualization of the biofilm.

Pellikel konnten bereits nach fünfminütiger intraoraler Bildungszeit der Pellikel bis zu 89 verschiedene Peptide und Proteine identifiziert werden [74]. In transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen manifestiert sich die initiale Pellikel als eine elektronendichte, homogene 10–20 nm messende basale Schicht, welche die gesamte Zahnoberfläche lückenlos bedeckt. An dieser Basisschicht adsorbieren nachfolgend komplexe heterotype Proteinaggregate und mizellartige Strukturen aus Bio-

polymeren des Speichels, was zu einer fortschreitend globulären und heterogenen Schichtbildung der Pellikel führt [51, 54].

Sämtliche physiologischen und pathophysiologischen Prozesse an der Zahnoberfläche werden maßgeblich von der Pellikel beeinflusst [56, 57, 116]. Die Benetzung der gesamten Zahnoberfläche durch einen dünnen Proteinfilm reduziert als Lubrikant die Reibungskräfte sowohl zwischen antagonistischen Zahnflächen als auch zwischen Zahnflä-

chen und Mukosa [14]. Des Weiteren werden durch die Adsorption der Biomoleküle und ihrer Aggregate Oberflächeneigenschaften wie beispielsweise Mikrorauheiten und -porositäten maskiert [48, 127]. In verschiedenen aktuellen *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien wurden protektive Effekte der Pellikel bei De- und Remineralisationsprozessen nachgewiesen [42, 44, 55, 58, 93]. Die retikuläre Pellikelstruktur wirkt dabei als semipermeable Membran [51, 56]. Diese setzt die Diffusion von Protonen herab

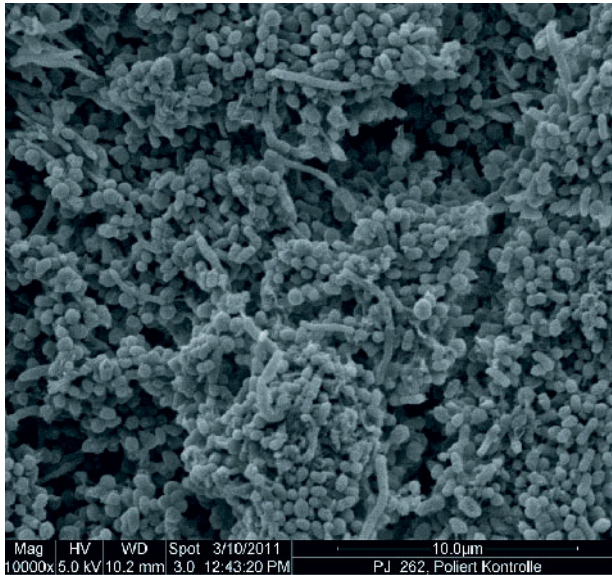


Abbildung 5 Darstellung eines 72 h alten Biofilms auf einer maschinieren Titan-Oberfläche durch Rasterelektronenmikroskopie (REM). Erkennbar sind unterschiedliche Morphotypen wie Kokken, Stäbchen und Filamente, die inhomogen angeordnet sind.

(Abb. 5 u. 7: Dr. A. N. Idlibi)

Figure 5 Visualization of a 72-h-biofilm on a machined titanium surface by SEM. Please note the different morphotypes such as cocci, filaments and rods; the bacteria are arranged inhomogeneously.

(Fig. 5 and 7: Dr. A. N. Idlibi)

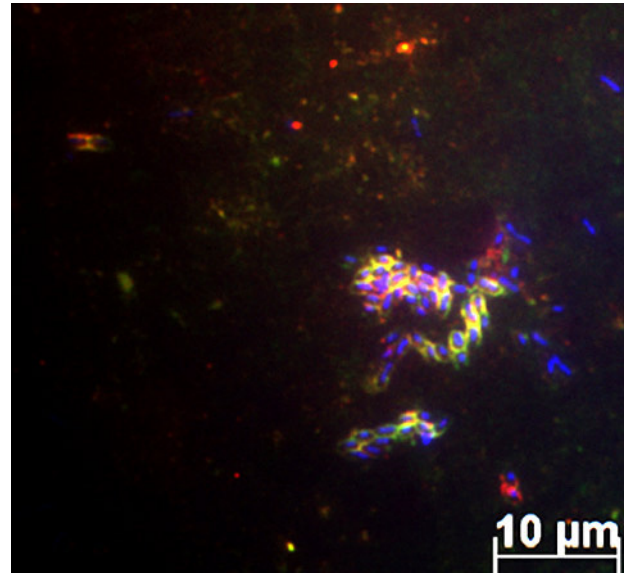


Abbildung 6 Simultane Visualisierung von Bakterien (blau, DAPI), Glucanen (Concanavalin A, grün) und Enzymen (GTF B, rot) zur Untersuchung der Interaktionen während der initialen Phase der bakteriellen Kolonisation. Eine Schmelzprobe wurde für 6 h in der Mundhöhle getragen.

Figure 6 Simultaneous visualization of bacteria (blue, DAPI), glucans (Concanavalin A, green) and enzymes (GTF B, red) for investigation of interactions during the initial phase of bacterial colonization. An enamel slab was exposed to the oral fluids for 6 h.

und die Dissoziation von Kalzium- und Phosphationen aus dem Zahnschmelz wird reduziert [48, 51, 55]. Diese protektive Wirkung ist allerdings limitiert und pH-Wert-abhängig.

Die nachweislich reichhaltige Adsorption von Lysozym und Peroxidase in der Pellikel ist ein wichtiger primärer Schutzmechanismus, um die bakterielle Kolonisation zu erschweren. Die antibakteriellen Enzyme zeigen in immobilisierter Form eine hohe enzymatische Aktivität [43, 47, 49]. Basierend auf fluoreszenzmikroskopischen Verfahren konnte die Akkumulation dieser pellicelgebundenen Enzyme um initial adhärierende Bakterien *in situ* bestätigt werden [65]. Neben ihren protektiven Eigenschaften ist die Pellikel aber auch als „conditioning film“ Voraussetzung für die bakterielle Biofilmbildung.

Bakterielle Kolonisation

Mikroorganismen werden durch den Speichel an die pellicelbedeckte Zahnoberfläche transportiert, wo zunächst reversible Interaktionen mit Pellikelkomponenten bestehen. Bereits nach

wenigen Minuten lassen sich erste, randomisiert verteilte adhärenente Bakterien an der Pellikel nachweisen [56, 83]. Die bakterielle Adhärenz wird irreversibel, wenn bakterielle Adhäsine wie Lipoteichonsäure oder Lektine mit Pellikelkomponenten wie Amylase oder Glucanen interagieren [83]. Auch hydrophobe Interaktionen werden als modulierende Wirkungsmechanismen bei der bakteriellen Kolonisation angesehen [66]. Allgemein anerkannt ist zudem, dass unter den Pellikelkomponenten insbesondere die bakteriellen Glycosyltransferasen B, C und D die mikrobielle Kolonisation beeinflussen [16].

