

Aus der
Universitätsklinik für Thorax-, Herz-, und Gefäßchirurgie Tübingen
Sektion Medizinische Werkstoffkunde und Technologie

**Untersuchung der Adhäsion von *S. gordonii* auf Titan mittels
Schwingquarzanalyse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Mack, Carmen

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Rupp

2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Avci-Adali

Tag der Disputation: 31.08.2020

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	10
1.1 Biofilme	10
1.2 Speichel	11
1.2.1 Elektrolyte und Puffer	12
1.2.2 Muzine	12
1.2.3 Amylase	13
1.2.4 Antimikrobielle Substanzen	13
1.2.5 Prolinreiche Proteine	15
1.2.6 Weitere Bestandteile.....	15
1.2.7 Bakteriostatische Funktion.....	15
1.3 Pellikel.....	15
1.4 Bildung dentaler Biofilme.....	17
1.5 Periimplantitis.....	19
1.6 <i>Streptococcus gordonii</i>	22
1.6.1 Streptokokken.....	22
1.6.2 Klassifikation.....	22
1.6.3 Zellwand	24
1.6.4 Adhäsine.....	24
1.6.5 Weitere Eigenschaften.....	28
1.7 QCM-D	29
1.7.1 Entwicklung und Funktion.....	29
1.7.2 QCM-D im Bereich Biologie.....	34

1.8	Wissenschaftliche Ziele.....	36
2	Material und Methoden.....	38
2.1	Züchten der Bakterien.....	38
2.2	Herstellung des modifizierten Speichels.....	38
2.3	QCM-D-Sensoren.....	39
2.4	QCM-D-Messung.....	40
2.5	Reinigung.....	45
2.6	Kontaktwinkelmessung.....	46
2.7	Vorversuche.....	46
2.8	Färbung der Bakterien.....	46
2.8.1	Kristallviolett.....	46
2.8.2	Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung.....	47
2.9	Statistische Auswertung.....	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Agglutination.....	48
3.2	Färbung der Bakterien.....	50
3.2.1	Lebensfähigkeit nach 4 Stunden.....	50
3.2.2	Reinigung der Quarzsensoren.....	52
3.3	Kontaktwinkelmessung.....	52
3.4	QCM-D-Messungen ohne Speichelkonditionierung.....	52
3.4.1	Frequenzkurven von <i>S. gordonii</i> auf Titan.....	52
3.4.2	Dissipationskurven von <i>S. gordonii</i> auf Titan.....	53
3.5	Quantifizierung von <i>S. gordonii</i> mit Kristallviolett.....	56
3.6	Speicheladsorption.....	60
3.7	QCM-D-Messungen mit Speichelkonditionierung.....	63
3.7.1	Frequenzkurven von <i>S. gordonii</i> mit Speichelkonditionierung.....	63

3.7.2	Dissipationskurven von <i>S. gordonii</i> mit Speichelkonditionierung ..	64
3.7.3	Mittelwerte der Messungen mit Speichelkonditionierung	65
3.8	Vergleich der Endwerte mit und ohne Speichelkonditionierung	67
3.9	Anfänglicher Frequenzabfall	68
3.10	Quantifizierung von <i>S. gordonii</i> auf Pellicel mit Kristallviolett	69
3.10.1	Korrelation der Bakterienzahl mit Dissipation und Frequenz	71
4	Diskussion	75
4.1	Speicheladsorption	75
4.2	Agglutination von <i>S. gordonii</i> mit Speichel	76
4.3	Positive Frequenzänderungen	77
4.4	Anfänglicher Abfall der Frequenz	83
4.5	Vergleich der Sensorsignale mit und ohne Pellicel	84
4.5.1	Frequenz	84
4.5.2	Dissipation	85
4.5.3	D/F Verhältnis	86
4.5.4	Kristallviolett	88
4.6	Vorgänge an der Grenzfläche	89
4.7	Hypothesen	90
4.8	Korrelation der Bakterienzahl mit Frequenz und Dissipation	94
4.9	Vergleich des D300-Systems mit anderen QCM-D-Systemen	95
4.10	QCM-D zur Detektion von Biofilmen	100
5	Zusammenfassung	103
6	Literaturverzeichnis	105
7	Erklärung zum Eigenanteil	116
8	Danksagung	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des Zahnhalteapparats.....	20
Abbildung 2: Schema eines Schwingquarzes in maximaler Auslenkung.....	30
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Sensors eines QCM-D-Geräts	39
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Versuche mit QCM-D.....	40
Abbildung 5: Aufbau einer QCM-D Messung.....	41
Abbildung 6: Fensterzelle mit angeschlossenen Elementen	42
Abbildung 7: Darstellung einer typischen Messung.....	44
Abbildung 8: Ausfällungen in der Messzelle nach 25 h	49
Abbildung 9: Ausfällungen einer Messung von 25 h unter dem Mikroskop.	50
Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahme einer Messung nach 4 h.....	51
Abbildung 11: Frequenzkurven einer Messung über 3 h ohne Pellikel	52
Abbildung 12: Dissipationskurven einer Messung über 3 h ohne Pellikel.....	54
Abbildung 13: Mittelwerte der Frequenzen über 3 h ohne Pellikel.....	55
Abbildung 14: Mittelwerte der Dissipationen über 3 h ohne Pellikel	56
Abbildung 15: Messung der optischen Dichte der Bakterien	57
Abbildung 16: Bilder der mit Kristallviolett gefärbten Quarze nach 30 min	58
Abbildung 17: Bilder der mit Kristallviolett gefärbten Quarze nach 3 h.....	59
Abbildung 18: Frequenzkurven ab Zugabe von modifiziertem Speichel.....	60
Abbildung 19: Dissipationskurven ab Zugabe von modifiziertem Speichel.....	61
Abbildung 20: Werte für F und D bei Ende der Speicheladsorption	62
Abbildung 21: Berechnung der Massenbelegung nach Speicheladsorption.....	63
Abbildung 22: Frequenzkurven einer Messung über 3 h mit Pellikel	64
Abbildung 23: Dissipationskurven einer Messung über 3 h mit Pellikel.....	65
Abbildung 24: Mittelwerte der Frequenzen über 3 h mit Pellikel.....	65
Abbildung 25: Mittelwerte der Dissipationen über 3 h mit Pellikel	66
Abbildung 26: Mittelwerte der Frequenzen mit und ohne Pellikel.....	67
Abbildung 27: Mittelwerte der Dissipationen mit und ohne Pellikel.....	68
Abbildung 28: Werte der optischen Dichte der Bakterien nach 3 h	70
Abbildung 29: Bilder der mit Kristallviolett gefärbten Quarze. Übersicht.	70
Abbildung 30: Bilder der mit Kristallviolett gefärbten Quarze. Vergrößerung....	71
Abbildung 31: Auftragung aller Enddissipationen über der optischen Dichte ...	71

Abbildung 32: Auftragung aller Endfrequenzen über der optischen Dichte.	72
Abbildung 33: Mittelwerte der OD-Messungen und der Dissipation	73
Abbildung 34: Mittelwerte der Dissipation über der optischen Dichte.....	74
Abbildung 35: Ausstrich von verklumpten Bakterien nach 25 h Messung	77
Abbildung 36: D-F-Diagramme ohne Pellikel und mit Pellikel.....	87
Abbildung 37: Schematische Darstellung von Hypothese 1	91
Abbildung 38: Schematische Darstellung von Hypothese 2	92
Abbildung 39: Schematische Darstellung von Hypothese 3	93
Abbildung 40: Schematische Darstellung von zwei Bakterien am Sensor.....	98
Abbildung 41: Schematische Darstellung der Vorgänge am Sensor	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Flüssigkeiten, die durch die Messzelle geschickt wurden	43
Tabelle 2: Endwerte der Frequenzen ohne Pellikel nach 3 h.....	53
Tabelle 3: Endwerte der Dissipationen ohne Pellikel nach 3 h	54
Tabelle 4: Endwerte der Frequenzen mit Pellikel nach 3 h.....	66
Tabelle 5: Endwerte der Dissipationen mit Pellikel nach 3 h	67
Tabelle 6: Negativwerte zu Beginn der Bakteriengabe	69
Tabelle 7: Vergleich verschiedener QCM-D-Messungen mit <i>S. gordonii</i>	96

Abkürzungsverzeichnis

AbpA	amylase-binding-protein A
AbpB	amylase-binding-protein B
CbdA	collagen-binding domain protein
CLSM	konfokale Laserscanningmikroskopie
D	Dissipation
Da	Dalton
eDNA	extrazelluläre DNA
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
F	Frequenz
GTF	Glykosyltransferase
Ig	Immunglobulin
KV	Kristallviolett
MHz	Megahertz
MUC5B	Muzin 5B
MUC7	Muzin 7
OD	optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEEK	Polyetheretherketon
PFA	Paraformaldehyd
PGM	pig gastric mucin
PMMA	Polymethylmethacrylat
PRPs	prolinreiche Proteine
QCM	Schwingquarzmikrowaage
QCM-D	Schwingquarzmikrowaage mit Dissipationsmessung
R _a	Oberflächenrauigkeit
S.	<i>Streptococcus</i>
<i>S. g.</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
slg	sekretorisches Immunglobulin

1 Einleitung

1.1 Biofilme

Biofilme sind ubiquitär. Sie waren die Vorstufe von mehrzelligem Leben und sind auf den verschiedensten Oberflächen vorhanden. Und obwohl sie meist nur als Schleim wahrgenommen werden, sind sie ein komplexer Zusammenschluss von Bakterien, die in dieser Form auf Oberflächen bessere Überlebenschancen haben als in planktonischer Form.

Da im menschlichen Körper schätzungsweise mindestens so viele Bakterien wie Zellen [1] vorkommen, ist es nicht verwunderlich, dass man dort auch auf Biofilme treffen kann. Dabei sind viele Biofilme nützlich für den Menschen, wie zum Beispiel die Darm- oder Hautflora, während sie an ungünstigen Stellen im Körper wie im Blut eine Sepsis oder an Herzklappen eine Endokarditis auslösen können. Diese Bakterien können unter normalen Bedingungen harmlos sein, aber in einem anderen Milieu sehr gefährlich. So ist zum Beispiel *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) ein gewöhnliches Bakterium der Mundhöhle, kann aber auf künstlichen Herzklappen einen Biofilm bilden und eine tödliche Endokarditis auslösen. Der Biofilm der Mundhöhle unterscheidet sich von Individuum zu Individuum und es wurden über 700 Bakterienarten identifiziert, die in der oralen Flora vorhanden sein können [2, 3].

In der Mundhöhle kommt die im ganzen Körper einzigartige Bedingung zu tragen, dass dort der Zahn als festes Objekt die Gingiva durchbricht und so die Mundhöhle mit dem Parodont und indirekt auch mit dem Knochen verbindet. Dies können vor allem pathogene Bakterien als Eintrittspforte nutzen. Auch wenn dieses die Gingiva durchbrechende Objekt nicht der Zahn, sondern ein künstlich eingebrachtes Implantat ist, kann es zu einer bakteriellen Besiedlung kommen, die eine Entzündungsreaktion des Körpers hervorruft.

Die Adhäsion von Biofilmen auf verschiedenen Oberflächen spielt in der Zahnmedizin eine wichtige Rolle, da erst durch Biofilmbildung die Besiedelung

des gesamten Mundraums mit Bakterien möglich ist. Im Biofilm entwickeln die enthaltenen Bakterien einen spezifischen Stoffwechsel [4], der zum besseren Überleben dieser Bakterien führt. Wichtig hierbei ist der Austausch von Informationen über die Zellgrenzen hinweg. Bakterien schütten beim sogenannten Quorum sensing verschiedene Signalstoffe aus, die anderen Bakterien Informationen liefern [5].

Es können Resistenzgene ausgetauscht werden, Nahrung und Sauerstoff können weitergegeben werden und es wird eine Matrix gebildet [6]. Im Biofilm sind die Bakterien voneinander abhängig, aber ihre Stärken summieren sich auf. Sie sind besser gegen äußere Einflüsse geschützt als in planktonischer Lebensform. Da bei bakteriellen Infektionen im Mundraum wie Parodontitis und Karies Biofilme vorliegen, stellt sich die Frage, wie man diese wieder entfernt, ohne sonstige Schäden zu verursachen. Ein Ansatzpunkt ist es, die initiale Adhäsion von Bakterien auf dentalen Oberflächen zu verhindern. Dafür ist es notwendig, die genauen Mechanismen der Bakterienadhäsion, die den ersten Schritt zur Biofilmbildung darstellt, zu kennen.

1.2 Speichel

Speichel ist eine in den Speicheldrüsen sezernierte Flüssigkeit, die die Mundhöhle und dort befindliche Nahrung befeuchtet, Stärke in Disaccharide zerlegt und eine antibakterielle Wirkung erzielt.

Speichel schützt weiterhin die Schleimhäute und die Zähne, eine Tatsache, die bei im Gesichtsbereich bestrahlten Personen deutlich wird. Ab einer Dosis von 60 Gray degenerieren die Speicheldrüsen dauerhaft [7], die Schleimhaut wird pergamentartig und die Zähne sind von sogenannter Strahlenkaries betroffen. Speichel besteht zu 99 % aus Wasser, daneben sind viele weitere Substanzen enthalten [8].

1.2.1 Elektrolyte und Puffer

Im Speichel vorhandene Elektrolyte sind Kalium, Bicarbonat, Phosphat und Natrium. In geringen Mengen sind auch Calcium und Magnesium vorhanden. Elektrolyte sind wichtig für zwei der drei Puffersysteme im Speichel, das Bikarbonat- und das Phosphat-Puffersystem [9]. Das Bikarbonat-Puffersystem ist vor allem für die Neutralisation der mit der Nahrung aufgenommenen Säuren verantwortlich, während das Phosphat-Puffersystem mit einem höher liegenden pH-Optimum die Remineralisation der Zähne steuert [10].

Das dritte Puffersystem, der Proteinpuffer, ist bis jetzt wenig erforscht. Eine Studie weist darauf hin, dass bei Individuen, die wenig von Karies betroffen sind, eine höhere Konzentration der Elektrolyte Calcium, Phosphat und Bicarbonat im Speichel vorhanden ist [11].

1.2.2 Muzine

Muzine sind organische Bestandteile des Speichels. Es handelt sich um Glykoproteine, die Wasser einlagern können und für die Konsistenz des Speichels sorgen [12]. Abhängig davon, aus welcher der drei großen Speicheldrüsen der Speichel stammt, hat er einen unterschiedlichen Muzingehalt und dadurch auch eine unterschiedliche Viskosität.

Im menschlichen Speichel gibt es verschiedene Muzine. MUC5B (ehemals MG1) ist ein sehr großes und schweres Molekül von über 20 Megadalton (MDa) [12], während MUC7 (ehemals MG2) ein kleineres, nicht so stark bei der Pellikelbildung beteiligtes Muzin ist [13].

MUC7 kann Mikroorganismen im Speichel agglutinieren [14].

Die Glandula parotis produziert serösen Speichel, während die Glandula sublingualis mukösen Speichel, der eine höhere Viskosität aufweist, produziert. Die Glandula submandibularis produziert einen sero-mukösen Speichel, der hinsichtlich Viskosität zwischen den anderen Drüsen angesiedelt ist. In der Mundhöhle vermengen sich anschließend die einzelnen Speichelarten zu einem Gesamtspeichel.

1.2.3 Amylase

Im Speichel befinden sich verschiedene Proteine. Hier ist vor allem die Amylase interessant, die mit Konzentrationen im stimulierten Parotisspeichel zwischen 648 und 804 µg/ml eines der am stärksten vertretenen Proteine des Speichels ist [15, 16].

Sie ist nicht glykosyliert ein 56 kDa schweres Protein [16]. Der menschliche Körper kann nur α -Amylase produzieren, die α -1,4-Glykosidbindungen der Stärke spaltet und daraus Maltose, Maltodextrose und verzweigte Oligosaccharide herstellt. Dies ist der im Mundraum ablaufende erste Schritt der Verdauung der Stärke.

Im aktiven Zentrum der Amylase sind Calcium- und Chloridionen vorhanden, die essentiell für ihre enzymatische Funktion sind [17]. Alpha-Amylase bindet sowohl an das Hydroxylapatit der Zähne als auch an Bakterien [18, 19], und kann so als ein wichtiger Faktor der bakteriellen Besiedlung angesehen werden.

Amylase interagiert mit verschiedenen Spezies der oralen Streptokokken, den Frühbesiedlern der dentalen Plaque [16]. Sie bildet nachgewiesene Bindungen zu *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. cristatus*, *S. parasanguinis*, *S. vestibularis* und *S. salivarius* [20, 21].

