

Karies och den ekologiska plackhypotesen

AUTOREFERAT Bakterier i biofilmer betar sig inte alls som bakterier som växer fritt i en näringslösning. Genom att studera biofilmer kommer man närmare bakteriernas verklighet och plack är nog den mest studerade biofilmen. Studien visar att människor med bakterier som är mer benägna att utlösa en syratoleransrespons löper större risk att utveckla karies.

Godkänt för publicering 29 februari 2008



Jessica Neilands
biomedicinsk analytiker,
BSc, Odontologiska
fakulteten, Malmö
högskola
E-post: Jessica.Neilands
@mah.se

Mikrobiologisk forskning har till stor del bedrivits genom att man odlat bakterier i näringslösningar och på agarplattor och sedan studerat bakterierna på olika sätt. Detta sätt att odla bakterier överensstämmer inte särskilt bra med hur bakterier växer i verkligheten. I naturen växer bakterier fastsittande på olika typer av ytor (tandemalj, epitel, stenar, plastytor och liknande) i så kallade biofilmer.

Det har visat sig att bakterier i biofilmer inte alls betar sig som bakterier som växer fritt i en näringslösning (så kallade planktoniska bakterier). Biofilmbakterier skiljer sig från planktoniska bakterier genom att de är mer resistent mot antibiotika och biocider, ämnen som kan döda levande organismer. De är mer stresståliga, de växer långsammare och de har ett annorlunda gen- och proteinuttryck.

Sammantaget kan man konstatera att biofilmbakterier har andra egenskaper. På grund av denna kunskap har fokus inom mikrobiologisk forskning det senaste decenniet riktats mot att studera biofilmer. Avsikten är att komma närmare bakteriernas verklighet och plack är nog den mest studerade biofilmen av alla.

DISPUTATION

Den 14 december 2007 försvarade biomedicinsk analytiker Jessica Neilands sin avhandling »Acid tolerance of *Streptococcus mutans* biofilms« vid Odontologiska fakulteten, Malmö högskola. Fakultetsopponent var professor Bob ten Cate, ACTA, Amsterdam, Holland. Handledare har varit professor Gunnel Svensäter vid avdelningen för oral biologi, Odontologiska fakulteten, Malmö högskola.

DEN EKOLOGISKA PLACKHYPOTISEN

De senaste 10 åren har synen på de bakteriella orsakerna till karies ändrats. Från den »specifika plackhypotesen« som bygger på att specifika bakteriearter är orsak till sjukdom har man gått över till den »ekologiska plackhypotesen«.

Den ekologiska plackhypotesen säger att sjukdom uppstår då det blir en obalans i den orala mikrofloran på grund av förändringar i omgivningen. Hypotesen säger också att det inte är närvaro av vissa specifika bakterier som ger upphov till sjukdom utan bakterier med specifika egenskaper. Vilken bakterie som helst som kan uppvisa dessa egenskaper kan ge upphov till sjukdom. Detta innebär att bakterier som under vissa förhållanden förändrar sina egenskaper och uppvisar nya därmed kan ge upphov till sjukdom även om de under andra förhållanden inte skulle uppvisa dessa egenskaper och därmed heller inte ge upphov till sjukdom.

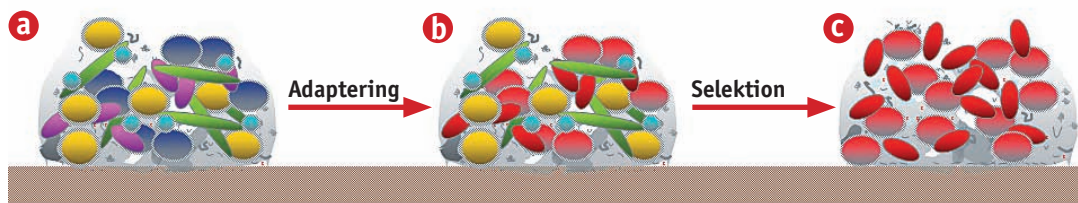
Om miljön i placket är sur under längre perioder leder det till ett urval av bakterier som kan anpassa sig till den sura miljön. Detta resulterar i att en syratolerant mikroflora kommer att dominera i placket. Bakterierna har i sin tur kapacitet att göra det ännu surare i placket under långa perioder. Detta kan leda till demineralisering av emaljen och uppkomst av karies.