Nach Anheftung erster Bakterienzellen an die Pellikel erfolgt die Adhärenz weiterer Bakterien über Rezeptorgesteuerte Adhäsion und Ko-Adhäsion an die bereits adhärenente Bakterienzellen [81]. Initial findet man charakteristische Pionier-Spezies, dazu zählen insbesondere Streptokokken, wie beispielsweise *S. sanguinis*, *S. oralis* und *S. mitis* [95], aber auch *Actinomyces* (Abb. 1) [29, 75]. Non-Mutans Streptokokken und *Actinomyces* haben hierbei

den Vorteil, über extrazelluläre Glycosidasen zu verfügen. Diese ermöglichen die Gewinnung von Zucker und Aminosucker aus Glycoproteinen des Speichels [81]. Somit können sie auch ohne extrinsische Zuckerimpulse gut in der Mundhöhle überleben [121]. Während der Reifung des Biofilms vermehren sich die Pionier-Spezies, eine Plaquematrix aus extrazellulären Polysacchariden wird gebildet und weitere Bakterien heften sich an [81]. Die Bakterien agieren synergistisch und antagonistisch und gruppieren sich in einer ökologisch für sie günstigen Nische. In pathogenen Clustern oder Inseln, wo beispielsweise kariespathogene Keime überwiegen, kommt es dann zum pH-Wert-Abfall. Opportunistische Pathogene reagieren auf den Selektionsdruck (pH-Wert Abfall) und unterliegen einer Anpassung an die veränderten Umweltbedingungen [68]. Sie zeigen eine gesteigerte Azidogenität und Säuretoleranz. Dies wird möglich, weil Zellwand-Mechanismen, wie etwa eine Erhöhung der Protonen-Impermeabilität der Zellmembranen, oder eine erhöhte Aktivität der Protonen-translozieren-

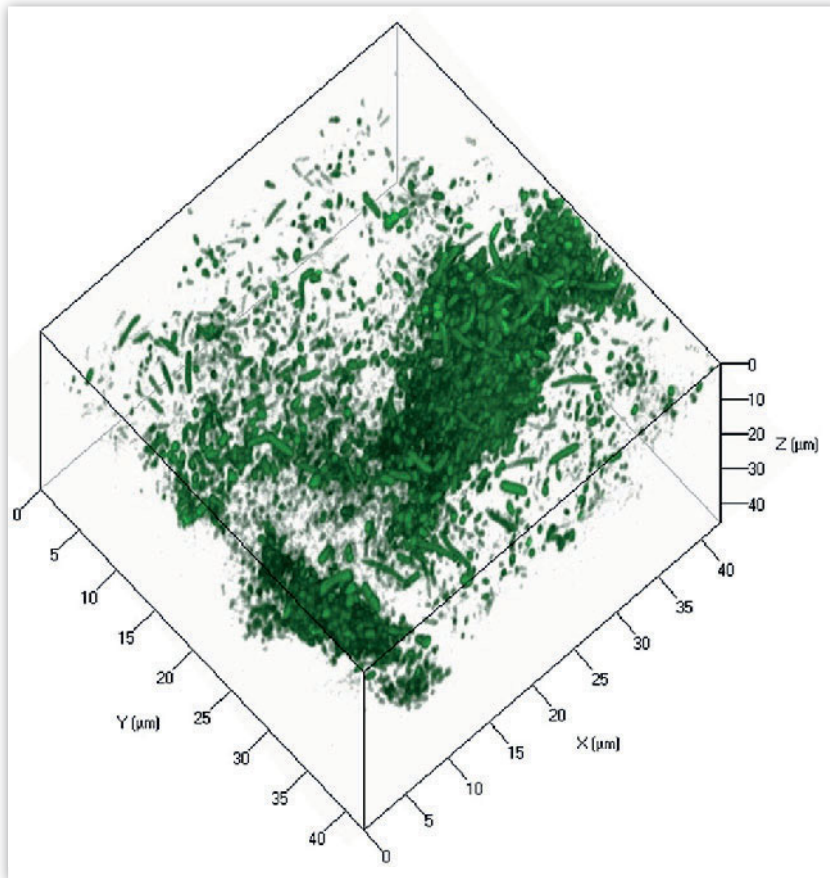


Abbildung 7 Beispiel für die 3-dimensionale Visualisierung eines Biofilms mit einem konfokalen Laser-Scanning Fluoreszenzmikroskop (CLSM). Dargestellt ist ein 72 h alter Biofilm auf mikrostrukturiertem Titan. Die z-Achse verdeutlicht die Dicke des Biofilms.

Figure 7 Example for 3-dimensional visualization of a biofilm by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The image depicts a biofilm on micro structured titanium after 72 h. The z-axis illustrates the thickness of the biofilm.

den ATPasen eingeschaltet werden [109]. Neben der säureinduzierten, phänotypischen Anpassung opportunistischer Pathogene gibt es auch eine säureinduzierte genotypische Selektion in Richtung azidogener und azidurischer Subspezies [108, 117]. Bei länger anhaltendem pH-Wert Abfall wird der Biofilm von kompetitiveren Keimen dominiert.

In kariogenen Biofilmen haben ältere Studien einen hohen Anteil an Mutans Streptokokken nachgewiesen (ca. 30 % der Flora) [78]. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die mikrobielle Diversität auch in kariösen Läsionen groß ist und neben Mutans Streptokokken azidogene und azidurische *Lactobacilli*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, low-pH Non-Mutans Streptokokken und *Actinomyces* eine wichtige Rolle spielen [3, 130]. Die Diversität des

Biofilms nimmt mit zunehmender Reife ab. Biofilme, die von erkrankten Stellen isoliert werden (sogenannte Climax Communities), zeigen im intraindividuellen Vergleich mit gesunden Stellen eine deutliche Einengung der Flora (Abb. 1) [13, 130].

Die Bildung des bakteriellen oralen Biofilms ist – wie in diesem Abschnitt dargestellt – als hochgradig geordneter, sequenzieller Vorgang beschrieben worden [67]. Die bakterielle Biofilmbildung unterliegt allerdings auch ausgeprägten individual-spezifischen Einflüssen [32]. Im interindividuellen Vergleich zeigen sich im Hinblick auf die Bildungsrate, Menge, Zusammensetzung, Diversität und Vitalität des oralen Biofilms große Variationen und Unterschiede [9, 27, 45], sodass der individuell gebildete Biofilm quasi als „Fingerabdruck“ des Wirtes anzusehen ist.

Zusammenleben im oralen Biofilm: Organisation, Zell-Zell-Kommunikation und der Kampf ums Überleben

Das Zusammenleben der Vielfalt an Spezies im oralen Biofilm ist weitgehend unerforscht. Es liegen wenige Erkenntnisse über Synergien und Antagonismen vor, und diese sind vor allem für die bislang im Fokus stehenden Vertreter des oralen Biofilms, Streptokokken und Laktobazillen, beschrieben [70, 115]. Die Vielfalt an Interaktionen, die sich allein zwischen diesen Bakteriengruppen zeigt, lässt erahnen, welch hochkomplexes Ökosystem im oralen Biofilm vorliegt (Abb. 2).

Für *S. sanguinis* und *S. oligofermentans* ist beispielsweise bekannt, dass sie H_2O_2 produzieren und damit das Wachstum von *S. mutans* hemmen können [72]. *S. sanguinis* kann aus Arginin Ammoniak produzieren, *S. oligofermentans* metabolisiert Lactat [72]. Somit haben beide die Möglichkeit, einem pH-Wert Abfall in ihrer Umgebung entgegenzuwirken. Die Metabolisierung von Lactat zu Propion- oder Essigsäure ist auch durch *Veillonella* Spezies möglich [81] (Abb. 2).

S. gordonii kann über eine Protease das Kommunikationssystem von *S. mutans* stören. Diese degradiert das Kommunikationsprotein Competence Stimulating Peptide (CPS). Dadurch kann *S. gordonii* die Virulenz von *S. mutans* hemmen. *S. mutans* wiederum produziert ein potentes Bakteriozin, genannt Mutacin, welches zur Bekämpfung anderer Bakterien dient [70] (Abb. 2).