Diese Streptokokken werden auch α -Amylase-bindende Streptokokken genannt. Interessant ist, dass die Amylase auch an Bakterien gebunden ihre Funktion beibehält und weiterhin Stärke spaltet [16]. Dies kann für die α -Amylase-bindenden Streptokokken ein Vorteil in der Nahrungsbeschaffung gegenüber Konkurrenten sein.

1.2.4 Antimikrobielle Substanzen

1.2.4.1 Antikörper

Im Speichel befinden sich Antikörper des spezifischen Immunsystems. Diese sorgen dafür, dass frei schwimmende Bakterien im Mundraum schon sehr früh agglutiniert und anschließend geschluckt werden, was ihren Tod im sauren Milieu

des Magens bedeutet [22].

Im Speichel ist Immunglobulin A (IgA) mit über 85 % der am häufigsten vertretene Antikörper [23]. Es ist ein Dimer, das von Schleimhäuten sezerniert wird. Der Rest der im Speichel vorhandenen Immunglobuline gehört zur IgG-Klasse [23].

1.2.4.2 Lysozym

Lysozym ist ein Abwehrprotein des Körpers, das gezielt die Zellwände von Bakterien angreift und auflöst. Dabei sind grampositive Bakterien angreifbarer, da diese keine äußere Zellmembran über der Zellwand besitzen.

1.2.4.3 Lactoferrin

Lactoferrin ist ein Protein, das vor allem von neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet wird und neben einer Peptidase-Wirkung die Fähigkeit hat, Eisen zu binden, welches die Bakterien für ihren Stoffwechsel benötigen [24, 25]. Lactoferrin kann verschiedene Bakterien, unter ihnen auch *S. mutans*, im Wachstum hemmen oder sogar töten [26].

1.2.4.4 Agglutinine

Agglutinine sind Glykoproteine des Immunsystems, die dazu in der Lage sind, Bakterien zu verklumpen [27]. Es werden unter anderem *S. mutans* und *S. gordonii* agglutiniert [28].

1.2.4.5 Weitere antimikrobielle Bestandteile

Weiterhin sind im Speichel geringe Mengen von Peroxidasen, Myeloperoxidasen, Histaminen und Defensinen zur Abwehr von Mikroorganismen vorhanden.

1.2.5 Prolinreiche Proteine

Prolinreiche Proteine (PRPs) sind für den Salzhaushalt wichtig. Sie binden Calcium und verhindern ein Ausfallen von Calciumphosphat-Salzen im Mund und auf Zahnoberflächen [29]. Zusätzlich sind sie Teil des Pellikels und haben Rezeptoren, an die Bakterien (auch *S. gordonii*) andocken können [19].

Prolinreiche Proteine ändern ihre Konformation, sobald sie an eine Oberfläche adhären. Dabei werden zuvor versteckte Rezeptoren an der Oberfläche freigelegt und damit nutzbar für Bakterien [19, 30]. Sie sind für die bakterielle Adhäsion vorteilhaft, da sie nur adsorbiert Rezeptoren zeigen, und so die Bakterien nicht Gefahr laufen, an ein frei im Speichel schwimmendes Protein anzudocken und vom Speichel weggespült zu werden.

1.2.6 Weitere Bestandteile

Im Gesamtspeichel, der sich im Mund sammelt, sind diverse Bestandteile aus der Mundhöhle vorhanden. Dies sind abgeschilferte Epithelzellen, Speisereste und Bakterien. Bakterien sind mit einer Menge von 10^8 bis 10^9 pro ml im Speichel vorhanden [31].

1.2.7 Bakteriostatische Funktion

Die Proteine im Speichel wirken meist nicht direkt gegen bestimmte Bakterienarten, sie versuchen vielmehr, eine stabile und unschädliche Flora zu etablieren [23].

1.3 Pellikel

Das Pellikel ist ein nicht-mineralisiertes „Häutchen“ aus Speichelbestandteilen. Nach der mechanischen Reinigung bildet sich in der Mundhöhle immer ein Pellikel auf den Oberflächen der Zähne. Dieses besteht aus Albumin, Amylase, Carboanhydrase, sekretorischem Immunglobulin A (sIgA), IgG, Lactoferrin,

Lysozym, PRPs, Statherin und in geringerem Maße Histatin1, IgM, und dem Muzin MUC5B [13]. Die Bestandteile sind nicht in der gleichen Menge wie im Speichel vorhanden, es findet eine selektive Adsorption durch Van-der-Waals-, elektrostatische- und hydrophobe Kräfte statt [30]. Auch Epithelzellen sowie Peptide von Mikroorganismen sind enthalten [32].

Ein entscheidender Faktor für die Zusammensetzung des Pellikels ist die Oberfläche, auf die es adsorbiert, da diese abhängig vom Material unterschiedlich starke molekulare Kräfte auf die einzelnen Speichelkomponenten ausübt [30, 33, 34].

Versuche von Amaechi et al. zeigten, dass innerhalb einer Stunde ein Pellikel in vivo mit einer Dicke von 0,3 - 1,06 µm [35], abhängig von der Zahnregion gebildet wird. Dort docken im weiteren Verlauf Bakterien an. Interessant ist, dass die Dicke des Pellikels nach einer halben Stunde stark zunimmt und anschließend für ca. eine Stunde ein Plateau bildet. Dies wird auf adsorbierende Proteinaggregate aus dem Speichel zurückgeführt [36].

Sobald das Pellikel etabliert ist, finden molekulare Austauschprozesse statt. So werden nach ca. 2 Stunden PRPs durch Muzine (vor allem MUC5B) ersetzt [37]. Die Muzine auf der Zahnoberfläche sorgen dafür, dass der Zahn nicht austrocknet [23].

Edgerton et al. fanden heraus, dass sich ein Pellikel, das auf Titan gebildet wurde, von einem auf Zahnschmelz gebildeten unterscheidet [38]. Diese Studie zeigte, dass in beiden Pellikeln α-Amylase und prolinreiche Proteine vorhanden waren. Im Gegensatz zum Zahnschmelz waren im Titanpellikel aber keine Cystatine und keine leichten („low-molecular weight“) Muzine zu finden. Dafür war im Titanpellikel ein schweres („high-molecular weight“) prolinreiches Glykoprotein vorhanden, das auf Zahnschmelz in viel kleineren Mengen vorkam. Prolinreiches Glykoprotein wird bei Scannapieco et al. als adhäsionshindernd für *S. gordonii* beschrieben [39].

Trappetti et al. fanden heraus, dass die Biofilmbildung von *S. pneumoniae*, einem Verwandten von *S. gordonii*, durch Sialinsäuren angeregt wird [40].

Die Bindung von Bakterien an Proteine des Pellikels ist risikobehaftet, da sich diese Proteine auch im freien Speichel befinden. Bakterien, die an diese Proteine binden, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit verschluckt und können im Magen nicht überleben.

Für die Spätkolonisierer ist es daher ein Vorteil, direkt an die überlebenden Frühkolonisierer, und so an die schon mit Bakterien bedeckte Oberfläche zu binden.

An das Pellikel adsorbieren neben Bakterien auch antimikrobielle Bestandteile des Speichels. Deshalb ist das Pellikel nicht nur die Schnittstelle zwischen Zahn und Speichel, sondern auch ein wichtiger Faktor für die spätere Besiedelung mit Bakterien, da der Biofilm abhängig von den Bakterien, aus denen er besteht, verschiedene Eigenschaften, die für den Körper in unterschiedlichem Maße schädlich sein können, mit sich bringt.

1.4 Bildung dentaler Biofilme

Bakterien haben im Mundraum optimale Vermehrungsvoraussetzungen: Die Temperatur ist körperwarm, die Umgebung ist feucht, und es liegen ausreichend Nährstoffe, sowohl durch zuckerhaltige Nahrung als auch durch die Abbauprodukte der Amylase, vor. Die Zähne sind insbesondere als Besiedelungsort geeignet, da dort keine Zellabschilferung, die sonst überall auf den Häuten und Schleimhäuten des menschlichen Körpers geschieht, stattfindet. Die Bakterien haben einen Lebensraum, auf dem sie sich dauerhaft niederlassen können.

Orale Bakterien werden in Frühbesiedler und Spätbesiedler eingeteilt. Die Frühbesiedler binden direkt an das Pellikel und bilden zusätzlich untereinander Bindungen aus. Diese sind sehr spezifisch und sind sowohl innerhalb einer Spezies als auch zwischen verschiedenen Spezies nachweisbar [41]. Es gibt auch Frühbesiedler, die nicht direkt an das Pellikel binden, sondern an die Bakterien, die schon an das Pellikel gebunden haben.

Die ersten Bindungen von Bakterien an das Pellikel sind spezifisch und geschehen über Rezeptoren an ganz bestimmten Regionen des Bakteriums,

den Adhäsinen (siehe 1.6.4). Dies bietet den Bakterien einen großen Vorteil, da sie so nicht durch den Flüssigkeitsstrom im Mundraum weggespült werden [42]. Die Frühbesiedler sind meist Kommensalen, die nicht schädlich für den Menschen sind. Eine wichtige Ausnahme hier ist *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), ein Bakterium, das Säure bildet, und so bekanntermaßen kariogen wirkt. Frühbesiedler sind vor allem Streptokokken, während Spätbesiedler aus vielen verschiedenen Bakteriengruppen bestehen, die nur an schon vorhandene Bakterien binden, und nicht mehr direkt an das Pellicel. Sie profitieren unter anderem von den durch den Metabolismus der Frühbesiedler geänderten Umgebungsbedingungen [30].

S. gordonii, die Bakterienart, die in dieser Arbeit untersucht und verwendet wird, gehört zu den Frühbesiedlern und kann an Amylase und andere Speichelproteine binden, sie heftet sich also direkt an das Pellicel [16].

Im späteren Verlauf der Biofilmbildung werden von den im Biofilm enthaltenen Bakterien extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) gebildet. Diese Substanzen sind vorwiegend Polysaccharide, aber auch Proteine und extrazelluläre DNA [6]. Mit Hilfe der so entstandenen Matrix können die Bakterien besser an Oberflächen adhären, manche Bakterienarten können die EPS sogar als Nahrungsquelle benutzen [6]. Ein weiterer Vorteil, den die Matrix bietet ist, dass der Biofilm dichter wird. Dadurch und durch viele weitere Mechanismen können Antibiotika die Bakterien im Biofilm schlechter erreichen [43]. Costerton et al. fanden heraus, dass die Resistenz gegen Antibiotika in Biofilmen um das 500 – 5000-fache größer ist als dies bei planktonischen Bakterien der Fall ist [44].

Ein weiterer Aspekt, der für die schlechtere Wirkung von Antibiotika in Biofilmen verantwortlich ist, ist der vermehrte Gentransfer, der über Artgrenzen hinweg stattfinden und Resistenzgene für Antibiotika beinhalten kann [5].

Die Spätbesiedler sind häufig für den Menschen schädliche Bakterien, die sowohl für Karies als auch für Parodontitis verantwortlich sind [45].

Der etablierte Biofilm kann sich kompartimentieren, so dass an verschiedenen Stellen des Biofilms unterschiedliche Prozesse ablaufen (Proteinexprimierung, Reproduktion) und unterschiedliche Bedingungen (elektrochemisches Potenzial,

pH-Wert) herrschen können [46].

Dieser orale Biofilm ist durchlässig für Wasser, es bilden sich Kanäle im Biofilm, die Stoffaustausch und ähnliche Prozesse zulassen [30]. Außerdem ist der Biofilm zum Quorum sensing in der Lage. Dabei geben die einzelnen Bakterien im Biofilm Signalmoleküle ab, die von anderen Bakterien erkannt werden und zum vermehrten Ablesen bestimmter Gene führen [47]. Bei grampositiven Bakterien sind diese Signalmoleküle kleine Peptide, während es bei gramnegativen Bakterien meist Lactone sind [43]. So ist der Biofilm dazu in der Lage, auf äußere Veränderungen zu reagieren.

Der Biofilm kann im fortgeschrittenen Stadium Tochterkolonien freisetzen, die entweder aus kleinen Bakteriengruppen oder aus ganzen Konglomeraten mit Bakterien und EPS bestehen [48]. Die Tochterkolonien spalten sich ab und können neue Lebensräume besiedeln [48].

1.5 Periimplantitis

Die Periimplantitis ist eine relativ junge Krankheit, sie beschreibt eine Entzündung um eine implantierte Zahnwurzel. In Deutschland nimmt die Zahl der gesetzten Implantate stetig zu und erreichte im Jahr 2018 eine Anzahl von ca. 1,3 Millionen [49]. Folglich müssen sich Zahnärzte auch immer häufiger mit der Periimplantitis auseinandersetzen. Diese Erkrankung schließt entzündete Mukosa und entzündeten Knochen ein und kann bis zum Verlust des Implantats führen.

Neben dem Gebiet der Karies und Parodontitis spielen Biofilme auch bei der Periimplantitis eine wichtige Rolle. Die Biofilme, die bei Periimplantitis entstehen, unterscheiden sich Studien zufolge in den ersten Tagen fast nicht von Biofilmen, die bei Parodontitis entstehen [50].

Bilden sich Biofilme im Raum zwischen Abutment und Mukosa, führt dies zu einer Entzündungsreaktion des Körpers mit Auflösung des Bindegewebes und im weiteren Verlauf zur Auflösung des Knochens und in die Tiefe wandernden Bakterien.

Dies wird begünstigt vom reduzierten Zustand des Parodonts. Wie in Abbildung

1 gezeigt, besteht dieses beim natürlichen Zahn aus verschiedenen Fasern, wie zum Beispiel Sharpey-Fasern, die vom Zement zum Knochen führen. Das Implantat muss darauf verzichten, es liegt entweder direkt am Knochen an, oder es besteht nur eine sehr dünne bindegewebige Schicht zwischen Implantat und Knochen [51].

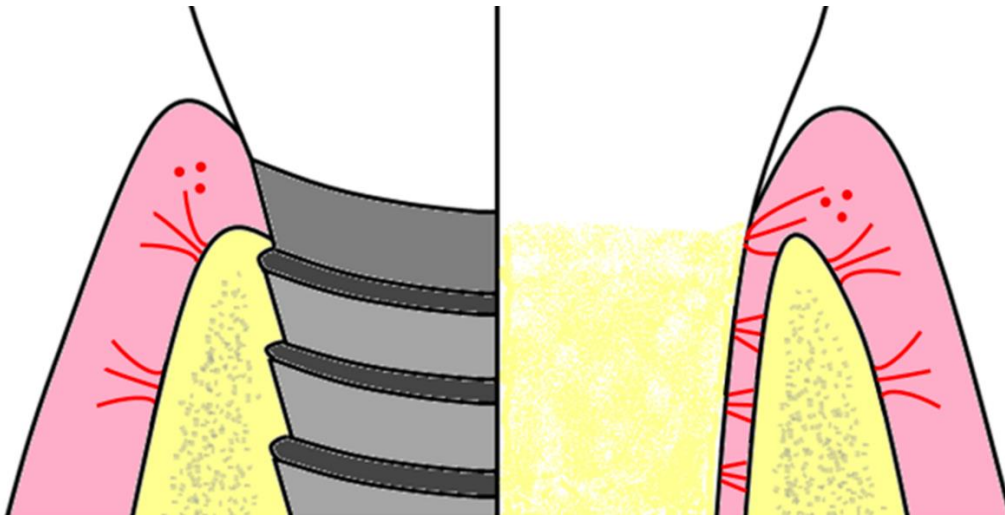


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch den Zahnhalteapparat an einem Implantat (links) und einem Zahn (rechts), Die Fasern des Zahnhalteapparates sind rot dargestellt.

Es wird vermutet, dass durch die fehlenden straffen Fasern die Bakterien einfacher einen Weg zwischen Implantat und Gingiva finden. Sind die Mikroorganismen dort angekommen, produzieren sie verschiedene Endotoxine, die das Immunsystem aktivieren, zur Entzündung führen und so langsam den Knochen um das Implantat zerstören [52].

Im Gegensatz zur Parodontitis ist bei der Periimplantitis die Oberfläche ein entscheidender Faktor, da verschiedenste Implantatmaterialien von Keramik über Titan bis hin zu Kunststoffen existieren. Diese Oberflächen haben im Gegensatz zur Zahn- oder Wurzeloberfläche unterschiedliche Eigenschaften, die auch die bakterielle Besiedelung beeinflussen können. Dazu gehören die Oberflächenrauheit und die freie Oberflächenenergie [30].

Im Versuch von Hahnel et al., die die Oberflächeneigenschaften von Zirkon, Titan,

Polyetheretherketon (PEEK) und Polymethylmethacrylat (PMMA) verglichen, hat Titan eine freie Oberflächenenergie von 35,62 mJ/m² und eine Oberflächenrauigkeit R_a von 0,17 µm [53]. Titan war das raueste Material, hatte aber eine geringere Bakterienanhaftung als PMMA und Zirkon nach 20 Stunden [53].