Streptococcus mutans anpassar sig till en sur miljö genom att framkalla en syratoleransrespons (acid tolerance response, ATR) vid exponering för en moderat pH-sänkning (pH 5,5) och är därför en utmärkt modellbakterie när det gäller att studera ATR. Bakterier som kan framkalla en ATR har en fördel mot bakterier som inte kan framkalla en ATR och kommer därför att öka i antal. Genom att förhindra en framkallning av ATR skulle man alltså kunna förhindra utvecklingen av karies.

SYFTE

Syftet med avhandlingen var att studera hur *S. mutans* betar sig när den växer i biofilmer och ta reda på mer om syratoleransresponsen i *S. mutans*-biofilmer genom att:

- Karakterisera fenotypiska förändringar i *S. mutans* som sker efter ytkontakt samt över tiden.
- Karakterisera proteinuttrycket hos *S. mutans* som växt i en biofilm jämfört med planktoniska bakterier.



Figur 1 a–c. a) Förändringar i miljön i plackett (till exempel lågt pH) b) leder till att vissa bakterier adapterar, anpassar sig till den nya miljön och ändrar sina egenskaper, sin fenotyp. c) Det sker en selektion i plackett av bakterier med dessa egenskaper och den förändrade mikrofloran kan därmed ge upphov till sjukdom.

- Studera syratoleransresponsen i nybildade och äldre biofilmer.
- Identifiera och undersöka funktionen av syra-stressspecifika proteiner hos *S. mutans* biofilmbakterier.
- Undersöka effekten av fluor på förmågan att framkalla en syratoleransrespons i nybildade biofilmbakterier.

Delarbete I

I den första studien jämfördes proteinuttrycket hos *S. mutans*-bakterier som vuxit i en biofilm på hydroxylapatitstavar under tre dagar med *S. mutans*-bakterier som vuxit i planktonisk form.

Genom att studera bakteriernas proteinuttryck kan man få insikt i hur bakterierna beter sig under olika förhållanden. Resultaten visade stora skillnader i proteinuttryck mellan biofilmbakterier och planktoniska bakterier.

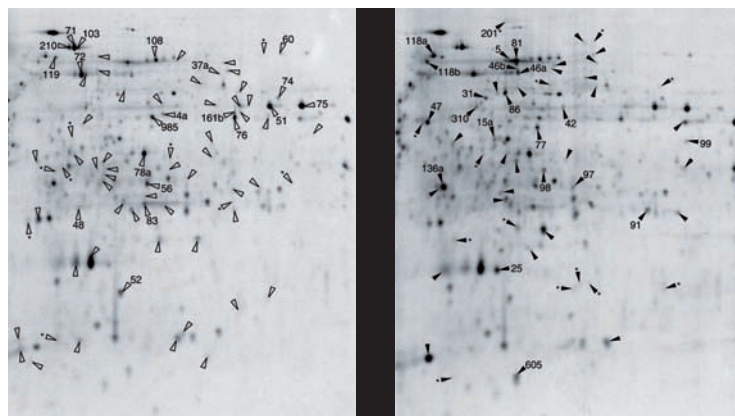
Biofilmbakterierna uttryckte också proteiner som inte uttrycktes av planktoniska bakterier. I biofilmbakterierna hade proteiner involverade i glykolysen ett minskat uttryck medan proteiner involverade i biosyntetiska reaktioner som till exempel proteinsyntes hade ett ökat uttryck. Totalt sett upptog proteiner involverade i kolhydratmetabolism en mindre del av den totala proteinsyntesen i biofilmbakterier än i planktoniska bakterier.

