

Serie: Proefschriften 25 jaar na dato

Effect van speeksel op de kolonisatie van mondbacteriën

In het onderzoek, dat aan de basis lag van het proefschrift 'Het effect van speeksel op de kolonisatie van mondbacteriën' uit 1992, werd aggregatie of klontering van mondbacteriën door speeksel onderzocht. Dit voorkomt kolonisatie van bacteriën in de mond. Er bestaan grote individuele verschillen in aggregatie-activiteit van speeksel, die mede worden bepaald door de bloedgroep van de donor. Bloedgroepantigenen komen, behalve op rode bloedcellen, ook voor op speekseliwitten. Dit geldt echter niet voor iedereen: alleen bij zogenoemde secretors komen deze bloedgroepantigenen op speekseliwitten voor. Non-secretors aggregeren bacteriën slechter dan secretors. In later onderzoek werden non-secretors geassocieerd met een verhoogd cariërisico. In vervolgonderzoek werd gevonden dat het complementsysteem, een afweersysteem in bloed, werd geactiveerd door speeksel van secretors, maar niet van non-secretors. Zo blijkt de afweer in de mond te worden beïnvloed door de bloedgroep en secretorstatus, maar op een andere manier dan aanvankelijk werd gedacht.

Ligtenberg AJM. Serie: Proefschriften 25 jaar na dato. Effect van speeksel op de kolonisatie van mondbacteriën

Ned Tijdschr Tandheelkd 2017; 124: 381-385

doi: <https://doi.org/10.5177/ntvt.2017.07/08.16206>

Inleiding

De mond is na de darmen het lichaamscompartiment met de hoogste concentraties bacteriën. Eén milliliter speeksel bevat circa 100 miljoen bacteriën en met een bacteriepopulatie (microbioom) van minimaal 600 verschillende soorten is ook de variatie enorm groot. Speeksel speelt een belangrijke rol bij de regulatie van dit microbioom (Zaura et al, 2009). Dit wordt duidelijk wanneer er onvoldoende speeksel wordt gemaakt, zoals kan optreden na radiotherapie, auto-immuunziekten of medicijngebruik. Bij patiënten met een tekort aan speeksel nemen de aantallen *Candida*'s en cariogene soorten, zoals lactobacillen en *Streptococcus mutans* toe. Een gevolg hiervan is toename van *Candida*-infecties en cariës (Ligtenberg en Almstahl, 2016). Soorten als *Streptococcus sanguinis*, die kenmerkend zijn voor een gezonde mond, vertonen een afname bij xerostomiepatiënten. Blijkbaar is de belangrijkste rol van speeksel het beheersen en reguleren van een gezond microbioom en niet het bestrijden van schimmels en bacillen. In het proefschrift 'Het effect van speeksel op de kolonisatie van mondbacteriën' werden 2 belangrijke facetten van speeksel bestudeerd: speeksel als voedingsbron voor orale micro-organismen en aggregatie van bacteriën door speeksel (Ligtenberg, 1992). Bacteriën worden door speekselcomponenten geaggregeerd of geklonterd, wat de aanhechting op het tandoppervlak remt.

Leerdoelen

Na het lezen van dit artikel heeft u inzicht in:

- de interactie tussen speekselcomponenten en de aggregatie van orale bacteriën;
- de betekenis die dit heeft in de afweer in het algemeen door remming van de kolonisatie van bacteriën en in het bijzonder door de invloed op afweer in bloed.

Speeksel als voedingsbron

In een gezonde mond is speeksel de belangrijkste voedingsstof voor micro-organismen. Door groei op speeksel ontwikkelt zich een gezond en soortenrijk microbioom. Wanneer tandplaque, dat een groot deel van het orale microbioom bevat, in een laboratorium wordt gekweekt, treedt zeer snel een verschroming van het aantal soorten op. Meestal zal de soort die het snelst groeit en het best aan de omstandigheden is aangepast, gaan domineren.

De reden dat in de mond zo veel micro-organismen naast elkaar kunnen bestaan, ligt in de complexiteit van het substraat. Wanneer tandplaque wordt gekweekt op speeksel worden vooral koolhydraten geconsumeerd (De Jong en Van der Hoeven, 1987). De belangrijkste koolhydraatbron in de mond wordt gevormd door de koolhydraatketens op het mucine MUC5B. MUC5B is een groot molecuul dat verantwoordelijk is voor de viscositeit van

Wat weten we?