In Studien wurde außerdem festgestellt, dass der initiale Biofilm auf Titanoberflächen vor allem aus Streptokokken besteht, und dass eine glatte Oberfläche die Adhärenz vermindert [54].

Problematisch bei der Periimplantitis ist, dass sobald der Biofilm mechanisch mit Hartmetallinstrumenten oder Pulverwasserstrahlgeräten entfernt wird, die Implantatoberfläche, speziell bei Titanimplantaten, stark aufgeraut wird [55], was wieder mehr bakterielle Anhaftung zur Folge hat. Deshalb wäre es für die Zahnmedizin von großem Interesse, sowohl die bakterielle Besiedelung von Anfang an möglichst gering zu halten, als auch die Entfernung der gebildeten Biofilme durch entsprechende Oberflächenmodifikationen zu erleichtern.

Die mechanische Entfernung von Belägen hat sich bei der periimplantären Mukositis bewährt, bei der Periimplantitis mit Knochenabbau wird zusätzlich bei Notwendigkeit eine chirurgische Intervention empfohlen [56]. Dies kann bei kleineren Defekten die Schaffung eines besseren Zugangs zur mechanischen Reinigung und bei größeren Defekten ein regenerativer Aufbau des verlorenen Knochens sein [57].

Laserbehandlungen gewinnen bei der Periimplantitisbehandlung auch immer mehr an Popularität und es gibt vielversprechende Studien bei der Reinigung der infizierten Implantatoberflächen und bei laserunterstützter chirurgischer Behandlung nach vorgegebenen Protokollen [58, 59].

Auch wenn die mit Periimplantitis in Verbindung gebrachten schädlichen Keime eher Spätbesiedler und gramnegative Bakterien sind [60], so sind auch die Frühbesiedler und grampositiven Streptokokken wichtig, da sie die Grundlage des Biofilms bilden, an den sich später die schädlichen Keime anhaften. Cook et al. zeigten, dass in einem nur aus *S. gordonii* und *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) bestehenden Biofilm *S. gordonii* besser am Pellikel haftete, und dass jede Art allein keinen substanziellen Biofilm bilden konnte, bei Adhäsion von

S. gordonii auf Pellikel und anschließender Adhäsion von *P. gingivalis* allerdings schon [61]. Es wäre theoretisch möglich, den gesamten Biofilm zu verhindern, wenn die Adhäsion der Frühbesiedler an die Titanoberfläche gestoppt werden könnte.

Heitz-Mayfield und Lang weisen in ihrem Artikel darauf hin, dass die Entkeimung von Implantatoberflächen unterhalb der Zahnfleischgrenze einen wichtigen Beitrag zur Vorhersehbarkeit von Behandlungserfolgen bei der Periimplantitistherapie leisten würde [62].

1.6 Streptococcus gordonii

1.6.1 Streptokokken

Streptokokken sind kugelförmige Bakterien, die sich in Kettenform zusammenlagern. Sie haben eine Größe von 0,5 – 2 µm, sind grampositiv, fakultativ anaerob und aerotolerant. Sie sind nicht motil und bilden keine Sporen.

1.6.2 Klassifikation

S. gordonii ist eine Bakterienart, die zur Viridans-Gruppe der Streptokokken gehört [63]. Diese werden aufgrund ihres Lebensraums auch als orale Streptokokken bezeichnet. Eine weitere Bezeichnung ist „vergrünende Streptokokken“, die auf der Fähigkeit dieser Bakterien beruht, Hämoglobin unvollständig abzubauen und dabei grünliche Abbauprodukte zu hinterlassen. Diese Eigenschaft wird α -Hämolyse genannt. Da diese Fähigkeit aber nicht alle Bakterien der Gruppe aufweisen, ist die Bezeichnung irreführend [64]. Innerhalb dieser Gruppe gehört *S. gordonii* zur Mitis-Untergruppe, zusammen mit *S. cristatus*, *S. infantis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. pneumoniae* und *S. sanguinis* [65]. Die Bakterien der Mitis-Gruppe finden sich alle im Nasen-Rachenraum des Menschen [65]. Sie sind grampositiv, fakultativ anaerob und zeichnen sich, wie alle Streptokokken, durch eine große Anzahl unterschiedlicher Oberflächenproteine- und Polysaccharide aus, die der Anhaftung an

verschiedene Oberflächen dienen. *S. gordonii* interagiert dabei mit verschiedenen Speichelproteinen [66]. Manche Autoren ordnen *S. gordonii* auch der Sanguinis-Gruppe zu, zu der außerdem *S. sanguinis* und *S. parasanguinis* gehören [64, 67]. Aufgrund der Tatsache, dass diese Bakterien alle „Aesculin-positiv“ (Bildung eines Hofes auf Aeskulinagar) sind, und die der Mitis-Gruppe nicht, ist diese Zuordnung durchaus gerechtfertigt. Das Problem der Zuordnung ergibt sich vor allem durch die stark ausgeprägte Homologie der Gene innerhalb der Viridans-Gruppe der Streptokokken [64].

S. gordonii hat viele homologe Gene mit *S. sanguinis*, und wurde bis 1989 für die gleiche Spezies, damals „*S. sanguis*“ genannt, gehalten [68]. Vergleichende Genomanalysen von Zheng et al. zeigten unter anderem, dass verschiedene Stämme von *S. gordonii* 97-126 bekannte Virulenzgene besaßen und verschiedene Stämme von *S. sanguinis* 101-139. 79 dieser Gene kamen in beiden Spezies vor, was auf große Gemeinsamkeiten der beiden Bakterienarten schließen lässt [69].

Es wird angenommen, dass *S. gordonii* und *S. sanguinis* ein „offenes Pan-Genom“ besitzen, das bedeutet, dass sie sich konstant anpassen und weiterentwickeln indem sie genetisches Material zum Beispiel durch Bakteriophagen aufnehmen und mit anderen Bakterien austauschen [69].

Bakterien der Viridans-Gruppe sind angreifbar durch Vankomyzin-Antibiotika [70].

S. gordonii kommt bei gesunden Individuen vermehrt auf den Zähnen [3] vor, während es im Vergleich zu anderen Streptokokkenarten in eher geringer Anzahl auf dem Zungenrücken vorkommt [71].

Streptokokken der Viridans-Gruppe wurden bei 40 bis 60 % der Patienten mit einer bakteriellen Endokarditis an nativen Herzklappen gefunden [72]. Sie werden vor allem mit der subakuten Form der infektiösen Endokarditis in Zusammenhang gebracht, während die akute Form von Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken ausgelöst werden kann.

Die Streptokokken der Viridans-Gruppe müssen folglich sowohl im Lebensraum Mund als auch im Lebensraum Blut überleben können, dafür haben sie spezielle Überlebensmechanismen entwickelt [73, 74].

1.6.3 Zellwand

Die Zellwand grampositiver Bakterien ist nicht nur eine Hülle, die Stabilität verleiht, sondern ein aktives Zellorganell, das für den Transport und Zusammenbau der Zellwandproteine sorgt [75]. Diese Zellwandproteine sind sehr vielfältig und können auch Adhäsine sein.

Lipoteichonsäure ist ein Bestandteil von grampositiven Zellwänden, dessen Funktion noch nicht geklärt ist. Lima et al. fanden heraus, dass sich bei Mutanten von *S. gordonii*, die keine Lipoteichonsäure bilden konnten, die Anzahl der vorhandenen Proteine stark vom Wildtyp unterschied [76]. Unter anderem war mehr SspA und SspB (siehe 1.6.4.6) bei der Mutante vorhanden.

1.6.4 Adhäsine

Adhäsine sind definiert als bakterielle Oberflächenkomponenten, die es dem Erreger ermöglichen, sich an die biologischen Strukturen eines Wirts anzuheften. Diese können somit zellwandverankerte Proteine sein, die an bestimmte Rezeptoren binden, aber auch Enzyme, die zum Beispiel für die Herstellung oder Sekretion der Extrazellulärmatrix verantwortlich sind.

S. gordonii hat sehr viele unterschiedliche Adhäsine, die der Bindung an verschiedene Rezeptoren dienen. Im Folgenden sollen nun einige genauer erläutert werden.

1.6.4.1 Bindung an Kollagen durch Collagen-binding domain protein (CbdA)

CbdA ist ein Protein, das an Kollagen bindet und dafür sorgt, dass die Bakterien in instrumentierten Wurzelkanälen (in der hier zitierten Studie ex vivo) überleben können [77]. Die Bindung an Kollagen sorgt unter anderem für die Gefahr, die von *S. gordonii* hinsichtlich der infektiösen Endokarditis ausgeht. Da an kompromittierten Herzklappen oft Kollagen freiliegt, ist es für *S. gordonii* einfach, daran zu binden und die Bildung eines Biofilms zu initiieren.

1.6.4.2 Bindung an Amylase durch Amylase-binding-protein A und B

Die Adhäsine für Amylase binden diese außerhalb des aktiven Zentrums, so kann das Enzym seine Funktion beibehalten [78]. *S. gordonii* hat mindestens 2 bekannte Adhäsine für Amylase, amylose-binding-protein A (AbpA) und amylose-binding-protein B (AbpB). Versuche zeigten, dass *S. gordonii*-Mutanten mit ausgeschaltetem AbpA-Gen Amylase schlechter binden konnten, nämlich nur im gleichen Umfang wie andere nicht-Amylase-bindende Streptokokken [79].

Die Expression dieses Proteins wurde von Nikitkova et al. untersucht [80]. Sie zeigten, dass AbpA vermehrt hergestellt wird, wenn Maltose oder Maltotriose vorhanden sind. Da Amylase Stärke zu genau diesen Produkten zerlegt, reagiert *S. gordonii* spezifisch durch die Abbauprodukte von Amylase auf die Amylase, um Rezeptoren zu produzieren, mit denen es diese binden kann.

Die Bindung von Amylase hat für *S. gordonii* viele Vorteile: Es kann zur Nahrungsbeschaffung dienen, zur Adhäsion, und nicht zuletzt kann es eigene Antigene damit maskieren und somit für den Körper ungefährlich erscheinen lassen [81].

Ob Amylase dazu beiträgt, dass sich *S. gordonii* gezielt an das Pellikel anhaftet, ist noch ungeklärt, da verschiedene Versuche unterschiedliche Ergebnisse zeigten. So band bei Scannapieco et al. [39] *S. gordonii* sowohl an reine Amylase auf Hydroxylapatit als auch an das Pellikel, während Ligtenberg et al. keinen signifikanten Einfluss der Amylase auf die Adhäsion von *S. gordonii* an Microtiter-Vertiefungen feststellen konnten [82].

Es ist möglich, dass sowohl die Amylase als auch die Bakterien stark unterschiedlich auf verschiedene Oberflächen reagieren. Dies ist auch im Hinblick auf Titanimplantate interessant.

Bindung von Amylase ist nicht weit verbreitet unter oralen Streptokokken, neben *S. gordonii* können dies nur *S. parasanguinis*, *S. mitis*, *S. cristatus* und *S. vestibularis* [20, 21].

1.6.4.3 Fimbrien

Die Oberfläche von *S. gordonii* ist mit Fimbrien unterschiedlicher Länge besetzt, die verschiedene Funktionen wahrnehmen. So fanden McNab et al. heraus, dass auf der Oberfläche von *S. gordonii* ca. 60 nm lange Fimbrien vorhanden sind, die über CshA (Protein auf der Bakterienoberfläche) an andere orale Bakterien (*Streptococcus oralis* und *Actinomyces naeslundii*) und an Fibronektin binden und gleichzeitig die Oberfläche hydrophober machen [83]. Diese Fimbrien wurden aber nur bei 35 % der untersuchten Bakterien gefunden.

Neuere Untersuchungen mit einem Rasterkraftmikroskop ergaben, dass beim Stamm DL1 genau wie bei McNab et al. nur 35 % der Bakterien mit Fimbrien einer Länge von durchschnittlich 154 nm (geschätzte Gesamtlänge bei einer sichtbaren Länge von 77 nm) besetzt sind, und dies eher an den Polen [84].

1.6.4.4 Bindung an Sialinsäurereste durch serine rich repeat proteins Hsa und Gsp

Hsa und Gsp sind homologe Serin-reiche Oberflächenglykoproteine (serine-rich surface glycoproteins) von *S. gordonii*, die an Sialinsäurereste [85], die sich sowohl auf den Muzinen des Speichels [86], als auch auf den Oberflächenmembranen von Thrombozyten befinden, binden (am Rezeptor GPIIb α) [87, 88]. Sie sind auch für die Gefahr, die von *S. gordonii* bei Endokarditis ausgeht, verantwortlich. Dort spielt weiterhin eine Rolle, dass der Hsa-Oberflächenrezeptor durch Interaktion mit Monozyten zu deren Differenzierung zu dendritischen Zellen führt [89].

Ursprünglich sind diese Adhäsine aber für die Adhäsion am Pellikel evolutionär entwickelt worden. Takamatsu et al. zeigten, dass Hsa und GspB an verschiedene Proteine des Speichels binden, darunter MUC7 und Agglutinin, während Hsa zusätzlich noch IgA binden konnte [90].

GspB ist stark glykosyliert und braucht deshalb einen anderen Sekretionsweg vom Zellinneren an die Bakterienoberfläche als andere Oberflächenproteine [91]. Bensing und Sullam fanden heraus, dass dieser Sekretionsweg aus homologen Genen des normalen Sekretionsweges besteht, die auf die Sekretion von GspB

spezialisiert sind [91]. Ob weitere Proteine mit diesem Sekretionsweg transportiert werden, wurde in dieser Studie nicht herausgefunden.

1.6.4.5 Bindung an Fibronektin durch CshA und FbpA

CshA ist ein schweres zellwandverankertes Protein, das Fibronektin bindet. Es befindet sich auf den Fimbrien auf der Zellwand von *S. gordonii* [83].

Zusätzlich trägt es zur Hydrophobie der Oberfläche des Bakteriums bei [83].

Ein weiteres Molekül, das Fibronektin bindet, ist FbpA. Es wird aber vermutet, dass dieses eher regulatorische Bedeutung hat, da es abhängig vom Sauerstoffgehalt hochreguliert wird und in nicht so großen Mengen wie CshA vorkommt [92].

Mutanten von *S. gordonii* ohne CshA und FbpA zeigten in Versuchen von Giomarelli et al. eine deutlich schwächere Bindung an Kollagen [93].

1.6.4.6 Bindung an Glykoproteine durch SspA und SspB

SspA und SspB sind schwere zellwand-assoziierten Antigene [94] der I/II Polypeptid-Familie (Antigen I/II Family Polypeptides), die in allen oralen Streptokokken vorkommen. Sie binden an das Pellikel, speziell an „innate immunity scavenger receptor glycoprotein-340“ (gp-340) [85]. Sie können aber auch an Kollagen [95] und, abhängig von Hsa, an Thrombozyten [96] binden.

Speziell bei *S. gordonii* wurden 2 Proteine, die zu dieser Familie gehören, gefunden, SspA und SspB.

Diese beiden Proteine sorgen nicht nur für Adhäsion am Pellikel, sondern dienen auch *P. gingivalis* [97, 98], verschiedenen Actinomyceten und *Candida albicans* als Rezeptor, um an *S. gordonii* anzudocken [99, 100]. Es wird bereits versucht, den Rezeptor von *P. gingivalis* für SspA und SspB von *S. gordonii* mit einem Inhibitor zu blockieren, um die Bildung eines pathogenen Biofilms zu verhindern [101].

1.6.4.7 Bindung an prolinreiche Proteine

S. gordonii kann an prolinreiche Proteine (PRPs) im Pellicel binden, während es an PRPs im Überstand nicht bindet [102]. Dies ist vorteilhaft für das Bakterium, da es nur durch Anhaftung an eine Oberfläche in der Lage ist, einen Biofilm zu bilden. Es wird daher vermutet, dass die Bakterien an sogenannte „cryptopes“ binden, Bindungsstellen, die nur frei liegen, wenn das Protein an eine Oberfläche gebunden hat [102].

Scannapieco et al. beobachteten, dass *S. gordonii* PRPs in ähnlichem Maße wie Amylase bindet, während glykosylierte PRPs die Adhäsion eher verhinderten [39].

1.6.4.8 Bindung an Muzine durch MUC7 recognizing proteins

S. gordonii kann auch an MUC7, ein im Speichel vorkommendes und in Monomeren vorliegendes 200-250 kDa schweres Muzin [103] binden [104-106].

1.6.4.9 Herstellung von extrazellulären Glukanen durch Glykosyltransferase

Glykosyltransferasen (GTFs) sind extrazelluläre Enzyme, die Saccharose spalten und die entstehende Glukose zu Glukanen zusammenfügen. Glukane bilden einen wichtigen Bestandteil der Biofilmmatrix. *S. gordonii* besitzt im Gegensatz zu *S. mutans* nur eine GTF, die Glukane mit α -1,3 und α -1,6 Glykosidbindungen herstellt [107].