Für *Lactobacilli* ist festgestellt worden, dass sie die Expression mehrerer *S. mutans* Gene, welche die Saccharose-abhängige Glucanbildung kodieren, hemmen [72]. *Lactobacilli*, die von gesunden Probanden isoliert wurden, können dabei sehr effektiv gegen Mutans Streptokokken vorgehen, wobei als Mechanismen die Sekretion von Bakteriozinen und Metaboliten, wie H_2O_2 , diskutiert werden [115].

Ein weiterer interessanter Aspekt sind sogenannte suizidale altruistische Mechanismen, die für *S. mutans* beschrieben wurden [87]. Über Bakteriozine werden nahe verwandte Streptokokken oder auch Subpopulationen kompetenter Mutans Streptokokken getötet, um die DNA für die überlebenden Zellen verfügbar zu machen. Über derartige Re-

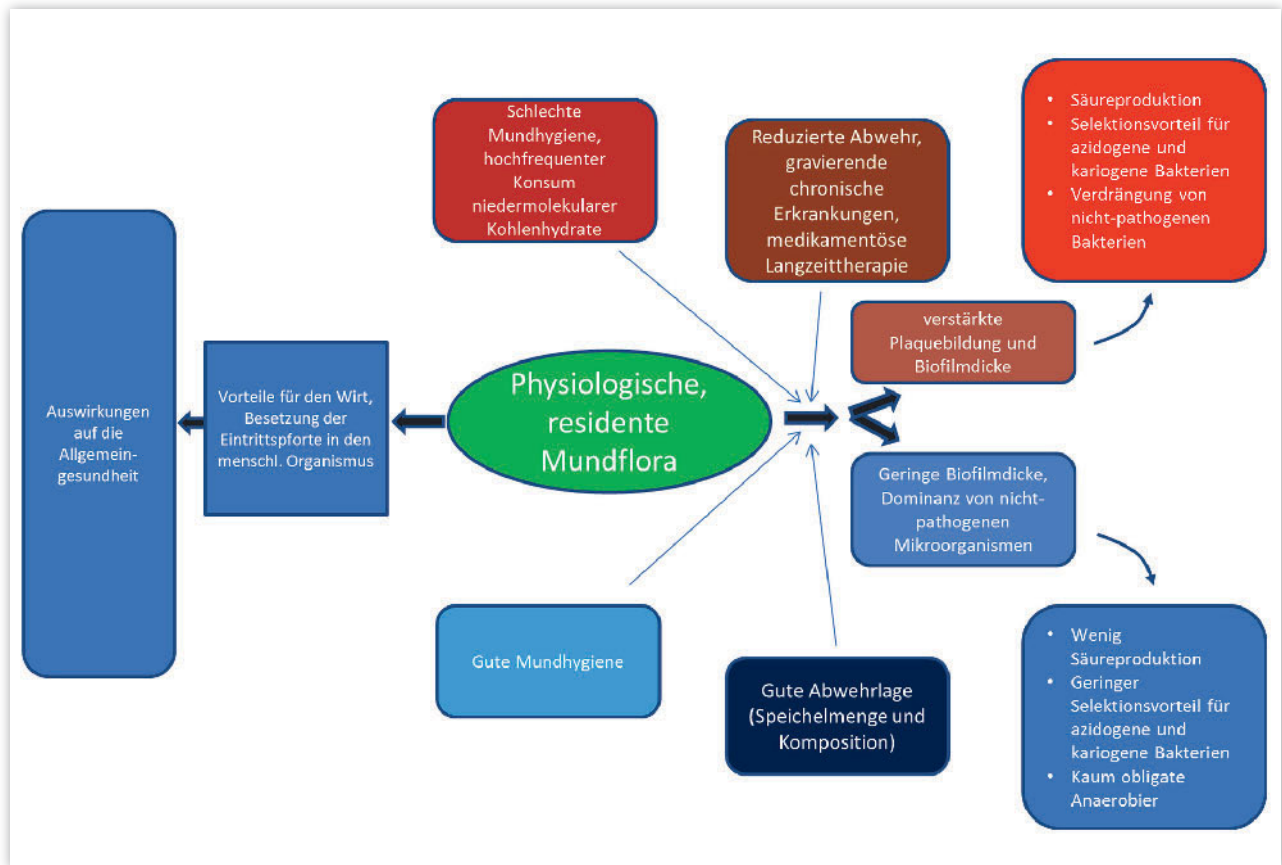


Abbildung 8 Der potenzielle Zusammenhang von Kariesrisiko, Biofilm und Wirtsfaktoren (spezifische und unspezifische Immunabwehr) [86].

Figure 8 The potential correlation of caries risk, biofilm and host (specific and unspecific immune defense) [86]. (Abb. 1–4, 6, 8: D. Wolff et al.)

gulationsmechanismen kann eine selektive Kompetenz einzelner Bakterienpezies innerhalb des Biofilms erworben werden (z.B. Pathogenitätsfaktoren, Antibiotikaresistenz u.a.) [87].

Bakterien können über chemische Stoffe im Biofilm kommunizieren. Mithilfe dieser Kommunikation, genannt Quorum Sensing, können sie u.a. die Zelldichte der Population messen oder aber bestimmte Gene an- und ausschalten [81]. Der Begriff stammt ursprünglich aus dem Römischen Reich und bezeichnete die geringste Anzahl von Mitgliedern des Senates, die für eine Abstimmung notwendig waren. Er wurde in die Biologie übernommen und beschreibt heute das koordinierte gemeinsame Agieren von Einzellern mithilfe von Kommunikationsmolekülen.

Für *S. mutans* ist das Phänomen des Quorum Sensing sehr gut erforscht [117]. Es gibt ein System der Intra-Spezies Kommunikation (Com CDE TCSTS) und ein System der Inter-Spezies Kommunikation (LuxS System) [117]. Unter anderem werden verschiedene Gene,

die für das Überleben im Biofilm essenziell sind, über extrazelluläre Signalmoleküle gesteuert. Die Intra-Spezies Kommunikation über das Competence Stimulating Peptide (CPS) reguliert u.a. die Zelldichte, Genregulation, Expression von Virulenzfaktoren, Bildung von Mikrokolonien und Ausbildung der Biofilm-Struktur [117]. Aufgrund der Schlüsselfunktion dieses Kommunikationssystems ist es auch ein mögliches Ziel für therapeutische Interventionen [119].

Extrazelluläre polymere Substanzen des oralen Biofilms

Die Sekretion einer extrazellulären Polymermatrix ist die essenzielle Grundlage für das Entstehen eines komplexen, mehrschichtigen bakteriellen Biofilms [33]. Charakteristische Matrix-Bestandteile des kariogenen Biofilms sind wasserlösliche und wasserunlösliche Polysaccharide, sog. Glukane, welche primär von *S. mutans* assoziierten Glycosyl-

transferasen aus Saccharose synthetisiert werden können [16]. Glukane sind zum einen wichtige Strukturkomponenten und Nährstoffe des Biofilms, zum anderen agieren sie als wesentliche bakterielle Rezeptoren. Obgleich auch andere Bakterien des Biofilms in der Lage sind, wasserlösliche Glukane zu synthetisieren, gilt die Fähigkeit von *S. mutans*, verschiedene Glycosyltransferasen an der Zelloberfläche zu exprimieren, als sein wesentlicher Virulenzfaktor [16]. Darüber hinaus können Glycosyltransferasen an zahlreiche weitere Mikroorganismen binden und diese zur Glukan-Synthese befähigen [36] (Abb. 3).