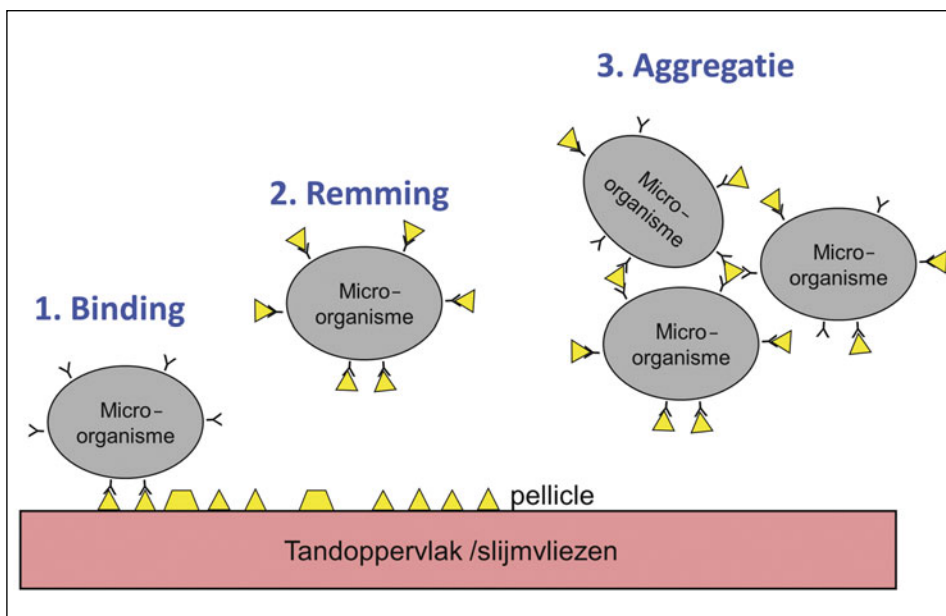
Speeksel is de belangrijkste voedingsstof voor micro-organismen in de mond en bevordert het ontstaan van een gezond en soortenrijk microbioom. Anderzijds remmen speekselcomponenten bacteriële kolonisatie. Remming is sterker bij aanwezigheid van bloedgroepantigenen in speeksel, bij zogenaamde secretors, dan bij afwezigheid, bij zogenaamde non-secretors.

Wat is nieuw?

Speeksel heeft invloed op de afweer in bloed. Speekselcomponenten zijn in staat om het complementsysteem, een afweersysteem in het bloed, te activeren. Activering van het complementsysteem is sterker bij secretors van bloedgroepantigenen dan bij non-secretors.

Praktijktoepassing

Op basis van de speekselsamenstelling kan mogelijk een risicoprofiel voor mondinfecties worden opgesteld. Bij het opstellen van zo'n risicoprofiel dient ook de interactie met bloed te worden betrokken.



Afb. 1. Effect van speeksel op de kolonisatie van micro-organismen. Speekseiwitten vormen een pellicle (1) op het tandoppervlak en de orale mucosa, waar micro-organismen selectief aan kunnen binden. Dezelfde eiwitten in oplossing kunnen ook aan micro-organismen binden (2) en zo de binding aan het tandoppervlak voorkomen. Wanneer een speeksel eiwit meerdere bindingsplaatsen heeft voor micro-organismen, kunnen die worden geaggregeerd (3).

speeksel. Het bestaat uit een eiwitketen waaraan lange, vertakte koolhydraatketens vastzitten die een enorme variatie vertonen. De afbraak van deze koolhydraatketens vereist een groot aantal verschillende enzymen, die 1 micro-organisme nooit allemaal bezit. Daarom werken bacteriën samen bij de afbraak van de koolhydraatketens en zijn de bacteriën dus van elkaar afhankelijk. In het promotieonderzoek werd onderzocht of er een relatie bestaat tussen de binding van speekselcomponenten en groei op speeksel. Om een suikerresidu effectief van een mucinemolecuul af te splitsen, moet dat molecuul worden gebonden door een bacterie. Wanneer een molecuul meerdere bindingsplaatsen voor een bacterie heeft, worden de bacteriën geaggregeerd. Daarom werd gekeken of er een relatie bestaat tussen aggregatie en groei op speeksel. Tandplaque van 1 persoon werd gekweekt op speeksel uit verschillende speekselklieren van diezelfde persoon. Enkele streptokokken werden uit het speeksel geïsoleerd en met behulp van aggregatie getest op binding van speekselcomponenten van die persoon. *Streptococcus oralis* NY582, die was geselecteerd door groei op parotisspeeksel dat geen mucinen bevat, werd niet geaggregeerd door speeksel uit de mukeuze speekselklieren. *Streptococcus oralis* NY585 en NY586, die waren geselecteerd door groei op mukeus speeksel, werden wel geaggregeerd door mukeus speeksel. Uit deze resultaten bleek dat bacteriën speekseiwitten moesten kunnen binden om voedingsstoffen te verwerven.