1.6.5 Weitere Eigenschaften

Da im Mundraum eine sehr dichte Besiedelung von mehreren hundert Bakterienarten besteht, ist dort der Selektionsdruck und die Behauptung gegenüber anderen Arten stark ausgeprägt.

Deshalb hat *S. gordonii* mehr als 16 Gene für den Laktose- und Galaktosemetabolismus, und kann Galaktose besser verwerten als *S. mutans* [108]. Trotzdem gab es Versuche, die zeigten, dass sich *S. mutans* in einem nur aus *S. mutans* und *S. gordonii* bestehenden Biofilm im Rattenmodell

besser durchsetzt [109].

S. gordonii kann auch das für andere Bakterien schädliche Wasserstoffperoxid produzieren, um das Wachsen von Konkurrenten zu verlangsamen [108], und ist gleichzeitig dazu in der Lage, die Bakteriozin-Produktion von *S. mutans* zu unterbinden [110].

Eine in vivo Studie zur Adhäsion verschiedener Bakterien auf Plättchen aus verschiedenen Implantatmaterialien (gefrästes Titan, gegossenes Titan und Zirkondioxid) zeigte für *S. gordonii* nach 24 Stunden im Mundraum, gemessen mit „DNA checkerboard hybridisation“ und dem Friedman-Test keine signifikanten Mengenunterschiede [111].

S. gordonii ist auch dazu in der Lage, extrazelluläre DNA (eDNA) freizusetzen, allerdings nur, wenn in der Umgebung eine erhöhte Konzentration von H₂O₂ herrscht [112].

Abgesehen von den vielen Bindungsstellen für Bestandteile des Pellicels hat *S. gordonii* auch zahlreiche Bindungsstellen für andere Bakterienarten, zum Beispiel für *Fusobacterium nucleatum* an dessen RadD Adhäsion [113], *Actinomyces oris* oder *P. gingivalis* [5].

S. gordonii kommuniziert nicht nur mit Bakterien, sondern hat auch Auswirkungen auf Pilze. So verstärkt es die Adhäsion von *Candida albicans* in der Mundhöhle über Genregulation von *Candida albicans* in Anwesenheit von *S. gordonii* [114].

1.7 QCM-D

1.7.1 Entwicklung und Funktion

Die Schwingquarzmikrowaage oder QCM (Englisch von Quartz Crystal Microbalance) ist ein Messgerät, das kleinste Masseveränderungen im Nanogrammbereich mithilfe von Frequenzänderungen eines schwingenden Quarzkristalls detektieren kann. Das publizierte Günther Sauerbrey erstmals 1959 [115].

Wenn ein scheibenförmiger Quarzkristall von beiden Seiten von Goldelektroden bedeckt wird und an diese eine Spannung angelegt wird, verformt sich der Quarzkristall aufgrund des inversen piezoelektrischen Effekts. Wird ein Wechselstrom angelegt, schwingt der Quarzkristall periodisch. Bei einer QCM-D-Messung wird dieser Effekt ausgenutzt. Wenn die Frequenz (F) des angelegten Wechselfeldes mit der Eigenfrequenz des Quarzkristalls übereinstimmt, breitet sich eine mechanische Deformationswelle senkrecht zur Quarzoberfläche aus, das heißt die beiden Oberflächen des Quarzes schwingen gegenläufig zueinander in einer Dickenscherschwingung.

Um das zu erreichen, muss der Quarzsensord im richtigen Winkel aus einem Quarzkristall herausgeschnitten werden. Es hat sich der AT-Schnitt bewährt, bei dem der Sensor in einem Winkel von $+35^{\circ} 15'$ aus dem Quarz geschnitten wird [115]. So geschnitten schwingt der Quarzsensord mit angelegtem Wechselstrom in einer reinen Dickenscherschwingung wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt und wird zusätzlich nur in sehr geringem Umfang durch Temperaturänderungen beeinflusst.

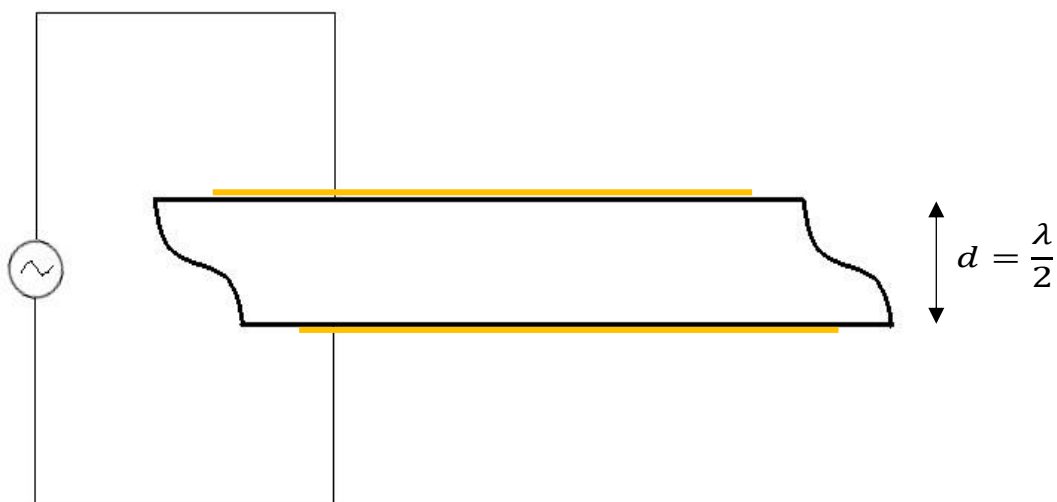


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Querschnitts eines Schwingquarzes mit an die Goldelektroden angelegter Wechselspannung in Dickenscherschwingung in maximaler Auslenkung.

Die Dicke des Quarzsensors bestimmt dessen Resonanzfrequenz.

Die mechanische Deformation, die beim Anlegen eines Wechselstroms erzeugt wird, ist bei einem kristallinen Material wie dem Schwingquarz symmetrisch. Hat die Wechselspannung die gleiche Frequenz wie die Grundfrequenz des Schwingquarzes, entsteht eine stehende akustische Welle im Kristall.

In Resonanz fällt die Kristalloberfläche mit dem Schwingungsbauch zusammen, dem Punkt, an dem die stehende Welle ihre größte Amplitude hat.

Folglich ist die Dicke des Quarzes (d) halb so groß wie die Wellenlänge der erzeugten stehenden Welle (λ).

Abhängig von der Resonanzfrequenz f_n ergibt sich die Formel

$$f_n = \frac{nc}{2d}$$

Hierbei ist

c = Schallgeschwindigkeit im Quarz (3340 m/s bei Quarzen mit AT-Schnitt)

n = Nummer der Obertonschwingung

Folglich hat ein Schwingquarz mit einer Dicke von 0,334 mm eine Grundfrequenz von 5 MHz.

Aufgrund dieser Abhängigkeit stellte Sauerbrey 1959 die Sauerbrey-Gleichung auf, mit deren Hilfe sich die aufgelagerte Masse auf einem Quarzsensoren ausrechnen lässt [115].

Die Sauerbrey-Gleichung nimmt an, dass die adsorbierte Masse eine Verdickung des darunterliegenden Quarzes ist, so kann mit der veränderten Frequenz das Gewicht der aufgelagerten Masse bestimmt werden.

$$\Delta m = - \frac{A \sqrt{\rho_q \mu_q}}{2f_0^2} \Delta f$$

Hierbei ist

Δm = Massenänderung in kg

A = Piezoelektrisch aktive Fläche des Quarzes in m^2

ρ_q = Dichte des Quarzes in kg/m^3

μ_q = Schubmodul des Quarzes in $kg/(s^2 \times m)$

f_0 = Resonanzfrequenz in Hz

Δf = Frequenzänderung in Hz

Bis 1980 benutzte man QCM nur im Vakuum oder Gas [116], vor allem, um Gasadsorption und die Masse dünner, im Vakuum aufgebracht Schichten von Metallen zu bestimmen [116, 117]. Dann zeigten Nomura und Hattori, dass QCM nicht nur an der Grenzfläche zu Gas benutzt werden konnte, sondern auch, wenn die Oberfläche des Quarzes von Flüssigkeit bedeckt war, in diesem Fall um die mikromolare Konzentration einer Cyanidlösung zu definieren [118].

Es wurde weitere Forschung im flüssigen Milieu durchgeführt, und ein weiterer Messwert, die Dissipation (D), wurde miteinbezogen [119]. Geräte, die auch die Dissipation zusätzlich zur Frequenz aufzeichnen, werden QCM-D-Geräte (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring) genannt.

Dissipation bezeichnet einen Vorgang, bei dem Bewegungsenergie in Wärme umgewandelt wird und so die ursprüngliche Bewegungsenergie geringer wird. Zur Bestimmung der Dissipation wird die Anregung des Quarzes periodisch unterbrochen, kurz nachdem der Quarz in Schwingung versetzt wurde. Die evaneszente Welle klingt ab, und der Quarz schwingt aus. Abhängig vom Kontaktmedium und der auf dem Quarz angelagerten Masse fällt die Amplitude in unterschiedlicher Kinetik ab. Aus diesen Daten der gedämpften Schwingung kann die Dissipation errechnet werden.

Mit der Dissipation wurde es möglich, auch wasserhaltige und viskoelastische Filme zu detektieren und zu charakterisieren [120], was für die Anwendung im

Bereich der Biologie wichtig war.

Ist ein Film stark wasserhaltig, kommt die Schwingung nach Unterbrechung der Anregung sehr schnell zum Stillstand, und der Film hat eine große Dissipation. Ein sehr fester, starr gebundener Film verliert hingegen nicht viel von seiner Energie und schwingt lange anregungsfrei weiter, die Dissipation ist gering. Die Dissipation wird vom QCM-D-Gerät genau wie die Frequenz zeitaufgelöst dargestellt. Sie ist dimensionslos und wird in 10^{-6} angegeben, da dieses Spektrum bei wasserhaltigen Filmen üblich ist [121].

Wird auf dem Sensor in wässrigem Milieu ein Biofilm gebildet, ist dieser grundsätzlich wasserhaltig und dämpft die Schwingung in hohem Ausmaß. Die Masse dieser viskoelastischen Filme kann nicht direkt mit der Sauerbrey-Gleichung berechnet werden. Diese kann nur akkurat bei starren und homogenen Filmen mit kleiner Dissipation (unter 10^{-7}) benutzt werden [122]. Ist die Dissipation größer, unterschätzt das Ergebnis der Gleichung die wahre Masse [123].

Für die Massenberechnung homogener viskoelastischer Filme können Modelle wie zum Beispiel das Voigt-Modell herangezogen werden [124].

Man kann auf dem Quarzsensor in flüssigem Milieu grob unterteilt vier verschiedene Schichttypen antreffen, dies sind homogene starre Schichten (Metalle), inhomogene starre Schichten (Adsorption kleiner Proteine), homogene weiche Schichten (Adsorption großer Proteine) und inhomogene weiche Schichten (Viren, Bakterien, globuläre Proteine) [125].

Mit modernen QCM-D-Geräten können auch ungerade Obertonfrequenzen der Resonanzfrequenz gemessen werden, auch bei diesen wird im Quarzsensor eine stehende Welle erzeugt und die Massenbeladung kann mit der Sauerbrey-Gleichung berechnet werden. Die Obertonfrequenzen erzeugen kürzere stehende Wellen, sie reichen nicht so weit in das Medium über dem Quarzsensor hinein. Kanazawa und Gordon stellten mithilfe eines Modells eine Gleichung auf, mit der die Länge der abklingenden evaneszenten Welle in wässrigem Medium ausgerechnet werden kann [126]. Es berücksichtigt die Viskosität und Dichte der Flüssigkeit, sowie das E-Modul und die Dichte des Quarzes [126]. Bei dem in

dieser Versuchsreihe verwendeten Gerät von Q-Sense (D300, Göteborg, Schweden) mit einer Grundfrequenz von 5 MHz reicht die stehende Welle in Wasser 252 nm in das Medium, in der 3. Obertonfrequenz (15 MHz) 146 nm, in der

5. Obertonfrequenz (25 MHz) 113 nm, und in der 7. Obertonfrequenz (35 MHz) 95 nm.

1.7.2 QCM-D im Bereich Biologie

QCM kann in der Biologie und deren Grenzbereichen auf vielfältige Art eingesetzt werden. So können im Bereich der Materialwissenschaften Nanopartikel mithilfe von QCM-D genauer untersucht werden [127, 128] und in der Pharmakologie kann QCM-D durch die Immobilisation von Antikörpern auf der Sensoroberfläche zur Detektion von Antigenen genutzt werden [129-131].

QCM-D wird in der Biologie vor allem eingesetzt, um Makromoleküle genauer zu charakterisieren [132, 133] und deren Wechselwirkungen nachzuweisen [120, 121, 134]. Dabei sind vor allem Interaktionen zwischen Proteinen und Oberflächen, und Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen interessant (z. B. Antikörper, Adhäsine) [134, 135].

Bei Versuchen mit lebenden Zellen und auch bei den in dieser Versuchsreihe benutzten Bakterien ergeben sich aufgrund ihrer Größe von ca. 0,5 µm gewisse Schwierigkeiten. Da die evaneszente Welle der Grundfrequenz, die am tiefsten in die Probe misst, lediglich 252 nm weit in das wässrige Medium hineinreicht, stellt sich die Frage, inwieweit Bakterien überhaupt detektiert werden können. Die Bakterien verhalten sich nicht wie ein starrer Film, deshalb kann ihre Masse nicht mit der Sauerbrey-Gleichung berechnet werden. Auch ein Modell für viskoelastische Filme, wie es häufig bei Proteinadsorption angewandt wird [136], kann nicht einfach übernommen werden, da es homogene Filme berechnet. Innerhalb der Bakterien sind verschiedene Strukturen mit unterschiedlichen viskoelastischen Eigenschaften vorhanden. So unterscheidet sich zum Beispiel eine bakterielle Zellwand sehr von ihrem Zellplasma. Berücksichtigt man nun

noch das zwischen den Bakterien befindliche Wasser wird klar, dass der gebildete Film schwer zu charakterisieren ist.

Weitere Probleme ergeben sich, wenn man berücksichtigt, dass Bakterien mit unterschiedlich langen Fimbrien besetzt sein können. Olsson et al. fanden heraus, dass dadurch die Frequenzsignale verändert werden [137].

Trotzdem werden immer mehr Versuche mit Zellen durchgeführt, so konnten beispielsweise Veränderungen des Zytoskeletts dargestellt werden [138, 139]. Gemessen an den Veröffentlichungen gibt es aber immer noch deutlich mehr Versuche mit Makromolekülen als mit lebenden Zellen [134, 140].

1.8 Wissenschaftliche Ziele

Aufgrund der Vielfalt der eingesetzten Werkstoffe sind die Materialwissenschaften in der Zahnmedizin eine wichtige Disziplin, an der in großem Maße geforscht wird. Die Entwicklung von antiadhäsiven bzw. bakteriziden Werkstoffoberflächen, an die weniger Bakterien adhäreren bzw. die Bakterien abtöten, ist in der Implantologie eines der vorrangigen Ziele. Die genauen Mechanismen der bakteriellen Adhäsion sind dabei aber noch weitestgehend unklar, da ihnen ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl oraler Bakterien und Proteine mit der Oberfläche des Werkstoffes zugrunde liegen. Aufgrund ihrer Korrosionsbeständigkeit und Bioverträglichkeit gelten Titanimplantate nach wie vor als Goldstandard für den Ersatz natürlicher Zahnwurzeln in der Zahnmedizin [141].

S. gordonii spielt eine Schlüsselrolle bei der initialen Besiedelung oraler Oberflächen, da es viele bekannte Bindungen zu verschiedenen Speichelproteinen ausbildet. Durch Koaggregation binden im weiteren Verlauf der Biofilmbildung andere Bakterienspezies an *S. gordonii* und schaffen wiederum Bindungsstellen für weitere Koaggregation [85].

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bindungsvorgänge, die sich zwischen Bakterium und Titan und zwischen Bakterium und Pellikel abspielen, darzustellen.

