

Aus dem Institut für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin
in Zusammenarbeit mit dem
Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Glykanbindungsspezifität von Lektinen
kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Viviane Schüler
geboren in Berlin

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. R. Seemann
2. Prof. Dr. A. M. Schmidt-Westhausen
3. Priv.-Doz. Dr. C. Hannig

Datum der Promotion: 3. September 2010

Berichte aus der Zahnmedizin

Viviane Schüler

**Glykanbindungsspezifität von Lektinen
kariesätiologisch bedeutsamer Bakterien**

Shaker Verlag
Aachen 2010

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Charité - Universitätsmedizin Berlin, Diss., 2010

Copyright Shaker Verlag 2010

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-9376-5

ISSN 0946-3941

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit gewidmet

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat.“*

J. W. von Goethe

1	EINLEITUNG	9
2	LITERATURÜBERSICHT	11
2.1	ÄTIOLOGIE DER KARIES	11
2.1.1	Ätiologische Faktoren der Karies	12
2.1.2	Pellikel- und Plaquebildung	14
2.1.3	Die besondere Bedeutung der Mutans-Streptokokken	18
2.1.4	Adhäsionsmechanismen kariesrelevanter Mikroorganismen	20
2.1.5	Abwehrmechanismen der Mundhöhle	24
2.2	KARIESPRÄVENTION	29
2.2.1	Bisherige Ansätze im Bereich der Kariesprävention	29
2.2.2	Weiterführende Ansätze im Bereich der Kariesprävention	30
2.3	ZIELSETZUNG DER EIGENEN UNTERSUCHUNG	33
3	MATERIAL UND METHODE	35
3.1	GEWINNUNG BIOTINMARKIERTER BAKTERIELLER LEKTINE	36
3.1.1	Bakterielle Kultivierung	38
3.1.2	Biotinylierung der bakteriellen Oberflächenmembranproteine	40
3.1.3	Bakterielle Lyse	41
3.1.4	Filtration zur Lektinengewinnung	41
3.2	BCA-TEST ZUR BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	43
3.3	DEGLYKOSYLIERUNG DER BSA–GLYKOKONJUGATE	45
3.4	BESTIMMUNG DER BINDUNGSSPEZIFITÄT BAKTERIELLER HOMOGENATE MIT HILFE DES KOMPETITIVEN LEKTINBINDUNGS-INHIBITIONSASSAYS	46
3.4.1	ELISA-Testprinzip	46
3.4.2	Experimentelle Durchführung	49
3.4.3	Auswertung der photometrisch ermittelten Daten	53
3.5	SDS-GELELEKTROPHORESE MIT ANSCHLIEßENDER SILBERFÄRBUNG	54
3.5.1	Molekulargewichtsbestimmung der Proben mit Hilfe der SDS-PAGE	54
3.5.2	Vorbereitung der Proben	55

3.5.3	Durchführung der SDS-Gelelektrophorese	56
3.5.4	Detektion der Proteinbanden mittels Silberfärbung	57
3.6	BLOTTING ZUM NACHWEIS SPEZIFISCHER PROTEINE	58
3.6.1	Kontaktblot der zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine	58
3.6.2	Nachweis biotinylierter Proteinstrukturen	60
3.6.3	Nachweis glykosylierter, biotinylierter Proteinstrukturen	61
4	ERGEBNISSE	63
4.1	GEWINNUNG BIOTINYLICHTER OBERFLÄCHENMEMBRANPROTEINE KARIESÄTIOLOGISCH BEDEUTSAMER BAKTERIEN	63
4.1.1	Bakterielle Kultivierung	63
4.1.2	Bakterielle Aufreinigung	64
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER GEWONNENEN BAKTERIELLEN HOMOGENATE	64
4.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	64
4.2.2	Ermittlung der Bindungsspezifitäten der bakteriellen Homogenate mit Hilfe des Lektinbindungs-Inhibitionsassays	66
4.2.3	Darstellung des Gesamtproteins in der Gelelektrophorese	76
4.2.4	Molekulargewichtsbestimmung der im Gel dargestellten Proteine	76
4.3	CHARAKTERISIERUNG SPEZIFISCHER PROTEINE MITTELS KONTAKTBLOT	77
4.3.1	Effektivitätskontrolle	77
4.3.2	Nachweis biotinylierter Proteine	78
4.3.3	Nachweis biotinylierter Proteine mit entsprechender Bindungsspezifität	80
4.3.4	Vergleich der Proteinbanden auf glykosylierter und deglykosylierter Beschichtung	81
4.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	83
5	DISKUSSION	85
5.1	VALIDITÄT DER LABORTECHNISCHEN UNTERSUCHUNGEN	87
5.2	METHODIK DER LABORTECHNISCHEN UNTERSUCHUNGEN	88
5.2.1	Auswahl der zu untersuchenden Bakterienspezies	88
5.2.2	Bakterielle Kultivierung & Isolation der spezifischen Oberflächenmembranproteine	89
5.2.3	Vorversuche zur Bestimmung optimaler Konzentrationen	90
5.2.4	Charakterisierung der Glykanbindungsspezifität bakterieller Lektine	90

5.2.5	Auswirkung unterschiedlicher Gelkonzentrationen	92
5.3	ERGEBNISSE DER LABORTECHNISCHEN UNTERSUCHUNGEN	93
5.3.1	Bedeutung der Deglykosylierung	93
5.3.2	Bedeutung der Bindungsspezifität	95
5.3.3	Darstellung des Gesamtproteins der bakteriellen Homogenate gegenüber den glykanspezifischen, biotinylierten Oberflächenmembranproteinen	96
5.3.4	Vergleich der Bindungsspezifität - <i>S. mutans</i> DSM 20523 vs. DSM 6178	98
5.3.5	Vergleich der Bindungsspezifität - <i>S. mutans</i> vs. <i>S. sobrinus</i>	101
5.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN	104
5.5	PERSPEKTIVEN	105
6	ZUSAMMENFASSUNG	109
7	ABSTRACT	111
8	LITERATURVERZEICHNIS	113
9	ANHANG	127
9.1	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	127
9.2	DANKSAGUNG	129
9.3	CURRICULUM VITAE	130
9.4	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	131