Een andere manier om voedingsstoffen te verwerven werd gevonden voor *Streptococcus gordonii*. Dit is een van de eerste kolonistoren van een schoon tandoppervlak. In het promotieonderzoek werd aangetoond dat *Streptococcus gordonii* in staat is amylase te binden uit speeksel. Amylase is een enzym dat zetmeel afbreekt en werd daarom alleen belangrijk geacht in de spijsvertering. Binding van amylase

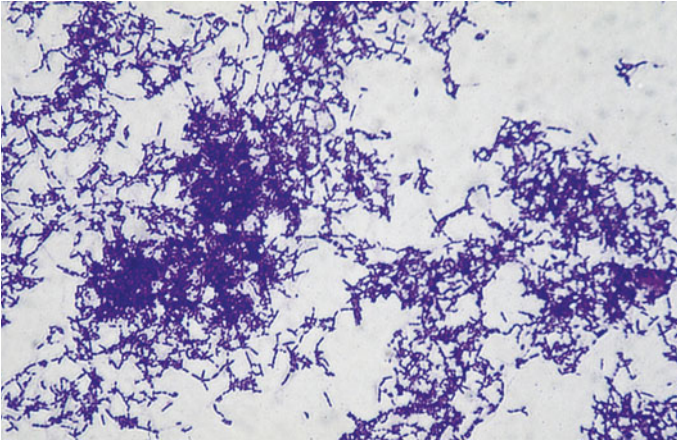
aan bacteriën was een aanwijzing dat amylase ook een rol kan spelen bij de afweer. Later onderzoek van Schenkels et al (1995) liet zien dat amylase aanwezig is in lichaamsvloeistoffen die niet betrokken zijn bij de spijsvertering, zoals tranen, neusslijm en zweet, hetgeen deze hypothese leek te bevestigen. Een rol voor amylase in de immunoregulatie is tot nog toe niet gevonden. Anderzijds bleek dat binding van amylase voor de bacterie gunstig zou kunnen zijn. Door *Streptococcus gordonii* gebonden amylase bleek nog steeds enzymatische actief te zijn. De bacterie profiteert hiervan door zetmeel af te breken en de vrijkomende suiker te gebruiken als voedingsbron. Zo lijken amylasebindende bacteriën dus in het voordeel te zijn bij het

verwerven van voedingsstoffen. Een aanwijzing hiervoor is dat amylasebindende bacteriën alleen voorkomen in diersoorten die amylase produceren (Scannapieco et al, 1994).

Binding en aggregatie van speekseiwitten

Naast groei is binding van bacteriën aan een oppervlak een belangrijke voorwaarde om te kunnen koloniseren (afb. 1). Bacteriën die niet gebonden zijn aan een oppervlak worden weggespoeld en doorgeslikt. In de mond zijn verschillende oppervlakken aanwezig, zoals het tandoppervlak, de tong en de gingiva. De microflora op deze oppervlakken verschilt van elkaar, wat aantoont dat binding een bepalende factor is in de kolonisatie van micro-organismen. Speeksel vormt op het tandoppervlak en de mucosa een pellicle, een laagje speekseiwitten dat zeer sterk is gebonden. Deze eiwitten vormen bindingsplaatsen voor een selectie van bacteriën. Bacteriën die niet in staat zijn de pellicle-eiwitten te herkennen, worden dus doorgeslikt. Anderzijds hechten bacteriën aan dezelfde eiwitten in oplossing in speeksel, waardoor deze eiwitten de binding aan het tandoppervlak of de mucosa voorkomen en kolonisatie wordt beperkt. Omdat veel eiwitten meerdere bindingsplaatsen voor bacteriën hebben, zijn ze in staat deze bacteriën te laten klonteren of aggregeren. Personen met speeksel dat *Streptococcus mutans* sterk geaggregeerd, hadden minder *Streptococcus mutans* in de mond (Emilson et al, 1989). Aggregatie werd daarom gebruikt als een methode om de binding van eiwitten aan bacteriën te bestuderen (afb. 2).