Für diesen Zweck wird ein QCM-D-Gerät benutzt. QCM-D ist ein massesensitives Messgerät, das in den letzten 15 Jahren stark an Bedeutung gewonnen hat. Es zeichnet akustische Signale in Echtzeit auf, ohne die Bakterien in der Messzelle zu verändern. QCM-D hat gegenüber optischen Methoden, wie zum Beispiel der Ellipsometrie, den Vorteil, dass es sowohl den Wassergehalt als auch die adsorbierte Masse im Verlauf der Adhäsion detektieren kann. Es ist insbesondere zur Untersuchung von Grenzflächen geeignet. Trotzdem werden noch wenige Versuche mit lebenden Zellen, im Vergleich zu Versuchen mit Proteinen, durchgeführt. QCM-D gibt Masseadsorptionen zeitaufgelöst mithilfe einer Frequenzkurve wieder. Üblicherweise deutet ein Abfall dieser Kurve auf eine Massezunahme auf dem Quarzsensoren hin. Die Anwendung von QCM-D in immer weiteren Fachbereichen zeigte aber schon in diversen Versuchen mit lebenden

Zellen und Bakterien während der Interaktion positive Frequenzänderungen (siehe 4.3), die nicht mit der Sauerbrey-Gleichung erklärt werden konnten, da gleichzeitig eine Adhäsion von Zellen auftrat.

Versuche von Krajewski et al. [84] und Xu et al. [142] mit QCM-D zeigten, dass auch *S. gordonii* entgegen der gängigen Massenbeladungstheorie auf gold- und titanbeschichteten QCM-D-Quarzen mit einer Resonanzfrequenz von 10 MHz positive Frequenzänderungen zeigen kann.

Ein Faktor für das Auftreten von positiven Frequenzänderungen könnte die Stärke des Verbundes der Bakterien mit der Sensoroberfläche sein. Daher wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die positiven Frequenzänderungen auch bei einer Resonanzfrequenz von 5 MHz auf Titan, das eine Implantatoberfläche simuliert, auftreten und inwiefern sich die Frequenzkurven während der Biofilmbildung ändern, wenn der Titanquarz zuvor mit Speichelproteinen konditioniert wurde und sich ein Pellikel bildet. Da unter anderem auch das QCM-D-Schwingungssystem und dessen Resonanzfrequenz eine Rolle beim Auftreten von positiven Frequenzänderungen spielen könnten, werden mit dem 5 MHz-System zusätzlich zur Grundfrequenz die ungeraden Obertonfrequenzen bei 15 MHz, 25 MHz und 35 MHz untersucht.

Um die Besiedelung mit Bakterien zu erfassen, wird der Quarzsensoren nach 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden und nach 3 Stunden aus der Messzelle des QCM-D-Geräts entnommen, und die Bakterien werden quantifiziert und untersucht.

Man kann aufgrund der hohen Zahl vorhandener Adhäsine von *S. gordonii* für Bestandteile des Speichels davon ausgehen, dass die Steifigkeit des Biofilms, der auf einem Pellikel gebildet wurde, größer wird. Ziel ist es, diese Veränderungen mit QCM-D darzustellen und die Ergebnisse in die bekannten Theorien einzuordnen.

Um ein genaues Bild der Vorgänge an der Grenzfläche zu bekommen, werden die Grundfrequenz und die ungeraden Obertonfrequenzen des QCM-D ausgewertet, um eventuelle Unterschiede in verschiedenen Abständen (252 nm, 146 nm, 113 nm, 95 nm) vom Quarzsensoren darzustellen. Darüber hinaus wird die Dissipation ausgewertet, um festzustellen, ob der auf Pellikel gebildete Bakterienfilm mehr oder weniger Flüssigkeit enthält als ohne Pellikel.

2 Material und Methoden

2.1 Züchten der Bakterien

Gefrierkulturen von *S. gordonii* DL1 wurden in 50 ml nach Herstellerangaben angemischtes Schaedlermedium (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Nach 12-13 Stunden im Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) bei 37 °C wurden die Bakterien bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 4000 g für 5 Minuten zentrifugiert (Megafuge 1.0 Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) und das Medium im Überstand abgegossen. Um das verbliebene Bakterienpellet aufzulösen, wurde es auf einem Vortexmischer (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA) gemischt, bis das Pellet sichtbar aufgelöst war, dann wurden 5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) zugegeben und die Bakterien wurden mehrmals mit einer 5-ml-Pipette aufgenommen und wieder entlassen. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) der Bakterien mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite F50, Tecan Group, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Abhängig vom Ergebnis wurde weiter mit PBS verdünnt, bis sich eine OD von 0,54 einstellte (OD von 0,54 entspricht 1×10^8 Bakterien/ml). So war eine konstante Bakterienzahl im Medium innerhalb der einzelnen Versuche gewährleistet.

2.2 Herstellung des modifizierten Speichels

Speichel wurde von einem gesunden Spender nüchtern am Morgen durch Kauen einer Paraffintablette gesammelt. Der Speichel wurde modifiziert, indem die Bakterien und größere Muzine herausgefiltert wurden. Dafür wurde der Speichel zuerst durch ein Epithelzellsieb (Cell Strainer, Porengröße 70 µm, BD Falcon, Durham, USA) gegossen und anschließend bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 14000 g und einer Temperatur von 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und nacheinander mit einer Spritze durch

immer kleinporigere Filter gedrückt (5 µm; 1,2 µm; 0,45 µm Porengröße; Acrodisc Syringe Filters, Pall Corporation, St. Columb, Großbritannien).

Der nun modifizierte Speichel wurde portioniert, 1:5 mit PBS verdünnt und bei -20 °C eingefroren.

Vassilakos et al. wiesen schon 1992 mit Ellipsometrie nach, dass bei einer Speichelkonzentration von 10 % auf Siliziumdioxidoberflächen die gleiche Proteinmenge adsorbiert wie bei einer Speichelkonzentration von 100 % [143]. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Sicherheit, da die Versuche in einer Durchflusszelle stattfanden, eine Speichelkonzentration von 20 % verwendet.

2.3 QCM-D-Sensoren

Für die Versuche wurden Titan-Schwingquarzsensoren vom Typ QSX 310 (Q-Sense, Göteborg, Schweden) verwendet. Auf deren Oberfläche ist von Seiten des Herstellers, wie in Abbildung 3 gezeigt, eine Titanschicht von 50 nm Dicke aufgesputtert. Die Sensoren haben einen Durchmesser von 14 mm und eine Dicke von 0.3 mm und sind im AT-Schnitt geschnitten, damit eine reine Dickenscherschwingung auftritt.

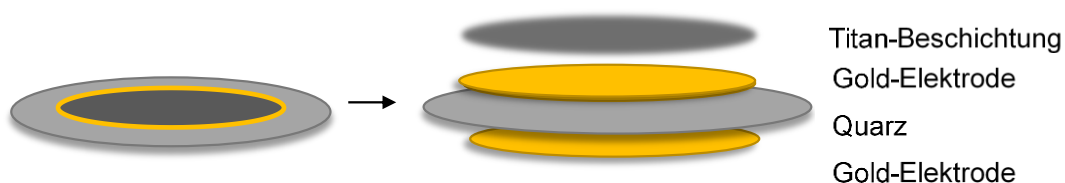


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Quarzsensors eines QCM-D-Geräts.

Die Titanoberflächen der Quarzsensoren weisen eine quadratische Rauheit (rms, root-mean-squared roughness) von weniger als 1 nm auf.

Vor jedem Versuch wurden die Quarzsensoren für 5 Minuten im Ultraschallbad mit Ethanol 70 % gereinigt und anschließend mit N₂ getrocknet.

Die Sensoren wurden nach einem Versuch mit dem nachfolgenden Protokoll gereinigt:

1. 15 Minuten im Ultraschallbad mit Hellmanex 2 % (Hellma, Müllheim, Deutschland) bei 30 °C
2. Erneut 15 Minuten im Ultraschallbad bei 30 °C mit Hellmanex 2 %
3. Einlegen in Millipore Wasser für 10 Minuten
4. 10 Minuten im Ultraschallbad mit Ethanol 70% bei Raumtemperatur
5. Einlegen in Millipore Wasser für 10 Minuten
6. Trocknen mit N₂

Je ein gereinigter Quarzsensoren wurde exemplarisch mit einer Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung (siehe 2.8.2) und mit Kristallviolett (siehe 2.8.1) gefärbt, um auszuschließen, dass Bakterienreste auf der Oberfläche vorhanden waren.

2.4 QCM-D-Messung

Für die Messung wurde der in Abbildung 4 und Abbildung 5 gezeigte Aufbau verwendet.

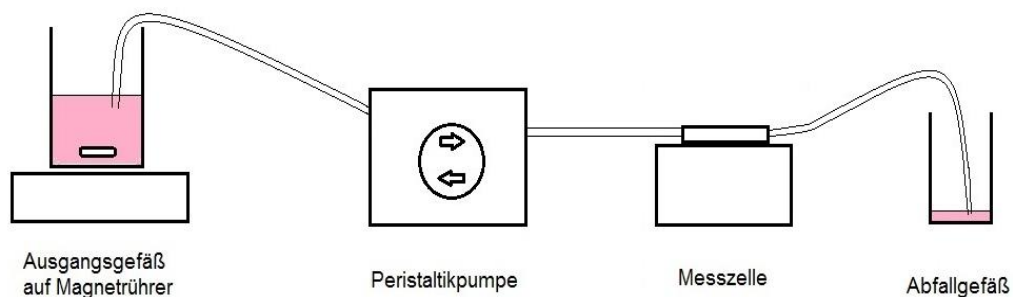


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Versuche mit QCM-D. An die Messzelle ist das QCM-D-Gerät angeschlossen.

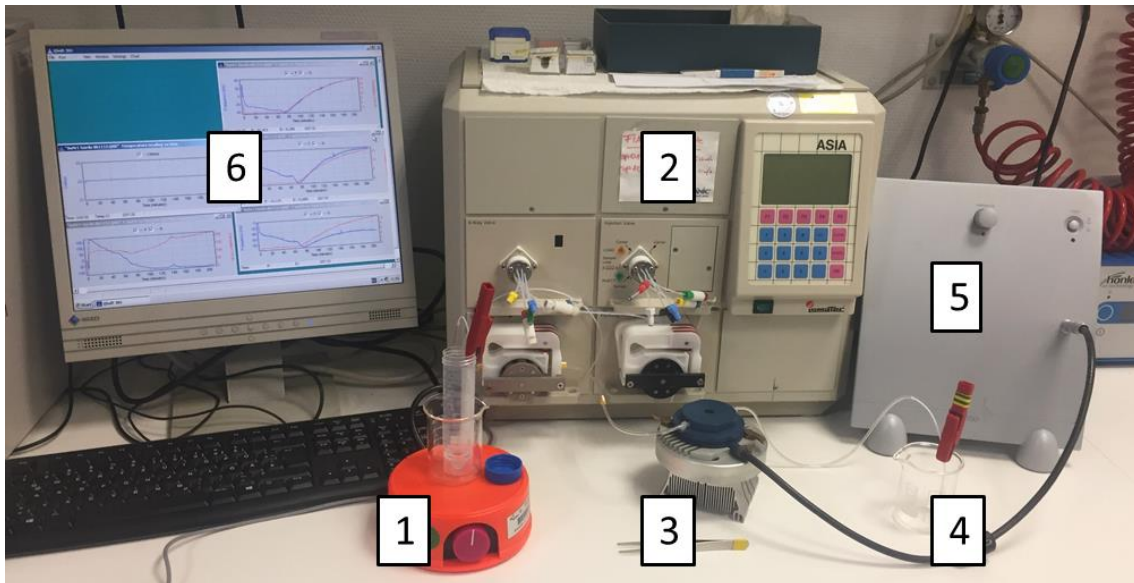


Abbildung 5: Aufbau einer QCM-D Messung mit

- 1 Ausgangsgefäß auf Magnetrührer*
- 2 Peristaltikpumpe Ismatec ASIA*
- 3 Fenster-Durchflusszelle*
- 4 Abfallgefäß*
- 5 QCM-D Elektronik-Einheit*
- 6 Computer mit QCM-D Software*

Pufferlösung oder Bakteriensuspension wurde von einem Ausgangsgefäß auf einem Magnetrührer über ein Schlauchsystem, das an eine Peristaltikpumpe (Ismatec ASIA, Illinois, USA) angeschlossen war, mit einer Flussrate von 110 $\mu\text{l}/\text{min}$ in eine Fenster-Durchflusszelle (Typ QWiC 301, Q-Sense, Göteborg, Schweden) geschickt. An die Fenster-Durchflusszelle war die QCM-D Elektronik-Einheit (Q-Sense QE 301, Göteborg, Schweden) angeschlossen. Die Werte für die Frequenzen und Dissipationen, die das QCM-D-Gerät maß, wurden auf einem PC mit der Steuerungssoftware von Q-Sense (QSoft) live dargestellt, aufgezeichnet und gespeichert.

Danach wurde die Flüssigkeit durch das Schlauchsystem in ein Abfallgefäß geführt.

Die Fenster-Durchflusszelle war auf einer Basis montiert, die für eine konstante Temperatur sorgte und Erschütterungen abdämpfte. Abbildung 6 zeigt die Fenster-Durchflusszelle und die daran angeschlossenen Elemente.

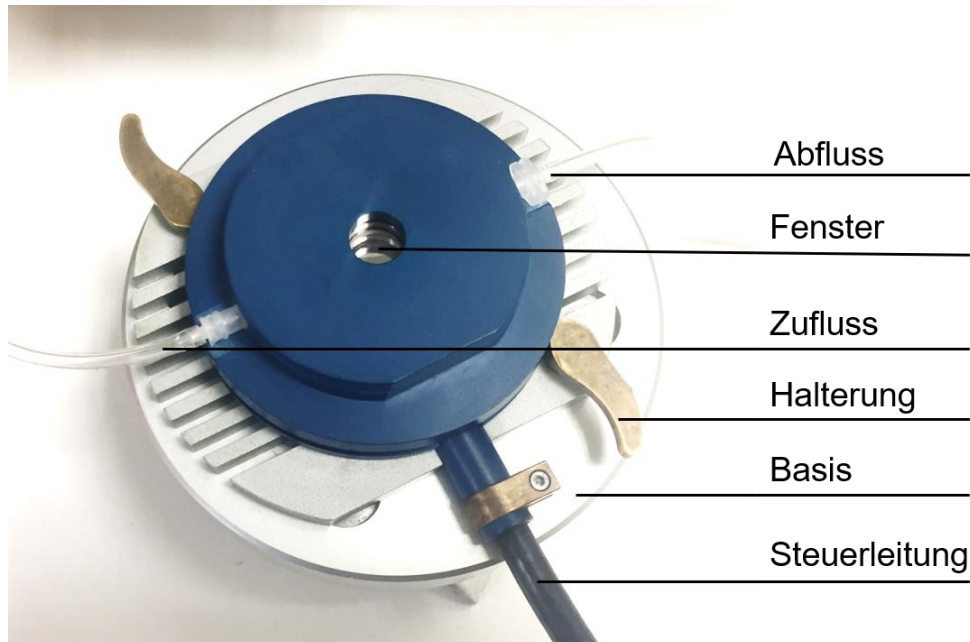


Abbildung 6: Fensterzelle QWiC 301 mit angeschlossenen Elementen.

Das QCM-D-Gerät vom Typ D300 (Q-Sense, Göteborg, Schweden) war über die Steuerleitung direkt an die Messzelle angeschlossen, detektierte die Signale live und zeichnete diese zeitaufgelöst mit 18 Datenpunkten pro Minute auf.

Das D300-Gerät von Q-Sense misst mit einer Grundfrequenz von 5 MHz und zeichnet zusätzlich die dritte (15 MHz), fünfte (25 MHz) und siebte (35 MHz) Obertonfrequenz auf.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, wurde zu Beginn der Messung PBS durch das Schlauchsystem geschickt, bis das QCM-D-Gerät eine konstante Frequenz mit einem Drift von unter 2 Hz pro Stunde und eine konstante Dissipation mit einem Drift unter $0,2 \times 10^{-6}$ pro Stunde zeigte. Diese Frequenz wurde als Grundlage und Bezugslevel für die weitere Messung verwendet. Alle Frequenzänderungen wurden in Relation zu dieser Baseline berechnet.

Im nächsten Schritt wurden die in PBS suspendierten Bakterien durch die Messzelle geschickt.

Die Bakterien wurden für 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden oder 3 Stunden durch die Messzelle geschickt.

Am Ende des Versuchs wurde 20 Minuten mit PBS gespült, um ein Medium zu erhalten, das vergleichbar mit dem Ausgangsmedium der Baseline war, um Differenzen zu berechnen. Dies war erforderlich, da sonst unterschiedliche Viskositäten oder Ionenstärken der umgebenden Flüssigkeit zu Verfälschungen der Messung führen könnten. Mit dem gleichen Umgebungsmedium zu Beginn und Ende der Messung konnte die Frequenzänderung, die allein die Bakterien bei der Adsorption verursachten, berechnet und ausgewertet werden.