Delarbete II

I delarbete II studerades *S. mutans*-bakterier som vuxit i en biofilm på hydroxylapatitstavar under tre dagar respektive bakterier i planktonisk form. Här jämfördes syratoleransen och förmågan att framkalla en ATR samt förändringar i proteinuttryck vid en pH-förändring från 7,5 till 5,5.

Biofilmbakterierna visade sig vara 1 miljon gånger mer syratoleranta än de planktoniska bakterierna. Vid en pH-chock på 3,0 överlevde 41,5 procent av biofilmbakterierna medan endast 0,00004 procent av de planktoniska bakterierna överlevde. Om bakterierna fick möjlighet att anpassa sig vid pH 5,5 innan syrachocken på pH 3,0 ökade antalet överlevande planktoniska celler signifikant medan ökningen hos biofilmbakterierna var måttlig.

Vid analys av proteinuttrycket visade det sig att biofilmbakterier och planktoniska bakterier



Figur 2. Förändringar i proteinuttryck mellan planktoniska bakterier och biofilmbakterier. Öppna pilar markerar proteiner som har ett minskat uttryck i biofilmbakterier jämfört med planktoniska bakterier och svarta pilar markerar proteiner som har ett ökat uttryck i biofilmer.

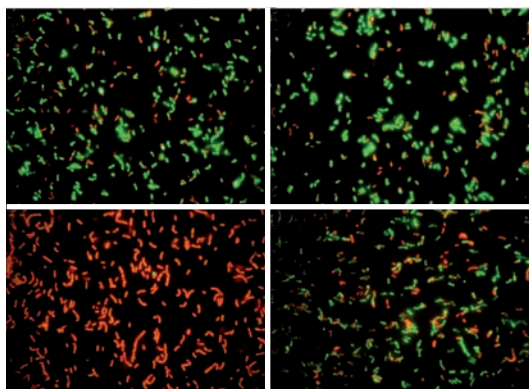
reagerade olika på pH (pH 5,5). I planktoniska celler skedde en stark nedreglering av enzymer som är involverade i kolhydratmetabolism vid en pH-sänkning till 5,5 medan samma enzymer var oförändrade eller uppvisade en måttlig ökning i biofilmbakterierna.

En jämförelse av proteinuttrycket från biofilmbakterierna (pH 7,5) i delarbete I och de planktoniska bakterierna (pH 5,5) i delarbete II visade stora likheter. Det tyder, tillsammans med den höga andelen överlevande bakterier efter syrachock, på att under växt i biofilmen har bakterierna framkallat en ATR som lett till ökad överlevnad.

Delarbete III

Eftersom biofilmbakterier visade sig vara så anorlunda jämfört med planktoniska bakterier var vi intresserade av att studera om dessa förändringar uppstod direkt efter att bakterierna fäst till en yta.

Proteinuttrycket analyserades hos biofilmbakterier två timmar efter ytkontakt och jämfördes med planktoniska bakterier. Redan efter två timmars ytkontakt kunde man se skillnader i proteinuttryck. Biofilmbakterierna hade ett ökat uttryck av glykolytiska proteiner och uttryckte



Figur 3. LIVE/DEAD® BacLight™-färgning av tre timmar gamla *S. mutans*-biofilmer pH 7,5 (a) pH 5,5 (b). c) och d) visar biofilmbakterierna efter syrastress pH 3,5 i 30 minuter. Bakterierna i d hade exponerats för pH 5,5 i två timmar innan syrastress och framkallat en syratoleransrespons. c) exponerades för pH 7,5 i två timmar innan syrastress och hade därför inte anpassat sig. Gröna bakterier har ett intakt cellmembran (levande) medan röda har ett skadat cellmembran (döda).

ett protein som inte uttrycktes i planktoniska bakterier.