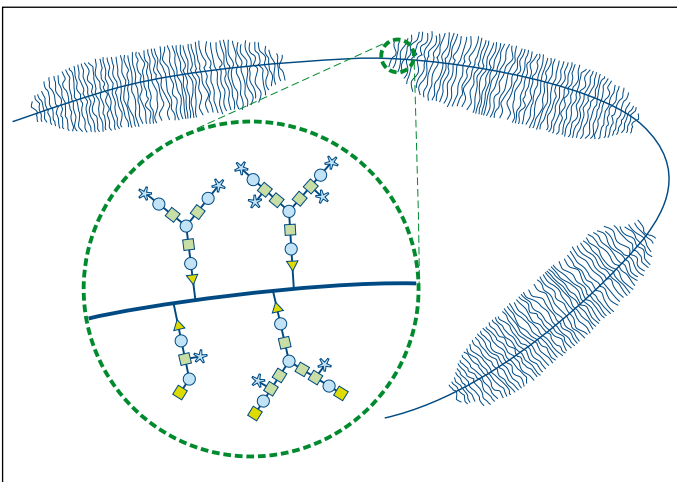
In het promotieonderzoek werd de invloed van speeksel op de aanhechting en aggregatie van *Streptococcus gordonii* bestudeerd. Destijds was het algemene idee dat bacteriën koolhydraatstructuren herkenden op de celmembraan of het tandoppervlak. De celmembraan bestaat uit glycolipiden en wordt in feite bedekt met een laag kool-



Afb. 2. Aggregatie van *Streptococcus gordonii* door speeksel.

hydraten. Het is dus logisch dat bacteriën deze gebruiken om te kunnen binden aan een cel. Op het tandoppervlak is suiker aanwezig in de vorm van het mucine MUC5B. Dat is een eiwit met aan de eiwitketen lange vertakte suikerketens die veel water vasthouden (afb. 3). De suikerketens leken ook logische kandidaten om *Streptococcus gordonii* te binden. Verrassend genoeg gebeurde dat niet. Ook in later onderzoek bleken opvallend weinig bacteriën aan MUC5B te binden (Veerman et al, 1995). Dit kon worden verklaard door de grote variatie van de suikerketens, zoals reeds besproken bij de groei op MUC5B. De binding tussen een suiker en bacterie-eiwit is niet sterk, waardoor er meerdere bindingen nodig zijn om de hechting van een bacterie op het tandoppervlak te stabiliseren. Doordat de suikerketens van MUC5B zo heterogeen zijn, zijn er nooit genoeg suikerketens van hetzelfde type beschikbaar om de hechting te stabiliseren. *Streptococcus gordonii* bond wel aan MUC7, een ander type mucine dat veel minder in de pellicle aanwezig is. Dit eiwit is kleiner dan MUC5B en de suikerketens zijn veel minder heterogeen, waardoor binding van *Streptococcus gordonii* veel stabiel is.

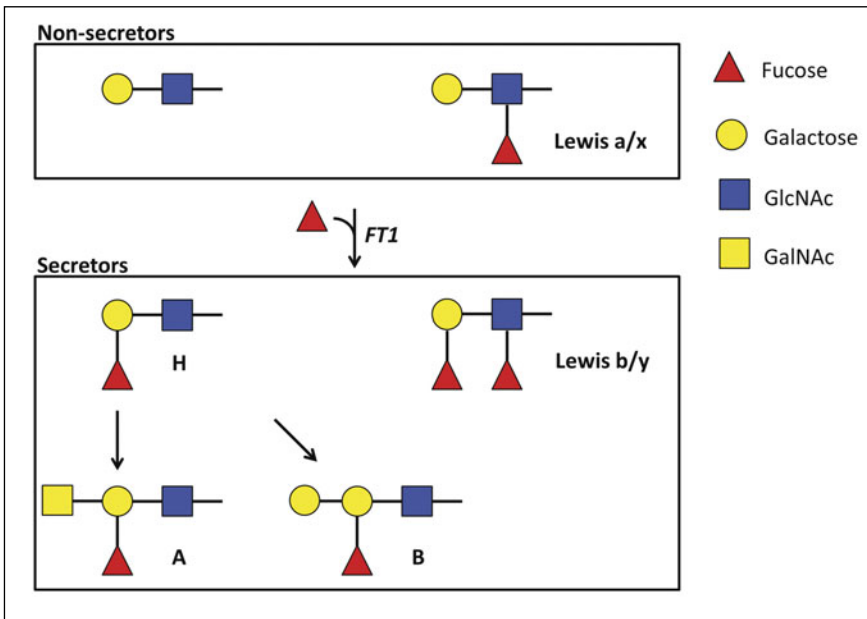
Verschillen in aggregatie duiden op verschillen in ge-