Bei den Messungen mit Speichel wurde nach PBS erst für 30 Minuten mit modifiziertem Speichel, dann für 30 Minuten erneut mit PBS gespült. Erst danach wurden *S. gordonii* in PBS über den Quarzsensoren geschickt. Bei den Messungen mit Speichel wurden die Frequenzen und Dissipationen, die sich nach dem 2. Spülen mit PBS (nach dem Speichel) einstellten, als Baseline verwendet, damit die aufgezeichneten Kurven nur die Bakterienadhäsion und nicht die Speicheladsorption zeigen.

Tabelle 1: Darstellung der Flüssigkeiten, die bei den verschiedenen Messungen durch die Messzelle geschickt wurden.

Messungen ohne Pellikel (1-3)	Messungen mit Pellikel (1P-3P)
PBS bis Baseline	PBS
	Modifizierter Speichel 20 % in PBS für 30 min
	PBS für 30 min, als Baseline
<i>S. gordonii</i> für 30 min, 1 h, 2 h oder 3 h	<i>S. gordonii</i> für 3 h
PBS für 20 min	PBS für 20 min

Die Bakteriensuspensionen wurden mithilfe eines Magnetrührers gemischt, damit eine konstante Anzahl durch die Messzelle geleitet werden konnte und die Bakterien sich nicht absetzen konnten.

Messungen, die 3 Stunden lang ohne Pellikel liefen, werden im Folgenden Messung 1-3 genannt.

Messungen, die 3 Stunden mit Pellikel liefen, werden Messung 1P - 3P genannt.

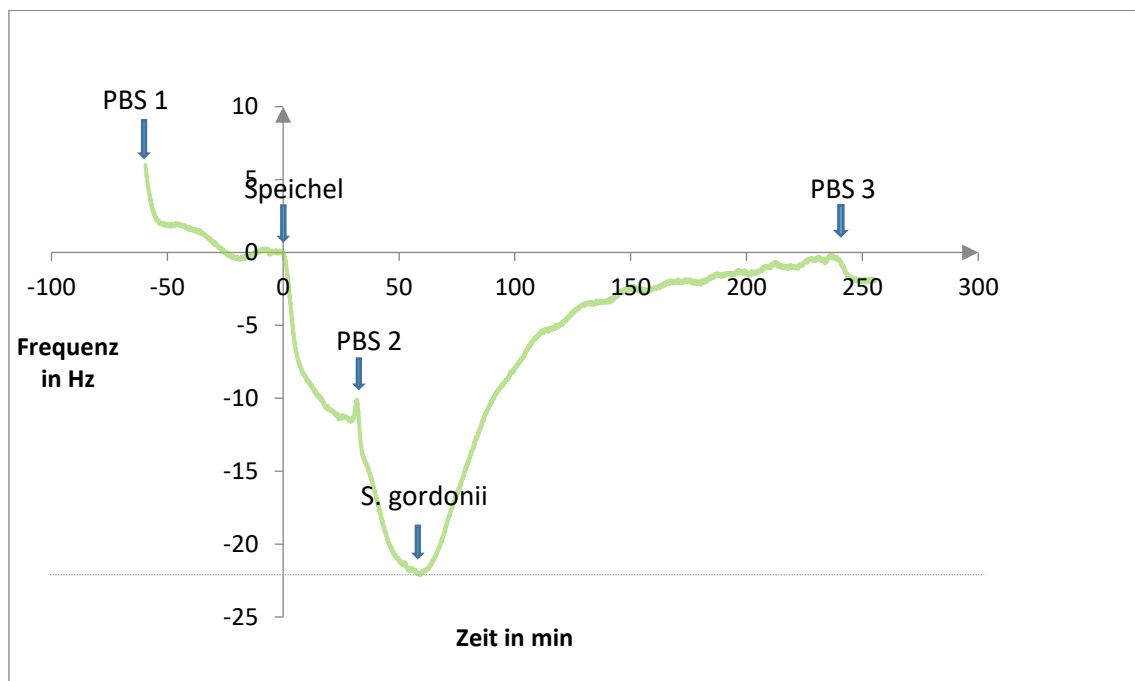


Abbildung 7: Darstellung einer typischen Messung mit Pfeilen bei den Zugabezeitpunkten der verschiedenen Komponenten. Bei Messungen ohne Speichel wäre die x-Achse die Baseline, mit Speichel ist es die Frequenz, die sich nach PBS2 einstellt (horizontale Linie eingezeichnet).

Abbildung 7 zeigt eine typische Messung mit den Reaktionszeitpunkten der einzelnen Flüssigkeiten. Angeschlossen wurden die Flüssigkeiten circa 7 Minuten früher, das ist die Zeit, die die Flüssigkeit brauchte, um die Messzelle durch die Schläuche zu erreichen.

Wie in Abbildung 7 veranschaulicht, wurden bei Messungen mit Pellikel die Frequenzwerte, die sich nach dem 2. Spülen mit PBS, nach Adsorption der Speichelproteine einstellten, als Baseline benutzt. So werden von den zwei Messungstypen (mit und ohne Pellikel) nur die Frequenzänderungen, die die

Bakterien auslösen, verglichen, und nicht die der Speichelproteine.

Die Temperatur der Messzelle wurde konstant bei $22,3 \text{ °C} \pm 0,05 \text{ °C}$ gehalten, da sich schon durch kleinste Temperaturänderungen die Viskosität und Dichte der Flüssigkeit verändert und der Quarzsensordies mit einer Frequenzänderung anzeigen würde.

Am Ende der Messungen wurden die Schwingquarze aus der Messzelle entnommen und zur Fixierung der Bakterien sofort in 3 % Paraformaldehyd (PFA) gelegt. Danach wurde mit Kristallviolett (KV) gefärbt.

2.5 Reinigung

In die Messzelle wurde nach jedem Versuch ein Quarzsensoreingebaut, der nur für die Reinigung verwendet wurde. Dann wurde das komplette System nach dem folgenden Protokoll gereinigt:

1. Ethanol 70 % mit maximaler Geschwindigkeit durch das System geschickt, dann 30 Minuten stehen gelassen
2. Hellmanex 2 % mit maximaler Geschwindigkeit durch das System geschickt, dann für 10 Minuten stehen gelassen
3. Millipore Wasser mit maximaler Geschwindigkeit durch das System geschickt, dann 10 Minuten stehen gelassen
4. Luft durch das System geschickt
5. Reinigungsquarz ausgebaut
6. Messzelle auseinandergelassen und die reinigungsfähigen Bestandteile mit dem Reinigungsquarz zusammen 10 Minuten in Ultraschall mit Ethanol 70% gereinigt
7. Trocknung mit N_2

Die Schläuche wurden vor jedem neuen Versuch ausgetauscht, um eventuelle Biofilmbildung darin auszuschließen.

2.6 Kontaktwinkelmessung

Eine Kontaktwinkelmessung wurde einmalig mit einem Tropfenkonturanalysesystem (DSA 10-MK2, Krüss, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Ein Wassertropfen von 2 µl wurde auf der Titansensoroberfläche platziert und nach 20 s wurde der Kontaktwinkel mit der Circle fit Methode berechnet, um die Oberfläche der Quarzsensoren zu charakterisieren.

2.7 Vorversuche

Zu Beginn der Versuchsreihen wurden Pilotmessungen mit Laufzeiten von über 24 Stunden und mit Zuckerzusatz (in Form von reiner Glukose und in einem weiteren Versuch mit Glukose und Saccharose kombiniert) als Nahrung für die Bakterien durchgeführt. Da aber schon Glukoselösung allein die Signale, die der Quarzsensor aufzeichnete, stark veränderte, wurde beschlossen, kürzere Messungen ohne Nahrungszusatz für die Bakterien durchzuführen.

Weiterhin wurden in Vorversuchen die Bakterien statt in PBS in verdünntem und modifiziertem Speichel suspendiert. Siehe dazu 3.1. Agglutination.

2.8 Färbung der Bakterien

2.8.1 Kristallviolett

Die Quantifizierung erfolgte mit Kristallviolett (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Es wurden bereits Versuche mit dieser Technik durchgeführt, um Streptokokken [144] und auch *S. gordonii* zu quantifizieren [145].

Um die Bakterien zu quantifizieren, wurde der Quarzsensor nach der Messung 15 Minuten lang in KV-Fixierlösung gelegt und anschließend 3-mal vorsichtig in destilliertes Wasser getaucht, um überschüssige Farbe abzuwaschen. Um zu verhindern, dass auf der Unterseite Farbe verblieb, wurde der Quarz mehrmals auf ein Filtertuch gelegt und dann wieder mit der Unterseite in destilliertem Wasser geschwenkt. Es folgte ein letzter Spülgang mit destilliertem Wasser.

Der Quarz wurde 10 Minuten lang in eine 24 Well Platte mit 300 µl Methanol gelegt, um die Farbe aus den Bakterien herauszulösen. 250 µl des Methanol-KV-Überstands wurden abpipettiert und in einer 96-Well Platte im Mikrotiterplatten-Lesegerät (340 ATTC, Tecan-Group, Schweiz) photometrisch bestimmt.

Die gefärbten Quarze wurden unter einem Binokular (Wild Makroskop M400, Heerbrugg, Schweiz) untersucht und es wurden Bilder mit einer Spiegelreflexkamera (Nikon 550D, Tokio, Japan) erstellt.

2.8.2 Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung

Um sicherzustellen, dass die Bakterien über die gesamte Versuchsdauer lebten, wurde nach einer 4-stündigen Messung ein Quarzsensordetektor mit einem Live/Dead BacLight Viability Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) gefärbt. Der Quarz wurde unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Optiphot-2, Nikon, Tokio, Japan) untersucht und es wurden Bilder mit einer auf das Mikroskop montierbaren Kamera (Nikon 550D, Tokio, Japan) erstellt.

2.9 Statistische Auswertung

Die Frequenz und die Dissipation sind in dieser Arbeit deskriptiv als Mittelwerte und Standardabweichung (StAbw) dargestellt. Mittelwertvergleiche wurden über den Student's t-test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

Um Zusammenhänge zwischen Frequenz und Dissipation und optischer Dichte zu erfassen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Agglutination

In Vorversuchen wurden die Bakterien nicht in PBS, sondern in verdünntem und modifiziertem Speichel suspendiert und durch die QCM-D-Messzelle geschickt. Es stellte sich jedoch heraus, dass dies zu einer massiven Ausfällung und Verklumpung dieser Bakterien führte. Die Messzelle war nach Stunden komplett von flockigem Material ausgefüllt, durch das Fenster war die Metalloberfläche des Quarzsensors nicht mehr zu erkennen (Abbildung 8). Unter dem Mikroskop zeigte das flockige Material die typische Kettenform von Streptokokken (Abbildung 9). Diese Beobachtung spricht für eine starke Bindung zwischen Bakterium und Speichel. Da diese Verklumpungen bei längeren Messungen mit in PBS suspendierten Bakterien nicht stattfanden, kann angenommen werden, dass die Aggregate nicht nur aus Bakterien, sondern auch aus Speichelbestandteilen bestanden.

Abbildung 8 zeigt Bilder nach einer Messung von 25 Stunden. Allerdings fielen leichte Ausfällungen im Abfallgefäß und in den Schläuchen auch schon nach 3 Stunden auf. Diese Ausfällungen betrafen nur Messungen, bei denen Bakterien in verdünntem Speichel, und nicht in PBS suspendiert wurden.

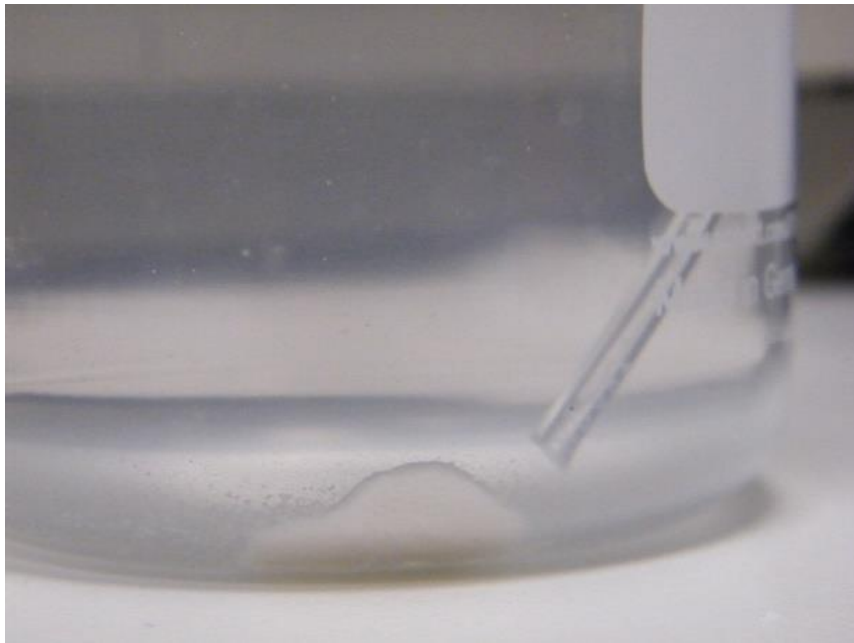


Abbildung 8: Ausfällungen in der QCM-D-Messzelle durch das Fenster gesehen (oben) und im Abfallgefäß am Schlauch, der von der Messzelle kommt (unten) einer Messung nach 25 h mit in verdünntem Speichel suspendierten Bakterien.

Da anfangs vermutet wurde, die Ausfällungen wären durch Pilze verursacht, wurde in späteren Messungen zu der Bakteriensuspension Amphotericin B zugegeben, um das Pilzwachstum zu unterdrücken. Da aber weiterhin Ausfällungen auftraten, wurden diese unter dem Mikroskop untersucht. Abbildung 9 zeigt die Ausfällungen unter einem Lichtmikroskop: Es sind typische

Streptokokkenketten und auch Konglomerate von Streptokokken zu erkennen. Weiterhin wurden die Konglomerate auf Agar, der mit Antibiotika vorbehandelt war und Bakterienwachstum unterdrückt, ausgestrichen. Es wurde nach 3 Tagen kein Wachstum festgestellt.

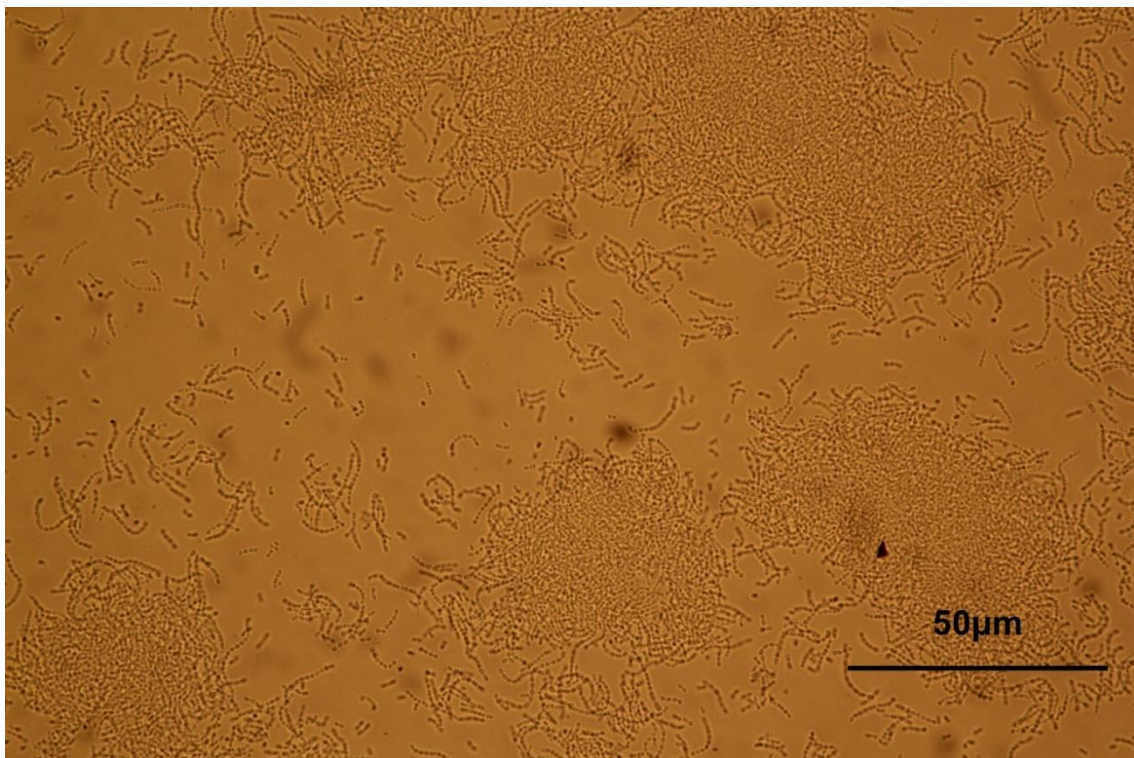


Abbildung 9: Mikroskopisches Bild der Konglomerate einer Messung nach 25 h mit in verdünntem Speichel suspendierten Bakterien. Vergrößerung 600-fach.