Ökningen av glykolytiska enzymer skulle kunna bero på att det sker en ökning i energikrävande, ATP-krävande, biosyntetiska reaktioner då bakterien anpassar sig till livet på en yta. Denna ökning kräver mer ATP och därmed stimuleras glykolysen för att producera mer energi.

Ett antal av de glykolytiska enzymerna har också visat sig vara multifunktionella och finns även på ytan av och inte bara inne i bakterien. Kanske är vissa av de glykolytiska enzymerna också involverade i själva adhesionsprocessen.

Delarbete IV

I det fjärde och sista delarbetet studerades syratoleransen och förmågan att framkalla en ATR

i tre timmar gamla biofilmbakterier av tre olika stammar av *S. mutans*. Även effekten av fluor på ATR studerades. De tre olika stammarna *S. mutans* (UA159, H7 OCH XAB5) visade olika syratolerans i planktonisk form men när de bildat en biofilm var de ungefär lika syratoleranta.

Ytkontakt gjorde *S. mutans* upp till 70 000 gånger mer syratolerant än motsvarande planktoniska bakterier.

Efter exponering för pH 5,5 i två timmar framkallade samtliga tre stammar en ATR som ledde till ökad överlevnad vid pH 3,5. Det fanns dock skillnader mellan de tre olika stammarna i hur stark ATR som framkallades. Vi fann också att tillsats av fluor under anpassningsperioden avbröt anpassningen och ledde till minskad överlevnad vid pH 3,5.

KONKLUSIONER

- Kontakt med en yta leder till förändrat proteinuttryck hos *S. mutans*.
- *S. mutans* biofilmbakterier uttrycker proteiner som inte uttrycks i planktoniska bakterier. Proteinuttrycket i biofilmbakterier förändras över tiden när biofilmen mognar. Äldre biofilmer har ett minskat uttryck av glykolytiska enzymer medan dessa proteiner har ett ökat uttryck i nybildade biofilmer.
- *S. mutans*-bakterier som växer i en biofilm är många gånger mer syratoleranta än planktoniska bakterier och ju äldre biofilmen blir desto mer syratoleranta blir bakterierna i biofilmen.
- Förmågan att framkalla en ATR varierar hos olika *S. mutans* stammar.
- Fluor hämmar framkallningen av en syratoleransrespons i nybildade biofilmer och leder till minskad överlevnad vid lägre pH-värden.
- Olika stammar av *S. mutans* var olika syratoleranta och hade olika förmåga att framkalla en ATR. Detta kan i praktiken innebära att människor med bakterier som är mer benägna att framkalla en ATR löper större risk att utveckla karies.

DELARBETEN

I. Svensäter G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett 2001; 205: 139–46.

II. Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Wrzesinski K, Fey SJ, Mose-Larsen P, Hamilton IR, Svensäter G. Effect of acid shock on protein expression by biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett 2003; 227: 287–93.

III. Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Svensäter G. Protein expression by *Streptococcus mutans* during initial stage of biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 3736–41.

IV. Welin-Neilands J, Svensäter G. Acid Tolerance of Biofilm Cells of *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 563–8.

BARN HAR RÄTT ATT PÅ VARA BARN.
FÖRSVARA DERAS RÄTTIGHETER!

Sätt in ditt bidrag på PG 90 2003-3 eller sms:a BARN till 72 900 så bidrar du med 50 kronor.



Rädda Barnen
Save the Children Sweden



INTRODUCING **CONFIDENCE AT BONE LEVEL**

STRAUMANN® BONE LEVEL IMPLANT



Also featuring
the unique
SLActive surface!

- **Bone Control Design™**

Optimize crestal bone preservation by adhering to biological principles

- **Consistent Emergence Profiles™**

Experience simplified soft tissue management from start to finish

- **CrossFit™ Connection**

Feel the fit of the self-guiding connection



www.straumann.com

COMMITTED TO
SIMPLY DOING MORE
FOR DENTAL PROFESSIONALS