Afb. 3. Structuur van MUC5B. MUC5B bestaat uit eiwitketens die met elkaar een netwerk vormen. Aan de eiwitketens zijn talrijke vertakte koolhydraatketens verbonden die water vasthouden, waardoor speeksel zijn slijmerige gelachtige structuur heeft. Deze koolhydraatketens zijn zeer divers, waardoor micro-organismen niet in staat zijn een multivalente binding aan te gaan.

voeligheid voor bijvoorbeeld cariës; reden om te kijken naar individuele verschillen in aggregatieactiviteit voor verschillende bacteriën. De koolhydraatketens op speeksel-eiwitten zijn betrokken bij aggregatie. Deze koolhydraatketens verschillen sterk per individu en zijn onder andere afhankelijk van de ABO-bloedgroep van de speekseldonor (Oemrawsingh, 1970). ABO-bloedgroepantigenen zijn koolhydraatketens die behalve op rode bloedcellen ook aanwezig zijn op eiwitten in speeksel en andere lichaamsvloeistoffen. Dit is echter alleen het geval voor zogenoemde 'secretors'. 'Non-secretors' hebben geen ABO-bloedgroepantigenen op hun speeksel-eiwitten. Een ander verschil tussen secretors en non-secretors is het voorkomen van een ander bloedgroepstype, de Lewis-antigenen (afb. 4). Non-secretors bezitten Lewis a- en Lewis x-antigenen. Bij secretors kunnen deze antigenen worden omgezet in Lewis b- en Lewis y-antigenen. Er werd in het promotieonderzoek gekeken of verschillen in aggregatie afhankelijk waren van de bloedgroep of secretorstatus van de donor. Speeksel van verschillende donoren vertoonde grote variatie in aggregatieactiviteit die mede werd bepaald door de bloedgroep van een donor. *Streptococcus gordonii* werd beter geaggregeerd door speeksel van bloedgroep B, terwijl *Streptococcus rattus* beter werd geaggregeerd door speeksel van bloedgroep A. Bloedgroepantigenen zijn in de mond aanwezig op MUC5B. Non-secretors vertoonden meestal zwakkere aggregatie dan secretors van dezelfde bloedgroep (intermezzo 1).

Destijds kon niet worden verklaard welke component in speeksel de bacteriën aggregeerde. MUC5B bezit wel bloedgroepantigenen, maar bindt niet aan bacteriën. MUC7 bindt wel goed aan bacteriën, maar heeft geen bloedgroepantigenen. In vervolgonderzoek werd een andere component geïsoleerd, speekselagglutinine, die zowel bloedgroepantigenen heeft als aan bacteriën bindt. Van speekselagglutinine werd oorspronkelijk gedacht dat het alleen een belangrijke aggregerende component van *Streptococcus mutans* was (Ericson en Rundegren, 1983). In vervolgonderzoek bleek speekselagglutinine een groot aantal andere bacteriën te aggregeren. Net zoals veel andere speeksel-eiwitten komt speekselagglutinine ook voor in andere lichaamsvloeistoffen, zoals longslim, tranen of vaginaal slijm (Ligtenberg et al, 2001). Het is daar bekend onder de naam gp340. Het eiwit bindt aan veel verschillende bacteriën en virussen, onder andere aan het griepvirus en HIV. Het speelt op die manier een belangrijke rol bij de specifieke afweer. In vervolgonderzoek werd het speekselagglutininegedeelte geïdentificeerd dat aan bacteriën kon binden. Verrassend genoeg bleek het bacteriebindende gedeelte niet uit koolhydraten te bestaan, maar op het eiwitgedeelte van speekselagglutinine te liggen (Bikker et al, 2002). Het was een stukje eiwit van 11 aminozuren en kwam meerdere keren voor op speekselagglutinine, zodat een stevige multivalente binding aan bacteriën kon ontstaan. Koolhydraten op speekselagglutinine spelen wel een rol bij de binding van het griepvirus en *Streptococcus mutans*. Personen met een verhoogd cariërisico hadden