3.2 Färbung der Bakterien

3.2.1 Lebensfähigkeit nach 4 Stunden

Abbildung 10 zeigt, dass auf einem Sensor, der nach einer Messung von 4 Stunden mit der Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung angefärbt wurde, überwiegend lebende Bakterien vorhanden waren. Die Bilder unterscheiden sich nicht von Bildern von Bakterien mit Nährmedium. Über den getesteten Zeitraum von 3 Stunden ohne Nahrung sind die Bakterien folglich lebensfähig.

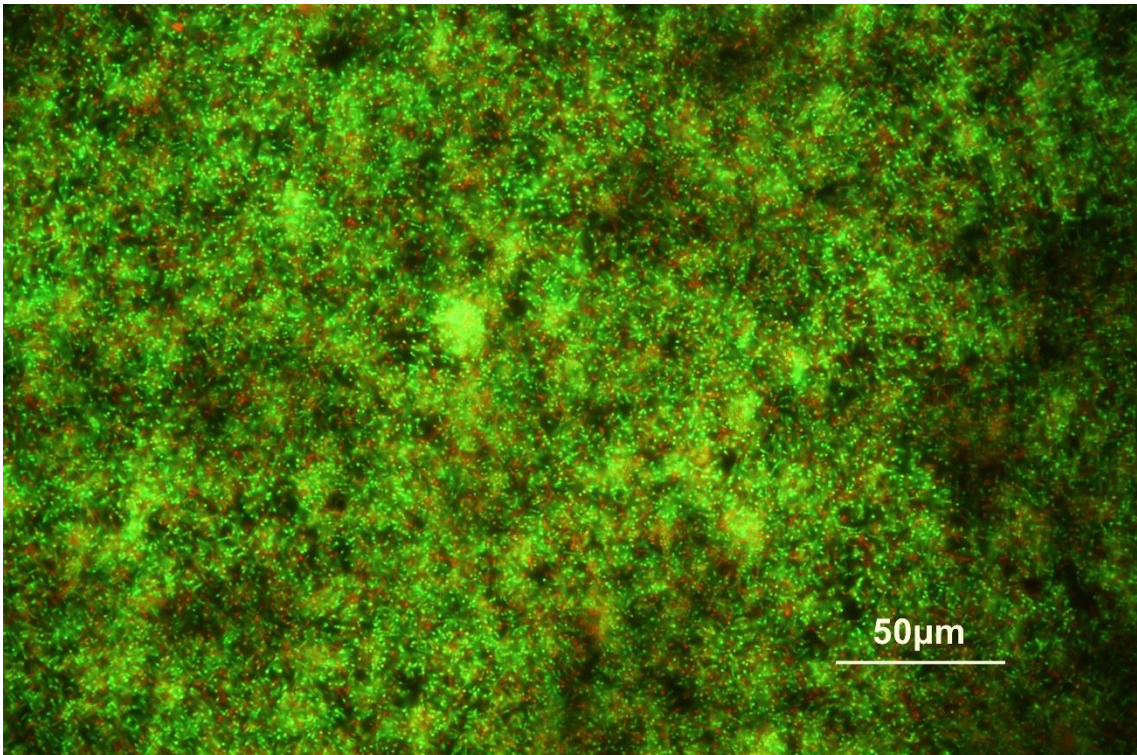
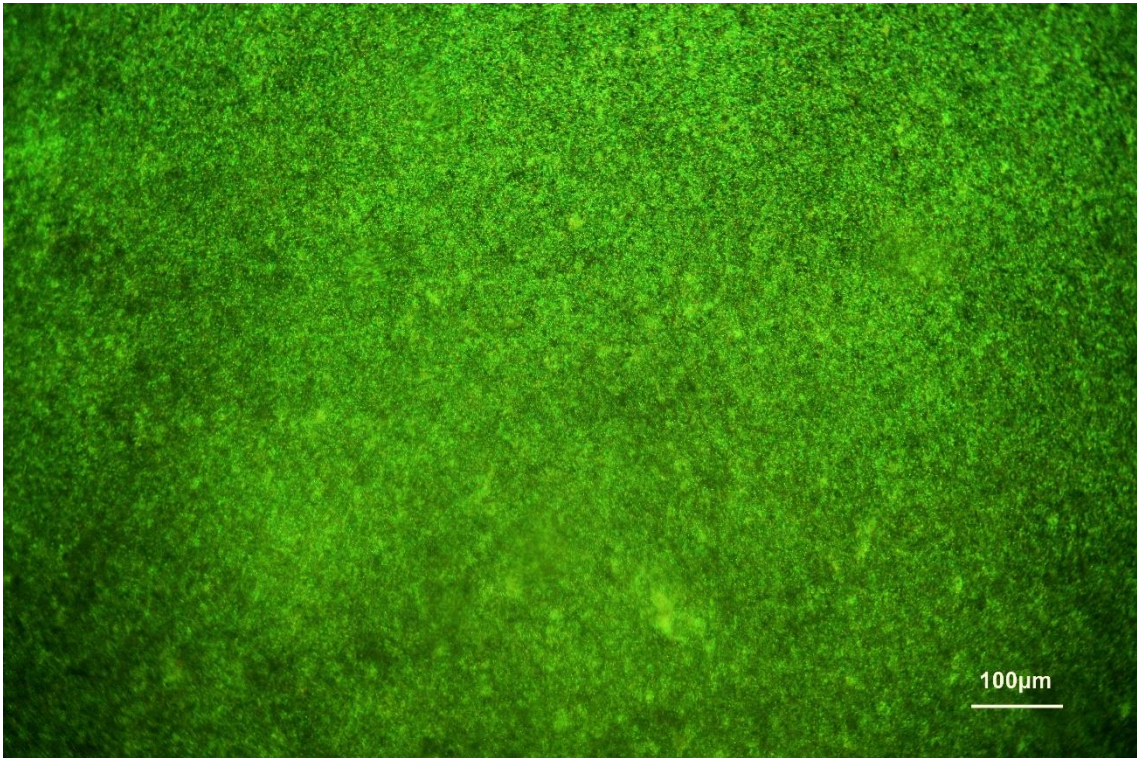


Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahme nach Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung der Bakterien nach einer 4-stündigen Messung. Vergrößerung 100-fach (oben) und 400-fach (unten). Grüne Bakterien sind lebendig, rote sind abgestorben.

3.2.2 Reinigung der Quarzsensoren

Die mit Kristallviolett und der Vital-fluoreszenz-Doppelfärbung gefärbten gereinigten Quarzsensoren zeigten keine Veränderung im Vergleich zu neuen Quarzsensoren.

3.3 Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkelmessung zeigte mit Wasser einen Winkel von 22° , die Titanoberflächen der Quarzsensoren waren hydrophil.

3.4 QCM-D-Messungen ohne Speichelkonditionierung

3.4.1 Frequenzkurven von *S. gordonii* auf Titan

Die Frequenzen zeigen wie in Abbildung 11 dargestellt nach Bakterienzugabe zuerst einen leichten Abfall, der von einer großen Frequenzzunahme gefolgt wird. Danach tritt eine Sättigung oder sogar eine leichte Abnahme in der letzten Stunde der Messung ein. Die Abnahme am Ende ist tendenziell größer und früher in den höheren Obertonfrequenzen.

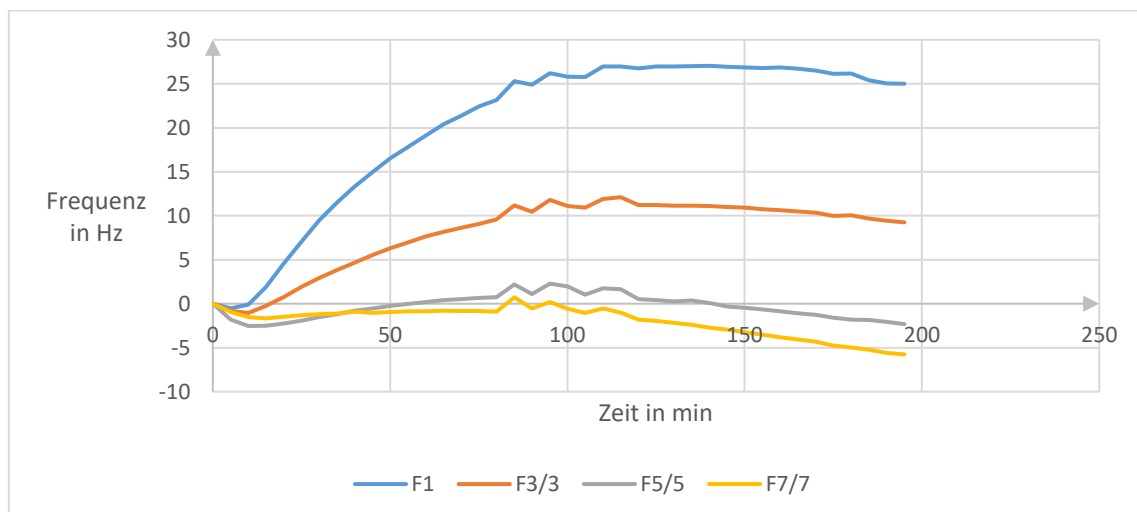


Abbildung 11: Frequenzkurven einer Messung über 3 h. Beispiel zeigt Messung 2. Die Messungen werden ab dem ersten sichtbaren Bakteriensignal gezeigt. Davor lief mindestens eine halbe Stunde lang PBS.

Von der 80. bis zur 120. Minute traten kleinere Störungen auf, wie hier an positiven Frequenzverschiebungen in allen Frequenzen zu sehen ist.

Auffällig ist, dass die 5. und 7. Obertonfrequenz anfangs zunehmen, ab der 100. Minute aber wieder abfallen und zum Schluss negativ werden.

Tabelle 2: Endwerte der Frequenzen in Relation zur Baseline in Hz nach 3-stündiger Adhäsion von S. gordonii auf Titan und Spülung mit PBS für 20 min.

Endwerte ΔF in Hz	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	StAbw
F1	16,11	25,05	23,69	21,62	4,82
F3/3	4,76	9,43	25,22	13,14	10,72
F5/5	-5,04	-2,06	8,63	0,51	7,19
F7/7	-10,60	-5,58	0,06	-5,37	5,33

Die Endwerte aus Tabelle 2 sind die Werte, um die sich die Frequenz ab Bakterienzugabe insgesamt verändert hat. Auffällig ist, dass nur bei Messung 3 die 3. Obertonfrequenz höher als die Grundfrequenz ist.

3.4.2 Dissipationskurven von S. gordonii auf Titan

Die Dissipation zeigt Sättigungskurven, wie exemplarisch in Abbildung 12 gezeigt. Je länger die Messungen dauerten, desto ausgeprägter ist die Sättigung.

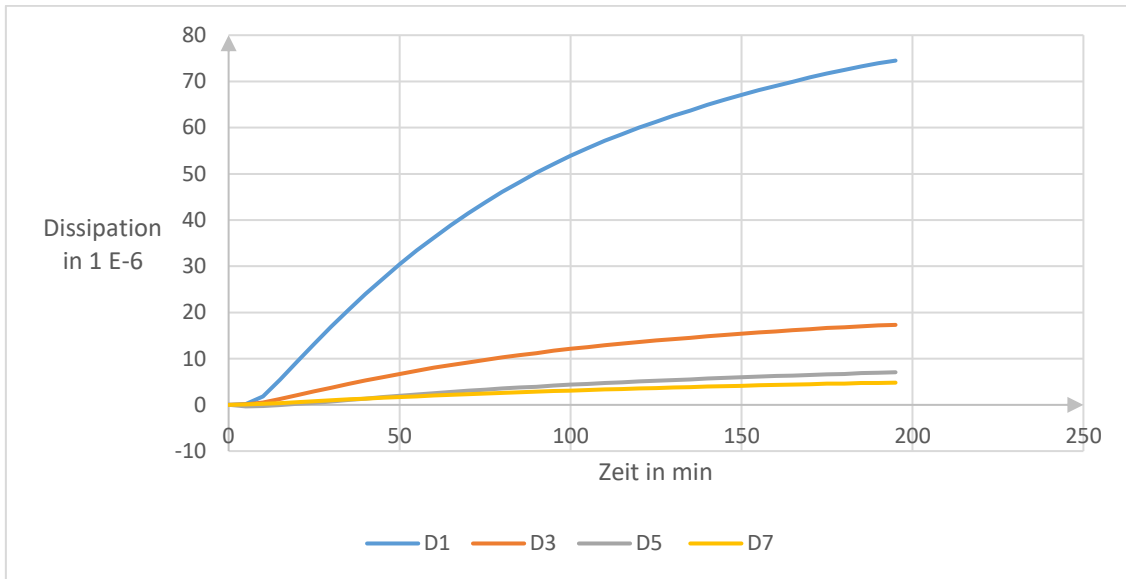


Abbildung 12: Dissipationskurven einer Messung über 3 h. Beispiel zeigt Messung 2. Die Messungen werden ab dem ersten sichtbaren Bakteriensignal gezeigt. Davor lief mindestens eine halbe Stunde lang PBS.

Tabelle 3 zeigt, dass die Dissipationsänderungen stärker ausgeprägt sind als die der Frequenz. Auffällig ist weiterhin, dass die Dissipationsänderung in den Obertonfrequenzen immer geringer wird und in der siebten Obertonfrequenz nur bei durchschnittlich 7 E-6 liegt. Messung 3 fällt wie bei der Frequenz mit deutlich höheren Werten als die anderen Messungen auf. Mögliche Ursache könnte ein Drift in der Baseline sein.

Tabelle 3: Endwerte der Dissipationen in Relation zur Baseline in 1 E-6 nach 3-stündiger Adhäsion von *S. gordonii* auf Titan und Spülung mit PBS für 20 min.

Endwerte ΔD in 1 E-6	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	StAbw
D1	81,18	73,96	144,65	99,93	38,90
D3	19,60	17,18	34,24	23,67	9,23
D5	9,15	6,97	16,00	10,70	4,71
D7	5,97	4,76	9,46	6,73	2,44

3.4.2.1 Mittelwerte der 3-stündigen Messungen

Die Frequenzkurven in Abbildung 13 zeigen die Mittelwerte der einzelnen Frequenzen aus den 3-stündigen Messungen 1-3. Die leichten unregelmäßigen Ausschläge nach oben sind dabei Störungen des Geräts, die unterschiedlich stark auftraten, im Mittelwert aber nur minimal zu erkennen sind.

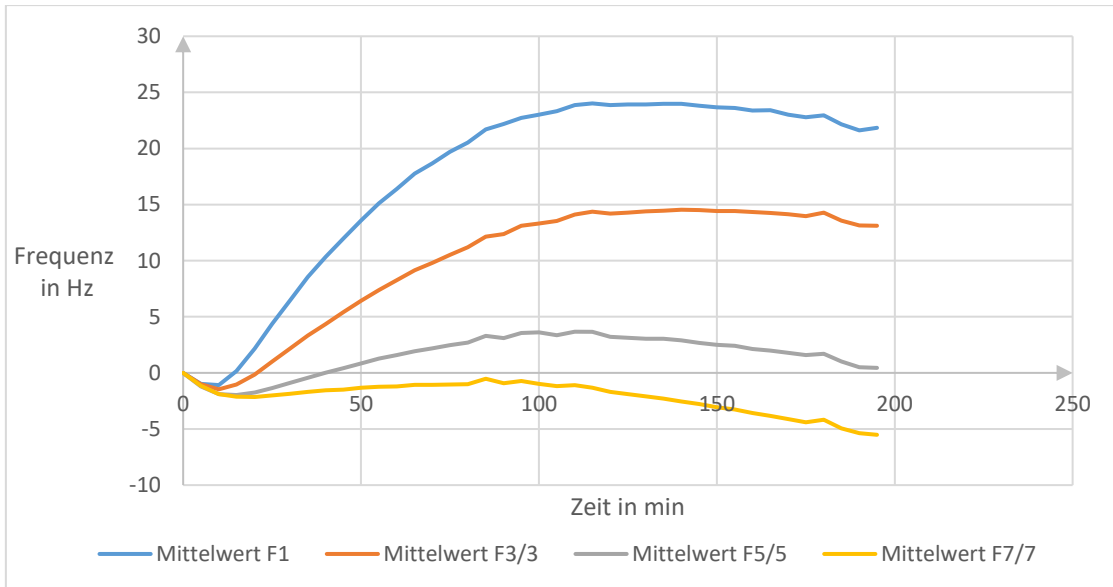


Abbildung 13: Mittelwerte der Frequenzen der 3-stündigen Messungen. Berechnet aus $n=3$ Messungen.

Die Frequenzen werden nach einer kleinen Abnahme zu Beginn stetig größer, bis ungefähr zur 100. Minute. Danach fallen sie wieder ab. Dieser Abfall ist in der 5. und 7. Obertonfrequenz stärker ausgeprägt.