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand können 3 Glycosyltransferasen voneinander differenziert werden (Gtf B, C, D), die bereits als immobilisierte Pioniermoleküle der bakteriellen Biofilmbildung in der Pellikel nachgewiesen werden können und dort auch enzymatisch aktiv sind [16, 46]. Gtf D synthetisiert wasserlösliche Glukane, welche als Nahrungsquelle und möglicher Primer für weitere Isoformen im initialen Bio-

film zur Verfügung stehen. Ultrastrukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass insbesondere Gtf D bereits nach wenigen Minuten in der Pellicel nachgewiesen werden kann [46]. Dagegen synthetisiert Gtf C vorrangig und Gtf B ausschließlich wasserunlösliche Glukane, welche für die Kohäsion von Zellen und Mikrokolonien während des Biofilm-Wachstums essenziell sind [133]. Es ist davon auszugehen, dass die zunehmende strukturelle Vernetzung durch hydrolysestabile extrazelluläre Matrixbestandteile den pH-Wert innerhalb des Biofilms wesentlich moduliert. Zu den Mechanismen werden verschiedene Hypothesen formuliert. So wird vermutet, dass neutralisierende ionische Speichelkomponenten nur bedingt in das Netzwerk der extrazellulären Matrix diffundieren können, während apolare Komponenten (Saccharose) ungehindert in tiefere Biofilmschichten eindringen können [68]. *In-vitro*-Untersuchungen eines über mehrere Tage generierten mikrobiellen Biofilms bestätigten die Bildung von Mikrozentren niedrigen pH-Wertes (pH 4,4–5) in tiefen Schichten [133]. Folglich sind dynamische Verschiebungen der lokalen mikrobiellen Populationen zugunsten säurestabiler und säurebildender Mikroorganismen möglich. Dies führt zur Ausdifferenzierung, Vermehrung und Reifung des oralen Biofilms [68] (Abb. 3).

Untersuchungsmethoden des oralen Biofilms

In-situ-Modell

In-vitro-Untersuchungen des oralen Biofilms finden außerhalb des lebenden Organismus statt. Vorteil dieser Verfahren ist, dass Biofilme unter standardisierten Bedingungen kultiviert und in Abhängigkeit von der Fragestellung selektiv modifiziert werden können. Die Komplexität der Mundhöhle, vor allem die Beeinflussung der Biofilmbildung durch kontinuierliche Umbauvorgänge der Plaque aufgrund von Ablösung und Neubildung, physiologischer Fließverhältnisse, individueller Ernährungsgewohnheiten oder immunologischer Reaktionen, können *in vitro* jedoch nicht imitiert werden [48]. Demzufolge basieren moderne analytische Verfah-

ren bevorzugt auf *in situ* generierten Biofilmproben (Abb. 4). Mithilfe individuell hergestellter Tiefziehschienen können Schmelz-, Dentin- oder Werkstoffproben gezielt dem oralen Milieu der Mundhöhle ausgesetzt werden. Dieses Modell hat sich bereits in zahlreichen Untersuchungen zu Bioadhäsionsprozessen bewährt [46, 65].

Ultrastrukturelle Untersuchung des Biofilms

Wichtige Informationen zur physiologischen und modifizierten Morphologie der Pellicel und des Biofilms können mithilfe der Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie gewonnen werden (Abb. 5) [54]. Nur mit diesen hochauflösenden Techniken kann ein grundlegendes Verständnis der Ultrastruktur und der Mikromorphologie des Biofilms erzielt werden. Insbesondere die Transmissionselektronenmikroskopie erfordert dabei eine sehr aufwendige Probenpräparation [53, 54]. Verfahren wie das Goldimmunolabeling zur Detektion ausgewählter Komponenten oder die Fluoreszenzmikroskopie können diese Methoden ergänzen [6, 46].

Fluoreszenzmikroskopische Verfahren

In aktuellen Studien konnten Methoden etabliert werden, um spezifische Bestandteile des *in situ* gebildeten initialen Biofilms fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen [50, 65]. Es ist ein herausragender Vorteil fluoreszenzmikroskopischer Verfahren, dass sie häufig an nativen Präparaten angewandt werden können, ohne den Biofilm von dem Substrat ablösen und gegebenenfalls beschädigen zu müssen. Voraussetzung ist dabei die Adaptation adäquater Färbeprotokolle, um eine möglichst spezifische Detektion der Molekülaggregate zu gewährleisten. Kritisch einzuwenden ist die begrenzte Auflösungsrate des Epifluoreszenzmikroskops als ein limitierender Faktor [50, 65]. Eine Zuordnung von Molekülen in tieferen Biofilmschichten ist kaum möglich. Einzelne Moleküle des Biofilms exponieren potenzielle Bindungsstellen für Fluoreszenzfarbstoffe. So können Glukane über den fluoreszierenden Farbstoff Concanavalin A epifluoreszenzmikroskopisch detektiert werden (Abb. 6) [52]. In Ergänzung dazu ist der Nachweis ver-

schiedener Proteine mithilfe der Immunofluoreszenz möglich [65, 97, 99]. Dabei werden *in situ* gebildete Pellicel- bzw. Biofilmproben mit einem spezifischen primären Antikörper inkubiert. Dieser bindet an Rezeptoren der entsprechenden Strukturmoleküle. Anschließend wird der primäre Antikörper über einen Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert. Generell ermöglicht die große Bandbreite innerhalb des sichtbaren Spektralbereichs die Anwendung unterschiedlicher Farbstoffe. Dadurch können verschiedene Komponenten simultan in einem Präparat dargestellt werden können. Dies gilt auch für den Nachweis von Bakterien im initialen Biofilm (Abb. 6) [52].

DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindol) ist ein klassischer Fluoreszenzfarbstoff für den Nachweis adhärenter Bakterien in einer Probe [89]. Durch Bindung an AT-reiche Regionen der bakteriellen DNA werden sowohl vitale als auch avitale Bakterien unspezifisch markiert. Darüber hinaus werden auch humane Zellen angefärbt.

Eine entscheidende Determinante für die antibakterielle Wirksamkeit von Substanzen ist jedoch auch der Vitalitätszustand der Bakterien [25, 121]. Klassische Kulturverfahren können nur kultivierbare, vitale Bakterien erfassen. Bei Weitem nicht alle Bakterien der Mundhöhle sind kultivierbar [2]. Um vitale von avitalen Bakterien zu unterscheiden, können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe kombiniert werden [25]. Es sind einige Vitalfärbeverfahren bekannt, die sich sowohl durch ihre Wirkmechanismen als auch ihre Haltbarkeit und Intensität unterscheiden [123]. So kann die Fluoreszenz vitaler Zellen beispielsweise aus der Verstoffwechslung eines Farbstoffes (Fluorescein-Diacetat) entstehen [103]. Andere Färbemechanismen beruhen auf der Markierung von DNA und RNA [25, 50] (Abb. 6).

FISH – Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Mithilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gelingt die fluoreszenzbasierte Differenzierung unterschiedlicher bakterieller Spezies im Biofilm [7, 28, 63]. Dabei werden die Mikroorganismen direkt im *in situ* generierten Präparat quantifiziert. Der große Anteil an Streptokokken in frühen Stadien des oralen

Biofilms wurde bereits mehrfach nachgewiesen [28, 62, 75]. Die Markierung der rRNA ausgewählter Bakterienspezies (Streptokokken und Eubakterien) basiert auf der Verwendung spezifischer fluoreszierender Oligonukleotidsonden [5, 45]. Die Fluoreszenz-Farbstoffe lassen sich anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) darstellen und mithilfe weiterer spezieller Bildbearbeitungsprogramme auswerten. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ist im Vergleich zur Epifluoreszenzmikroskopie durch eine erhöhte optische Auflösung gekennzeichnet, da störendes Streulicht durch das Einbringen einer Illuminationslochblende eliminiert wird. Zudem erlaubt sie eine dreidimensionale Darstellung der Biofilmprobe (Abb. 7).