Afb. 4. Synthese en structuur van bloedgroep en Lewis-antigenen. Deze antigenen worden gesynthetiseerd door enzymatische koppeling van verschillende suikers aan een basisketen. Non-secretors missen het enzym fucosyltransferase (FT1) waardoor zij geen fucose kunnen koppelen aan een galactose. Hierdoor zijn zij niet in staat het H-antigeen (bloedgroep 0) of het Lewis b/y-antigeen te synthetiseren. Omdat het H-antigeen het uitgangspunt is voor de synthese van het bloedgroep A- of B-antigeen, worden deze ook niet gesynthetiseerd. Synthese van ABO-antigenen op rode bloedcellen gebeurt op een andere manier en staat dus los van het voorkomen van deze antigenen in speeksel.

een speekselagglutininevariant die meer voorkwam bij non-secretors (Eriksson et al, 2007).

Recentelijk is een nieuw effect van bloedgroepen op de

Intermezzo 1. Het effect van bloedgroepen op de kolonisatie van bacteriën

Een belangrijk voorbeeld van het effect van bloedgroepen op de kolonisatie van bacteriën werd buiten de tandheelkunde gevonden voor maagzweren. Lange tijd werd aangenomen dat maagzweren een gevolg zijn van genetische aanleg in combinatie met omgevingsfactoren zoals roken, alcohol en stress. Therapie bestond uit maagzuurremmers en het vermijden van prikkels. Twee Australische onderzoekers, Marshall en Warren, zagen met een simpele microscoop een bacterie in maagzweren, *Helicobacter pylori*. Deze bevinding stuitte aanvankelijk op ongeloof, omdat werd aangenomen dat geen enkele bacterie in het maagzuur zou kunnen overleven. Marshall en Warren slaagden erin om de bacterie buiten de maag te kweken. Een sluitend bewijs dat maagzweren door *Helicobacter pylori* worden veroorzaakt werd door Barry Marshall geleverd, die zelf een *Helicobacter pylori*-kweek inslikte en prompt een maagzweer ontwikkelde. Gelukkig kon hij zichzelf genezen met een antibioticumkuur. Lang voor de ontdekking van de bacterie was reeds bekend dat personen met bloedgroep 0 gevoeliger zijn voor maagzweren dan personen van andere bloedgroepen. In de jaren 1990 werd gevonden dat *Helicobacter pylori* kan binden aan het Lewis b-antigeen, wat bij personen met bloedgroep 0 meer voorkomt dan bij personen met bloedgroep A, B of AB (Boren en Falk, 1994).

afweer in de mond gevonden. Vanuit de gingivale sulcus, of wanneer de mucosa wordt beschadigd, komen bloedeiwitten in de mond terecht. Afweerfactoren uit bloed mengen zich met afweerfactoren uit speeksel, maar hoe die 2 systemen elkaar beïnvloeden is slechts spaarzaam onderzocht. Een belangrijk afweersysteem in bloed is het complementsysteem. Wanneer dit systeem wordt geactiveerd, komt een reeks van enzymatische reacties op gang waarbij de ene geactiveerde component de volgende activeert, die op zijn beurt een volgende component activeert. Dit leidt uiteindelijk tot doding van het micro-organisme of fagocytose door immuuncellen. Het complementsysteem uit bloed kon worden geactiveerd door binding aan speekselagglutinine (Leito et al, 2011). De activering van het complementsysteem was afhankelijk van de secretorstatus van de speeksel donor. Speekselagglutinine van non-secretors was niet in staat het complementsysteem te activeren, speekselagglutinine van secretors wel

(Gunput et al, 2015). Zo lijkt de afweer in de mond toch te worden beïnvloed door de bloedgroep en secretorstatus van de gastheer, alleen op een heel andere manier dan aanvankelijk werd gedacht.

Tot slot

Het proefschrift uit 1992 onderzocht de invloed van speeksel op de groei en aanhechting van bacteriën, voor bacteriën 2 essentiële voorwaarden om te kunnen overleven in de mond. Als resultaat werden grote individuele verschillen in aggregatie-eigenschappen van speeksel aangetoond, medebepaald door bloedgroepen en secretorstatus. In recent onderzoek is het groei-aanhechtingsmodel uitgebreid met bestudering van interacties met het immuunsysteem in bloed, waarbij bloedgroepen ook weer een rol lijken te spelen.