Mikrobiologische Untersuchungen der Karies

Die drei wichtigsten Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren für die Kariogenese sind Säureproduktion, Säuretoleranz und die Fähigkeit, Biofilme auszubilden [104]. Da *S. mutans* diese Eigenschaften alle in sich vereint, war man in der Vergangenheit der Meinung, in ihm den maßgeblich kariesauslösenden Keim gefunden zu haben [79]. Mittlerweile geht man jedoch davon aus, dass mehrere Bakterienspezies an der Kariesinitiation und Progression beteiligt sind [1], da *S. mutans* in kariösen Kavitäten nicht in signifikanter Anzahl nachweisbar war [11], und 10 % der Patienten mit schnell fortschreitender Karies keine detektierbaren Level an *S. mutans* aufwiesen [3]. Darauf folgend wurde eine zunehmende Vielfalt von Keimen in kariösen Läsionen beschrieben, dazu zählen low-pH Non-Mutans Streptokokken, *Rothia*, *Actinomyces*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* u.v.a. [3, 11, 90, 106, 130].

Die Studiendaten lassen zwar wiederkehrende bakterielle Muster erkennen, manche Ergebnisse sind jedoch auch widersprüchlich, wie beispielsweise die Beschreibung von einigen Streptokokkenspezies sowohl als krankheitsassoziiert [37] wie auch im Zusammenhang mit gesunden Verhältnissen [2]. Bevor man mikrobiologische Muster für eine Krankheit beschreiben kann, muss als Referenz die Mikrobiologie beim Gesunden erforscht sein. Schon dies ist eine herausfordernde Aufgabe, betrachtet man die Tatsache, dass es wahrschein-

lich für jedes Individuum einen bakteriellen „Fingerprint“ gibt [73]. Es ist also notwendig, über interindividuelle Unterschiede hinaus typische Muster zu finden. Diese Fragestellung kann auf verschiedenen Ebenen bearbeitet werden. Es ist möglich, in größeren Kohorten von oral Gesunden mikrobielle Profile zu beschreiben. Man kann auch eine Gruppe von Erkrankten mit einer Gruppe von Gesunden vergleichen. Alternativ können zudem Biofilmprouben von gesunden und erkrankten Zahnoberflächen im Mund eines Individuums untersucht werden. Dabei kann im Querschnitts-Design zu einem Zeitpunkt an verschiedenen Stellen oder im longitudinalen Design an der gleichen Stelle im zeitlichen Verlauf eine Untersuchung des Biofilms erfolgen. Die letztere Methode liefert wahrscheinlich die aussagekräftigsten Ergebnisse zur Differenzierung zwischen gesund und krank, ist aber auch mit dem größten Aufwand verbunden. Derartige Studien sind sehr selten, zeigen aber beeindruckende Ergebnisse. So haben Gross et al. [37] bei einer Gruppe von Kleinkindern (12–36 Monate) mikrobielle Proben von gesunden Zähnen und Kariesläsionen verschiedener Stadien entnommen. Diese wurden mikrobiell untersucht und longitudinal weiter beobachtet. In der longitudinalen Beobachtung konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Vielfalt mit dem Voranschreiten der Karies signifikant abnimmt. Die mikrobielle Diversität war bei Probanden, die eine Kariesprogression zeigten, schon auf gesundem Schmelz vergleichsweise geringer [37]. Im Vergleich dazu wiesen Probanden mit arretierter Karies oder gesunden oralen Verhältnissen eine signifikant höhere mikrobielle Diversität auf. Kariöse Proben zeigten auch in dieser Studie eine Dominanz von *S. mutans*, *S. vestibularis/S. salivarius*, *Veillonella atypica/Veillonella dispar/Veillonella parvula*, *S. sobrinus* und *S. parasanguinis* [37]. Bei dem Gros der untersuchten Probanden mit voranschreitenden kariösen Läsionen ließ sich eine Dominanz von *S. mutans* feststellen, allerdings konnten bei einzelnen Individuen mit progredienter Karies auch andere individualspezifische bakterielle Profile („Fingerprints“) identifiziert werden. Es gab ein bakterielles Profil, bei dem *S. sobrinus* dominierte, sowie ein weiteres Profil, bei dem *S. vestibularis/S. salivarius* vorherrschten. Es scheint also,

als ob jede dieser Spezies die Rolle der kariespathogenen Leitkeime einnehmen kann. Die beschriebene Studie ist die erste ihrer Art, die einen Hinweis auf typische bakterielle Muster bei der Kariesentstehung gibt.

Neue Methoden zur Biofilmanalytik und ihre Anwendung in der kariologischen Forschung

Neben den klassischen Kulturmethode werden seit mehreren Jahren weitere Methoden zur oralen Biofilmanalyse verwendet (Abb. 4). Dazu gehören Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), RPAD (Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting) oder Denaturierungsgradientengelelektrophorese (DGGE) [76].

Die Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden u.a. für den Nachweis von einzelnen Bakterien eingesetzt. Später kam die sog. Quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion (RQ-PCR) zum Einsatz. Hochdurchsatzgeräte ermöglichen dabei die Durchführung größerer experimenteller Ansätze (z.B.: Nachweis mehrerer Bakterien bei mehreren Patienten in einem Durchgang) [129, 130]. Durch Fluoreszenzmessungen während der sich wiederholenden PCR-Zyklen können Nachweis und Quantifizierung des PCR Produktes erfolgen [129].

Die sogenannte Checkerboard Hybridisierung wurde für viele Studien im Bereich der oralen Mikrobiologie verwendet. Dahinter verbirgt sich eine DNA-DNA-Hybridisierungsmethode. Das bedeutet, dass DNA-Sonden, die spezifisch für ein bestimmtes Bakterium sind, auf einer Membran aufgebracht sind. Dann wird DNA aus einer klinisch gewonnenen Probe auf den Träger aufgebracht. Liegen Sonde und passende bakterielle DNA im Ansatz vor, so verbinden sie sich. Zur Kenntlichmachung der erfolgreichen Hybridisierung werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Mithilfe der Checkerboard Hybridisierung konnte eine effiziente und weitgehend zuverlässige Analyse oraler Spezies durchgeführt werden [118].

DNA-Mikroarrays funktionieren prinzipiell wie die Checkerboard Hybridisierung. Sie bedienen sich dabei kürzerer Oligonukleotid-Sonden, die auf ein Trägermaterial (spezielle Glasobjektträger) aufgebracht (gespottet) sind. Mikroarrays umfassen dabei allerdings eine

ungleich größere Anzahl von Sonden. Zudem erlauben sie die Untersuchung von z.T. sehr geringen Mengen an Probenmaterial. Die DNA Sonden können spezifisch für den Nachweis von bakteriellen Spezies oder Genen/Genabschnitten gestaltet werden. Mittlerweile gibt es die Möglichkeit, den sogenannten Human Microbe Identification Microarray (HOMIM, <http://mim.forsyth.org/homim.html>) des Forsyth Institute (USA) zu verwenden. Er ist der derzeit umfassendste Mikroarray mit Sonden für 272 bakterielle Spezies. Man kann aufbereitete Proben an das Institut schicken und dort gegen Entgelt analysieren lassen. Vorteilhaft ist die professionelle experimentelle Bearbeitung und bioinformatische Analyse.

Schlussfolgernd lässt sich für die Verfahren der PCR, RQ-PCR, Checkerboard Hybridisierung und des Mikroarray jedoch sagen, dass sie ein zentrales Defizit aufweisen: Mit Primern oder Sonden wird nach bekannten bakteriellen Spezies oder Genabschnitten „gesucht“. Mikroorganismen oder Gensequenzen, für die keine Primer oder Sonden vorliegen, werden nicht detektiert. Insofern sind sie nur bedingt geeignet, um sich einen umfassenden Einblick in die Zusammensetzung oraler Biofilme zu verschaffen.