Literatuur

- * Boren T, Falk P. *Helicobacter pylori* binds to blood group antigens. Scientific American 1994; 28-37.
- * Bikker FJ, Ligtenberg AJ, Nazmi K, et al. Identification of the bacterial-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. J Biol Chem 2002; 277: 32109-32115.
- * Jong MH de, Hoeven JS van der. The growth of oral bacteria on saliva. J Dent Res 1987; 66: 498-505.
- * Emilson CG, Ciardi JE, Olsson J, Bowen WH. The influence of saliva on infection of the human mouth by mutants streptococci. Arch Oral Biol 1989; 34: 335-340.
- * Ericson T, Rundegren J. Characterization of a salivary agglutinin reacting with a serotype c strain of *Streptococcus mutans*. Eur J Biochem 1983; 133: 255-261.

- * Eriksson C, Frangmyr L, Niemi LD, et al. Variant size- and glycoforms of the scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340 with differential bacterial aggregation. *Glycoconjugate J* 2007; 24: 131-142.
- * Gunput STG, Ligtenberg AJM, Terlouw B, et al. Complement activation by salivary agglutinin is secretor status dependent. *Biol Chem* 2015; 396: 35-43.
- * Leito JT, Ligtenberg AJ, Houdt M van, Berg TK van den, Wouters D. The bacteria binding glycoprotein salivary agglutinin (SAG/gp340) activates complement via the lectin pathway. *Mol Immunol* 2011; 49: 185-190.
- * Ligtenberg AJM. Intervention of saliva in the colonization process of oral bacteria. Amsterdam: Vrije Universiteit, 1992. Academisch proefschrift.
- * Ligtenberg AJM, Almstahl A. Xerostomia and the oral microflora. In: Carpenter GH (red). *Dry mouth*. Heidelberg: Springer, 2016.
- * Ligtenberg TJM, Bikker FJ, Groenink J, et al. Human salivary agglutinin binds to lung surfactant protein-D and is identical with scavenger receptor protein gp-340. *Bioch J* 2001; 359: 243-248.
- * Oemrawsingh I. Studies on high molecular secretory sialoglycoproteins from human submandibular salivary glands. Amsterdam: Vrije Universiteit, 1972. Academisch proefschrift.
- * Scannapieco FA, Solomon L, Wadenya RO. Emergence in human dental plaque and host distribution of amylase-binding streptococci. *J Dent Res* 1994; 73: 1627-1635.
- * Schenkels LCPM, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol and Med* 1995; 6: 161-175.
- * Veerman ECI, Ligtenberg AJM, Schenkels LC, Walgreen-Weterings E, Nieuw Amerongen AV. Binding of human high-molecular-weight salivary mucins (Mg1) to *Haemophilus parainfluenzae*. *J Dent Res* 1995; 74: 351-357.
- * Zaura E, Keijsers B, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy 'core microbiome' of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 2009; 9: 259.

Summary

Dissertation 25 years after date. The effect of saliva on the colonisation of oral bacteria

In the research that formed the basis of the dissertation 'Intervention of saliva in the colonization process of oral bacteria' from 1992, the aggregation or clustering of oral bacteria by saliva was investigated. This prevents bacterial colonisation in the mouth. Major individual differences in aggregation activity of different saliva samples were found to exist, partly determined by the blood group of the saliva donor. As well as being found in red blood cells, ABO blood group antigens also appear on salivary glycoproteins. This does, however, not hold true for all individuals: this is only the case for so-called secretors. Non-secretors aggregated fewer bacteria than secretors. Later research showed that this was associated with a higher risk of caries. Subsequent research revealed that the complement system, a defence system in blood, was activated by saliva of secretors, but not of non-secretors. This shows that the oral defence systems are influenced by blood group and secretor status, but in a different way than we originally thought.

Bron

A.J.M. Ligtenberg

Uit de vakgroep Orale Biochemie van het Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam

Datum van acceptatie: 6 maart 2017

Adres: dr. A.J.M. Ligtenberg, Gustav Mahlerlaan 3004, 1081 LA, Amsterdam
a.ligtenberg@acta.nl