Umfassende Informationen erhält man demgegenüber über die Analyse der gesamten genetischen Informationen aus Biofilmproben mittels Next Generation Sequencing. Für die Analyse oraler Biofilmproben kamen bislang zwei Sequenzierungsansätze zum Einsatz, DNA Sequenzanalyse des 16S rRNA Gens und Metagenomics [96] (Abb. 4). Bei ersterer wird die DNA des 16S rRNA Gens analysiert. Dieses enthält hochkonservierte und variable Regionen. Es erfolgt eine Präamplifikation mittels PCR und spezifischen Primern, die an den hochkonservierten Abschnitten ansetzen und die Amplifikation der variablen Regionen einleiten. Nach der Klonierung in *E. coli* erfolgt die Klassifikation über eine Sequenzanalyse der variablen Regionen. Kritisch zu erwähnen ist, dass je nach Art der Primer das Ablesen der variablen Regionen und somit die Klassifizierung verschieden ausfallen kann. Außerdem ist aufgrund der großen Ähnlichkeit innerhalb der variablen Regionen bei manchen Genera keine Diskriminierung auf Spezies- oder Subspezieslevel möglich (beschrieben z.B. für *Veillonella* [12]).

Zudem kann keine genetische Information außerhalb des 16S rRNA Gens gewonnen werden. Gegebenenfalls sind damit Informationen über metabolische Pathways nicht zugänglich. Zudem unterliegt die Methode dem sogenannten PCR Bias. Darunter versteht man zum einen auftretende Fehler, die beim Vervielfältigen des Produktes entstehen, oder zum anderen fehlerhafte Häufigkeitsverteilungen der Produkte durch ungleichmäßige Vervielfältigung oder Effizienz bei der Klonierung [4].

Im Fall von Metagenomics wird die sogenannte Gesamtgenom-Shotgun-Sequenzierung verwendet. Hierbei werden lange DNA Stränge per Zufall in kleine Stücke zerlegt und abgelesen [26]. Die Sequenzinformationen aus diesen kurzen Abschnitten werden dann durch das Aufsuchen von sich überlappenden Anteilen mit bioinformatischen Methoden zur Gesamtsequenz zusammengesetzt. Um aus der DNA-Sequenz nun eine biologisch relevante Information ableiten zu können (z.B. über das Vorhandensein von bestimmten Genen), muss anschließend eine bioinformatische DNA-Sequenzanalyse erfolgen.

Viele Studien verwendeten DNA Sequenzanalysen des 16S rRNA Gens [3, 35, 61, 71, 105, 106, 134], weil diese kosteneffizienter und weniger aufwendig sind. Wie oben beschrieben, ist der Informationsgewinn jedoch limitiert. Das Metagenomics-Verfahren liefert hier ein weitaus umfassenderes Bild. So zeigte die erste Next-Generation-Sequencing-Studie aus dem Jahr 2008 von *Keijser et al.* [64], dass die Diversität der oralen Mikroorganismen in Speichel und Plaque deutlich höher ist als bisher angenommen. Lange Zeit wurden *Paster et al.* zitiert, die gezeigt hatten, dass über 700 verschiedene Spezies die Mundhöhle besiedeln [102]. *Keijser et al.* rechneten auf Basis der neuen Methoden jedoch hoch, dass mindestens 19.000 (!) Spezies-Level Phänotypen in der Mundhöhle vorhanden sein könnten.

Ausblick


Moderne Analyseverfahren ermöglichen einen Einblick in die Diversität, genetische Plastizität und in das Ausmaß der Interaktionen innerhalb des Mikrobioms aber auch zwischen Biofilm und Wirt (Abb. 8). Um diese hochkomplexen

Vorgänge verstehen zu können, ist es notwendig, die verschiedenen physiologischen, biologischen und biochemischen Ebenen zu betrachten. *Xu und Gunsolley* [135] beschreiben in ihrer Übersichtsarbeit, dass der Weg von DNA über RNA zu Proteinen und Metaboliten mit verschiedenen „omics“ Methoden wissenschaftlich untersucht werden sollte. So sind neben Metagenomics (DNA) auch Metatranscriptomics (RNA), Metabolomics (Metaboliten) und Metaproteomics (Proteine) zu berücksichtigen [96]. Parallel dazu müssen die Charakteristika des Wirts umfassend evaluiert werden, um die Interaktionen innerhalb der Mundhöhle zu verstehen. Dazu zählen Proteom und Metabolom von Speichel und Pellikel bei gesunden und kranken Probanden, bei kariesfreien Patienten ebenso wie bei Patienten, die eine hohe Kariesaktivität aufweisen, aber auch ein detailliertes Verständnis der wirtseigenen angeborenen und erworbenen Abwehrmechanismen [98, 141]. Neben den modernen Analysemethoden sind jedoch auch konventionelle fluoreszenzmikroskopische, elektronenmikroskopische, mikrobiologische und enzymologische Verfahren zu berücksichtigen, die durch die neuen Analyseverfahren nicht ersetzt, sondern nur ergänzt werden [46, 53, 54, 65, 125] (Abb. 4). Eine besondere Herausforderung stellt die spatio-temporale Darstellung der Biofilmbildung in ihrer dreidimensional räumlichen und zeitlichen Dimension dar. Zudem müssen die sehr umfassenden Informationen, die mit den unterschiedlichen Verfahren generiert werden, in einem systembiologischen Ansatz zusammengeführt, analysiert und interpretiert werden. Dies erfordert die integrative Kombination von zahnmedizinischer, biowissenschaftlicher und bioinformatischer Expertise, die nur in interdisziplinären Forschungsprojekten realisiert werden kann.

Das Ziel zukünftiger wissenschaftlicher Arbeiten sollte es sein, bakterielle und/oder genetische Profile und „Fingerprints“ zu finden, Keystone-Pathogene zu identifizieren und diagnostische Marker zur Krankheitsrisikobestimmung zu erforschen. Wenn der Prozess der Dysbiose im oralen Biofilm im Zusammenspiel zwischen bakteriellen Spezies, Wirt und ökologischen Einflussfaktoren verstanden ist, kann der Entstehung der Karies erfolgreich entgegen ge-

wirkt werden (Abb. 8). Dazu zählen neue diagnostische Strategien, um frühzeitig anhand immunologischer und mikrobiologischer Parameter kariesaktive Individuen zu identifizieren, ebenso wie neue präventive Ansätze für das gezielte Biofilmmanagement. Bis dahin bleibt das mechanische Biofilmmanagement mit optimierter Interdentalraumpflege Eckpfeiler der Kariesprävention.

Danksagung

Die Anfertigung der vorliegenden Übersichtsarbeit erfolgte mit Unterstützung durch die DFG (SFB 1027; HA 2718/11–1/, RU 866/2–1; HA 5192/7–1). 

Interessenkonflikt: Die Autoren erklären, dass kein Interessenkonflikt im Sinne der Richtlinien des International Committee of Medical Journal Editors besteht.

Korrespondenzadressen

PD Dr. Diana Wolff
Poliklinik für Zahnerhaltungskunde
Universitätsklinikum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 400
691200 Heidelberg
Diana.Wolff@med.uni-heidelberg.de

Dr. Anna Kensche,
Prof. Dr. Christian Hannig
Poliklinik für Zahnerhaltung mit Bereich
Kinderzahnheilkunde
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus
Technische Universität Dresden
Fetscherstraße 74, 01307 Dresden
Anna.kensche@uniklinikum-dresden.de
Christian.Hannig@uniklinikum-dresden.de

Prof. Dr. Stefan Rupf,
Prof. Dr. Matthias Hannig
Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie
und Präventive Zahnheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes
Geb. 73, 66421 Homburg/Saar
stefan.rupf@uks.eu
matthias.hannig@uks.eu

Literatur

- Aamdal-Scheie A, Luan WM, Dahlen G, Fejerskov O: Plaque pH and microflora of dental plaque on sound and carious root surfaces. *J Dent Res* 1996;75:1901–1908
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE: Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721–5732
- Aas JA, Griffen AL, Dardis SR et al.: Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1407–1417
- Acinas SG, Sarma-Rupavtarm R, Klepac-Ceraj V, Polz MF: PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:8966–8969
- Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM et al.: The in vivo dynamics of streptococcus spp., actinomyces naeslundii, fusobacterium nucleatum and veillonella spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol* 2007;56: 681–687
- Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M et al.: In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Arch Oral Biol* 2013;58: 1139–1147
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH: Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 1995;59:143–169
- Arumugam M et al.: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174–180
- Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Auschill TM: Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Res* 2004;38:442–447
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI: Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915–1920
- Becker MR, Paster BJ, Leys EJ et al.: Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002;40:1001–1009
- Beighton D, Clark D, Hanakuka B, Gilbert S, Do T: The predominant cultivable veillonella spp. of the tongue of healthy adults identified using rpoB sequencing. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:344–347
- Belstrom D, Fiehn NE, Nielsen CH et al.: Altered bacterial profiles in saliva from adults with caries lesions: a case-cohort study. *Caries Res* 2014;48: 368–375
- Berg ICH, Rutland MW, Arnebrant T: Lubricating properties of the initial salivary pellicle – an AFM study. *Biofouling* 2003;19:365–369
- Bik EM, Long CD, Armitage GC et al.: Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J* 2010;4: 962–974
- Bowen WH, Koo H: Biology of streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011;45:69–86
- Carneiro LG, Venuleo C, Oppenheim FG, Salih E: Proteome data set of human gingival crevicular fluid from healthy periodontium sites by multi-dimensional protein separation and mass spectrometry. *J Periodontol Res* 2012;47:248–262
- Carneiro LG, Nouh H, Salih E: Quantitative gingival crevicular fluid proteome in health and periodontal disease using stable isotope chemistries and mass spectrometry. *J Clin Periodontol* 2014;41:733–747
- Chen PM, Chen YY, Yu SL, Sher S, Lai CH, Chia JS: Role of GlnR in acid-mediated repression of genes encoding proteins involved in glutamine and glutamate metabolism in Streptococcus mutans. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:2478–2486
- Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA et al.: Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol* 2005;43:5753–5759
- Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJ, Relman DA: The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* 2012;336: 1255–1262
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM: Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711–745
- Darveau RP: Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2010;8: 481–490
- Dawes C, Jenkins GN, Tonge CH: The nomenclature of the integuments of

- the enamel surface of teeth. *Br Dent J* 1963;16:66–68
25. Decker EM: The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Lett Appl Microbiol* 2001;33:188–192
26. Di Bella JM, Bao Y, Gloor GB, Burton JP, Reid G: High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J Microbiol Methods* 2013;95:401–414
27. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH et al.: Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2837–2848
28. Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B: In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci* 2007;115: 459–467
29. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Killian M, Nyvad B: *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology* 2009;155:2116–2126
30. Ding T, Schloss PD: Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature* 2014;509:357–360
31. Donlan RM, Costerton JW: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–193
32. Filoche S, Wong L, Sissons CH: Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res* 2010;89:8–18
33. Flemming HC, Wingender J: The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8: 623–633
34. Gallo J, Holinka M, Moucha CS: Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. *Int J Mol Sci* 2014;15: 13849–13880
35. Gomar-Vercher S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM: Relationship of children's salivary microbiota with their caries status: a pyrosequencing study. *Clin Oral Investig* 2014;
36. Gregoire S, Xiao J, Silva BB et al.: Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with streptococcus mutans and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:6357–6367
37. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL: Beyond streptococcus mutans: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One* 2012;7:e47722
38. Group NHW et al.: The NIH human microbiome project. *Genome Res* 2009;19:2317–2323
39. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95–108
40. Han YW: Oral health and adverse pregnancy outcomes – what's next? *J Dent Res* 2011;90:289–293
41. Han YW, Wang X: Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res* 2013;92:485–491
42. Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T: Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Arch Oral Biol* 2005;50:541–552
43. Hannig C, Hannig M, Attin T: Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 2005;113:2–13
44. Hannig C, Becker K, Häusler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M: Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion – an ex vivo pilot study. *Arch Oral Biol* 2007;52:444–449
45. Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A: Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* 2007;52:1048–1056
46. Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B et al.: Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. *Arch Oral Biol* 2008;53:1003–1010
47. Hannig C, Spitzmüller B, Knausenberger S, Hoth-Hannig W, Hellwig E, Hannig M: Detection and activity of peroxidase in the in situ formed enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 2008;53: 849–858
48. Hannig C, Hannig M: The oral cavity – a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 2009;13:123–139
49. Hannig C, Spitzmüller B, Hannig M: Characterisation of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay. *Clin Oral Investig* 2009;13: 15–21
50. Hannig C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A: Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *J Med Microbiol* 2010;59:1–7
51. Hannig C, Wagenschwanz C, Pötschke S et al.: Effect of safflower oil on the protective properties of the in situ formed salivary pellicle. *Caries Res* 2012; 46:496–506
52. Hannig C, Gaeding A, Basche S, Richter G, Helbig R, Hannig M: Effect of conventional mouthrinses on initial bioadhesion to enamel and dentin in situ. *Caries Res* 2013;47:150–161
53. Hannig M: Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci* 1999;107:55–64
54. Hannig M: Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig* 1999;3: 88–95
55. Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y: Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol* 2004;49:903–910
56. Hannig M, Joiner A: The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 2006;19: 29–64
57. Hannig M, Hannig C: Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 2007;29:73–82
58. Hara AT, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT: Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res* 2006;85:612–616
59. Human Microbiome Project C: Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207–214
60. Ismail Y, Mahendran V, Octavia S et al.: Investigation of the enteric pathogenic potential of oral *Campylobacter concisus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2012;7:e38217
61. Jiang W, Ling Z, Lin X et al.: Pyrosequencing analysis of oral microbiota shifting in various caries states in childhood. *Microb Ecol* 2014;67: 962–969
62. Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmüller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C: Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods* 2010;81:166–174
63. Karygianni L, Follo M, Hellwig E et al.: Microscope-based imaging platform for large-scale analysis of oral biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2012;78: 8703–8711
64. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM et al.: Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008;87:1016–1020
65. Kensche A, Basche S, Bowen WH, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C: Fluorescence microscopic visualization of non-cellular components during initial bioadhesion in situ. *Arch Oral Biol* 2013;1271–1281
66. Kensche A, Reich M, Kummerer K, Hannig M, Hannig C: Lipids in preventive dentistry. *Clin Oral Investig* 2013;17:669–685
67. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI: Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000 2006;42:47–79
68. Koo H, Falsetta ML, Klein MI: The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res* 2013;92:1065–1073
69. Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F: Competition and coexistence between streptococcus mutans and streptococcus

- sanguinis in the dental biofilm. *J Bacteriol* 2005;187:7193–7203
70. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC: Streptococcal antagonism in oral biofilms: streptococcus sanguinis and streptococcus gordonii interference with streptococcus mutans. *J Bacteriol* 2008;190:4632–4640
 71. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ: New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003;82:338–344
 72. Kuramitsu HK, Wang BY: The whole is greater than the sum of its parts: dental plaque bacterial interactions can affect the virulence properties of cariogenic Streptococcus mutans. *Am J Dent* 2011;24:153–154
 73. Lax S, Smith DP, Hampton-Marcell J, Owens SM et al.: Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science* 2014;345:1048–1052
 74. Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W et al.: Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *PLoS One* 2013;8:e67919
 75. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW et al.: Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004;97:1311–1318
 76. Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield PW: Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *J Clin Microbiol* 2007;45: 81–87
 77. Loesche WJ: Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res* 1979;58:2404–2412
 78. Loesche WJ, Eklund S, Earnest R, Burt B: Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molars shortly after eruption. *Infect Immun* 1984;46:765–772
 79. Loesche WJ: Role of streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353–380
 80. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS: Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 2003;30:644–654
 81. Marsh P, Martin M, Oral microbiology. 5th ed, Elsevier, Edinburgh 2009, 222 p.
 82. Marsh PD: Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8: 263–271
 83. Marsh PD: Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004;38:204–211
 84. Marsh PD, Devine DA: How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol* 2011;38(Suppl11):28–35
 85. Marsh PD, Moter A, Devine DA: Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol* 2000 2011;55:16–35
 86. Marsh PD: Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J* 2012;212:601–606
 87. Merritt J, Qi F: The mutacins of streptococcus mutans: regulation and ecology. *Mol Oral Microbiol* 2012;27:57–69
 88. Miller WD, The microorganisms of the human mouth 1890, White, S.S. and Co., Philadelphia
 89. Morikawa K, Yanagida M: Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method. *J Biochem* 1981;89:693–696
 90. Munson MA, Banerjee A, Watson TE, Wade WG: Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 2004;42:3023–3029
 91. Mylonakis E, Calderwood SB: Infective endocarditis in adults. *N Engl J Med* 2001;345:1318–1330
 92. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Steneking M: Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res* 2009;19:636–643
 93. Nekrashevych Y, Hannig M, Stosser L: Assessment of enamel erosion and protective effect of salivary pellicle by surface roughness analysis and scanning electron microscopy. *Oral Health Prev Dent* 2004;2:5–11
 94. Nikitkova AE, Haase EM, Scannapieco FA: Taking the starch out of oral biofilm formation: molecular basis and functional significance of salivary alpha-amylase binding to oral streptococci. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79:416–423
 95. Nyvad B, Kilian M: Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 1987;95:369–380
 96. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D: Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res* 2013;47:89–102
 97. Odell ID, Cook D: Immunofluorescence techniques. *J Invest Dermatol* 2013; 133:e4
 98. Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ: Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:22–50
 99. Ørstavik D, Kraus FW: The acquired pellicle: immunofluorescent demonstration of specific proteins. *J Oral Pathol* 1973;2:68–76
 100. Paju S, Scannapieco FA: Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis* 2007;13:508–512
 101. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE: Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770–3783
 102. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE: The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000 2006;42:80–87
 103. Peak E, Chalmers IW, Hoffmann KF: Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e759
 104. Peterson SN, Snesrud E, Schork NJ, Bretz WA: Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. *Int Dent J* 2011;61(Suppl1):11–22
 105. Peterson SN, Snesrud E, Liu J et al.: The dental plaque microbiome in health and disease. *PLoS One* 2013;8:e58487
 106. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ: Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol* 2008;46:2015–2021
 107. Quince C, Lundin EE, Andreasson AN et al.: The impact of Crohn's disease genes on healthy human gut microbiota: a pilot study. *Gut* 2013;62: 952–954
 108. Quivey RG, Kuhnert WL, Hahn K: Genetics of acid adaptation in oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12:301–314
 109. Quivey RG, Jr., Kuhnert WL, Hahn K: Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microb Physiol* 2000;42: 239–274
 110. Raes J, Bork P: Molecular eco-systems biology: towards an understanding of community function. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:693–699
 111. Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R: Strategies for the prevention of microbial biofilm formation on silicone rubber voice prostheses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;81: 358–370
 112. Rogers A, Molecular oral microbiology, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2008
 113. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP: Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4:92
 114. Schultz-Haut S, Bruce MA, Bibby BG: Bacterial factors in nonspecific gingivitis. *J Dent Res* 1954;33:454–458
 115. Simark-Mattsson C, Emilson CG, Hakansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S: Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci* 2007;115:308–314
 116. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE: New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 2012;91:1110–1118
 117. Smith EG, Spatafora GA: Gene regulation in S. mutans: complex control in a complex environment. *J Dent Res* 2012;91:133–141
 118. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE: „Checkerboard“ DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17:788–792
 119. Sullivan R, Santarpia P, Lavender S et al.: Clinical efficacy of a specifically

- targeted antimicrobial peptide mouth rinse: targeted elimination of *Streptococcus mutans* and prevention of demineralization. *Caries Res* 2011;45: 415–428
120. Takahashi N, Yamada T: Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:43–48
121. Takahashi N, Nyvad B: The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 2011;90: 294–303
122. Tanzer JM: Dental caries is a transmissible infectious disease: the Keyes and Fitzgerald revolution. *J Dent Res* 1995; 74:1536–1542
123. Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C: Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Investig* 2013;17: 841–850
124. Theilade E: The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1986;13:905–911
125. Vacca Smith AM, Scott-Anne KM, Whelehan MT, Berkowitz RJ, Feng C, Bowen WH: Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. *Caries Res* 2007;41:445–450
126. van 't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Ligtenberg AJ: Antimicrobial defense systems in saliva. *Monogr Oral Sci* 2014;24:40–51
127. van der Mei HC, White DJ, Atema-Smit J, Geertsema-Doornbusch GI, Busscher HJ: Surface thermodynamic homeostasis of salivary conditioning films through polar-apolar layering. *Clin Oral Investig* 2012;16:109–115
128. Vitkov L, Krautgartner WD, Hannig M, Fuchs K: Fimbria-mediated bacterial adhesion to human oral epithelium. *FEMS Microbiol Lett* 2001;202:25–30
129. Wolff D, Staehle HJ, Wolff B: Amplification of minute amounts of oral bacterial DNA for real-time quantitative PCR analysis. *Caries Res* 2010;44: 498–504
130. Wolff D, Frese C, Maier-Kraus T, Krueger T, Wolff B: Bacterial biofilm composition in caries and caries-free subjects. *Caries Res* 2013;47:69–77
131. Wright CJ, Burns LH, Jack AA et al.: Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol* 2013;28:83–101
132. Wu GD, Chen J, Hoffmann C et al.: Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334:105–108
133. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML et al: The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *Plos Pathogens* 2012; 8:e1002623
134. Xu H, Hao W, Zhou Q et al.: Plaque bacterial microbiome diversity in children younger than 30 months with or without caries prior to eruption of second primary molars. *PLoS One* 2014; 9:e89269
135. Xu P, Gunsolley J: Application of metagenomics in understanding oral health and disease. *Virulence* 2014;5: 424–432
136. Xu X, He J, Xue J et al.: Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol* 2014
137. Yeoh N, Burton JP, Suppiah P, Reid G, Stebbings S: The role of the microbiome in rheumatic diseases. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15:314
138. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS: The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis* 2012;18: 109–120
139. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W: Defining the healthy „core microbiome“ of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 2009; 9:259
140. Zhu WM, Liu W, Wu DQ: Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *J Appl Microbiol* 2000;88:877–886
141. Zimmerman JN, Custodio W, Hatibovic-Kofman S, Lee YH, Xiao Y, Siqueira WL: Proteome and peptidome of human acquired enamel pellicle on deciduous teeth. *Int J Mol Sci* 2013;14: 920–934