Weiterhin ist in der Grundfrequenz und in der 3. Obertonfrequenz ein deutliches positives ΔF am Ende der Messung zu erkennen, während die 5. Obertonfrequenz ungefähr bei 0 bleibt, und die 7. Obertonfrequenz ins Negative abfällt.

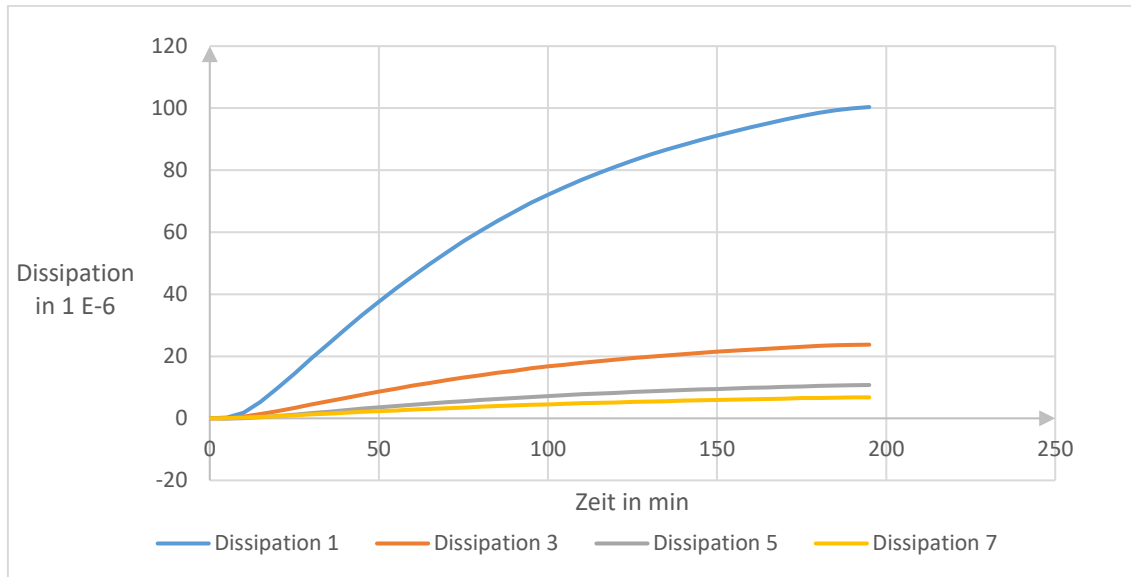


Abbildung 14: Mittelwerte der Dissipationen der 3-stündigen Messungen. Berechnet aus $n=3$ Messungen.

Abbildung 14 zeigt die Mittelwerte der Dissipation. Hier fällt auf, dass die Dissipation in der Grundfrequenz fast 5-mal höher ist als in den Obertonfrequenzen. Weiterhin besteht bei der Dissipation, im Gegensatz zur Frequenz, die am Ende abfällt, eine Sättigung und die Kurven nähern sich einem positiven Wert an. ΔD ist am Ende immer positiv.

3.5 Quantifizierung von *S. gordonii* mit Kristallviolett

Abbildung 15 zeigt die Mittelwerte der optischen Dichte der mit Kristallviolett gefärbten Bakterien. Diese wurden nach 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden und 3 Stunden entnommen. Zwischen 2 und 3 Stunden erfolgte fast keine Zunahme mehr, es wurde eine Sättigung erreicht.

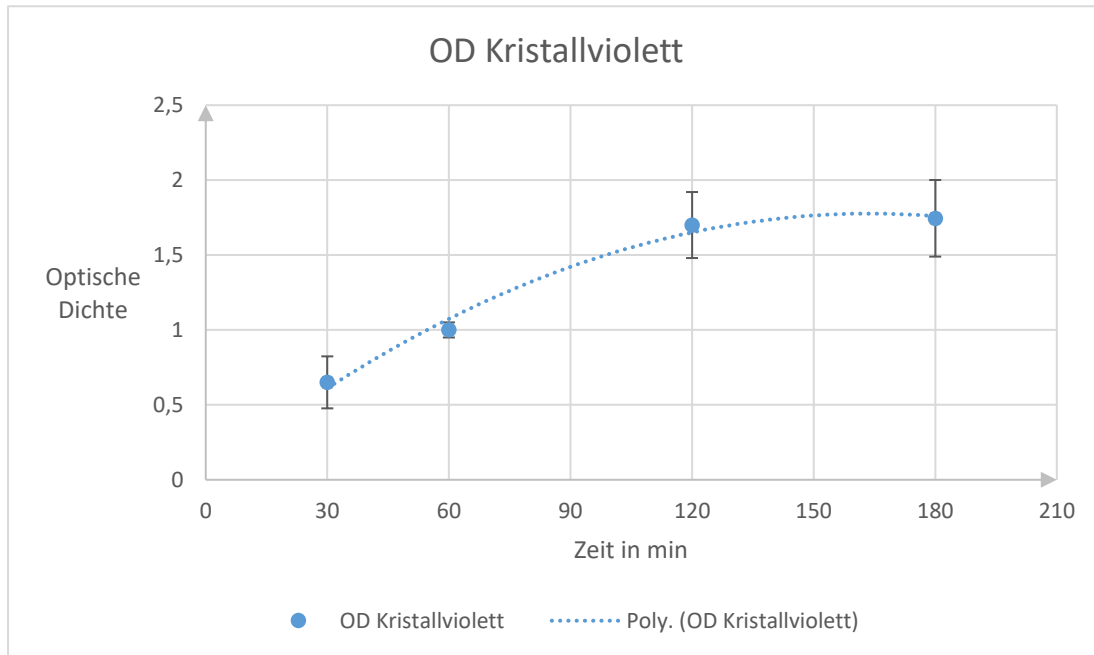


Abbildung 15: Messung der optischen Dichte der Bakterien nach 30 min, 1 h, 2 h und 3 h. Werte sind Mittelwerte aus n=3 Messungen, bei 3 h n=4.

In Abbildung 16 und Abbildung 17 sind die mit Kristallviolett gefärbten Quarze nach einer Messung von 30 Minuten und von 3 Stunden gezeigt. Es sind unterschiedliche Stadien der Besiedelung mit Bakterien sichtbar.

Es ist zu erkennen, dass die Besiedelung des Quarzes immer dichter wird. Nach 30 Minuten sind noch unbesiedelte Areale, die sich schwarz darstellen, vorhanden. Nach 3 Stunden sind violette Ablagerungen zu erkennen, die dicht mit Bakterien besiedelt und sehr stark gefärbt sind.

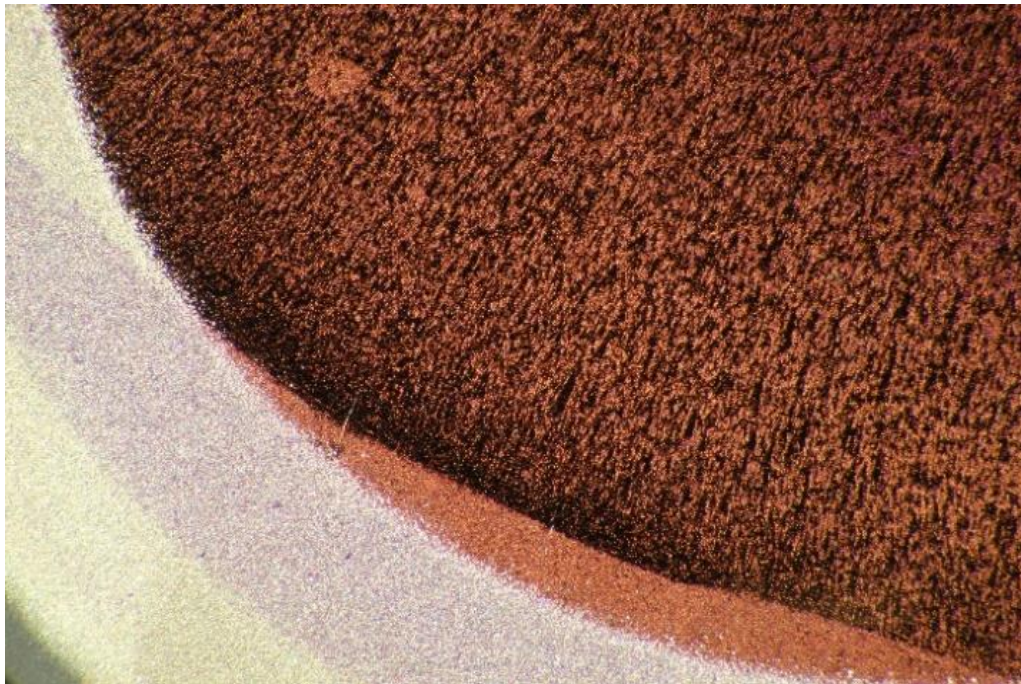
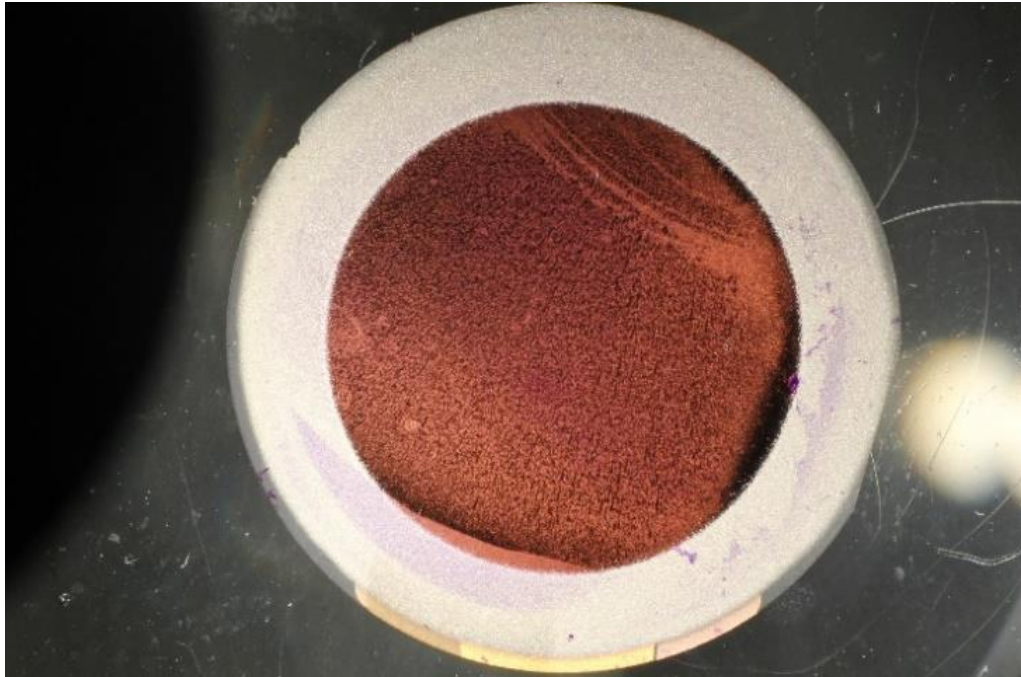


Abbildung 16: Bilder der mit Kristallviolett gefärbten Quarze nach einer Messung von 30 min. Die schwarzen Areale sind unbesiedelt, die braunen dünn und die violetten Areale dicht besiedelt. Oben Übersicht (5-fach vergrößert), unten Vergrößerung 20-fach.

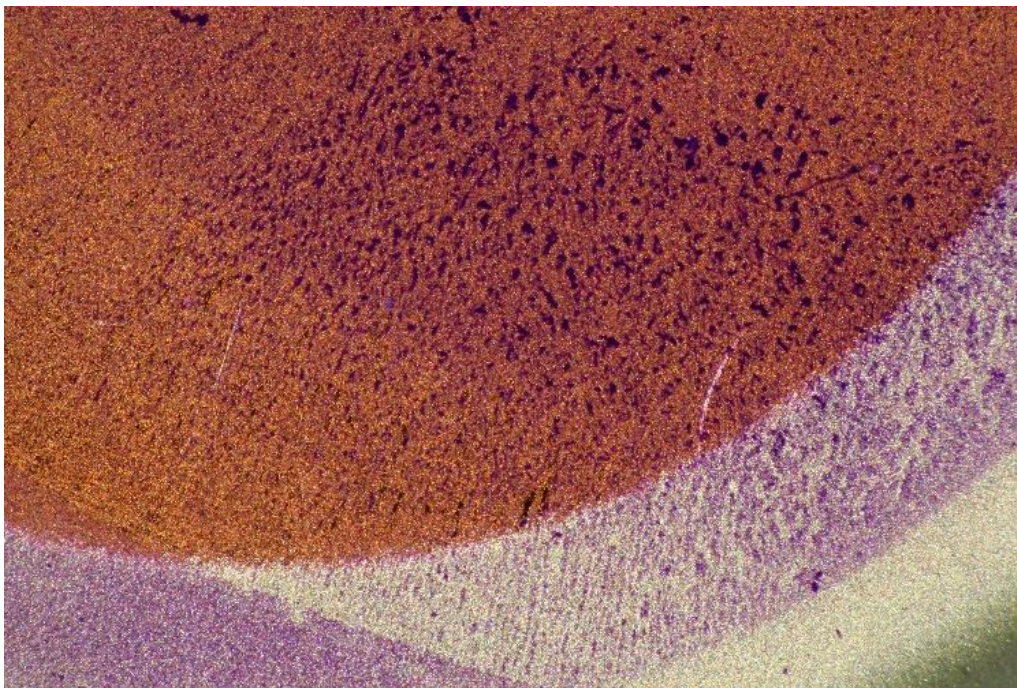
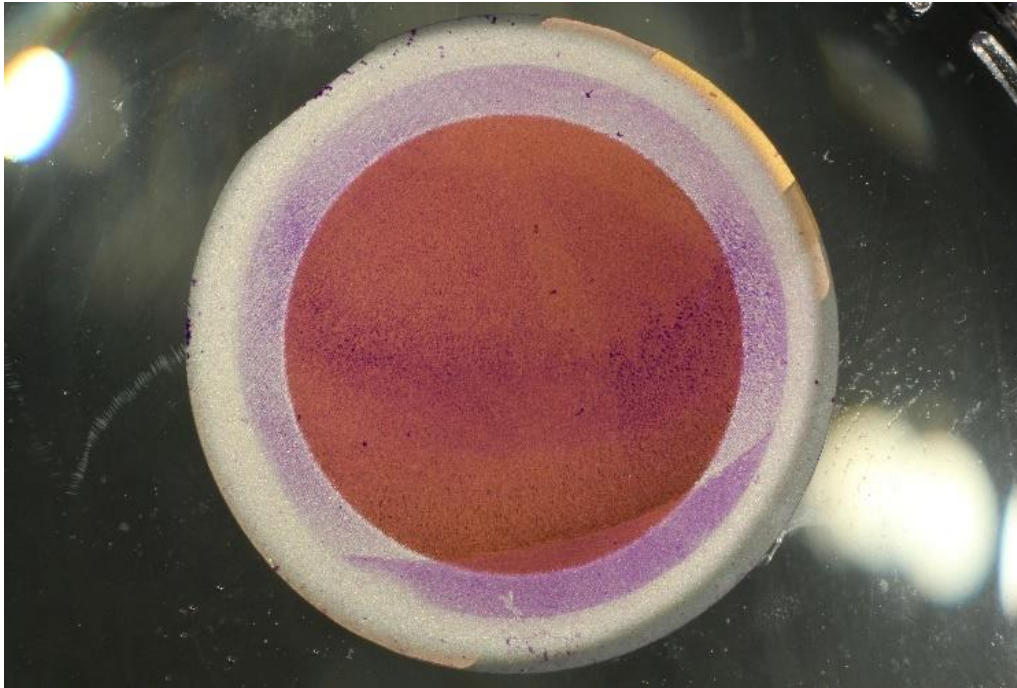


Abbildung 17: Bilder der mit Kristallviolett gefärbten Quarze nach einer Messung von 3 h. Die braunen Areale sind dünn und die violetten Areale dicht besiedelt. Oben Übersicht (5-fach vergrößert), unten Vergrößerung 20-fach.

3.6 Speicheladsorption

Die Adsorptionskurven der einzelnen Speichelmessungen weichen während des Durchflusses des verdünnten und modifizierten Speichels voneinander ab. Nach der Spülung mit PBS für eine halbe Stunde hat Messung 3P sowohl in der Frequenz als auch in der Dissipation einen 4-fach höheren Wert als die Messungen 1P und 2P. Die Frequenz nimmt während der Adsorption des Pellikels immer ab, während sich die Dissipation (außer D1 in Messung 2P) leicht erhöht. In Abbildung 18 und Abbildung 19 ist eine Speicheladsorptionskurve exemplarisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die Kurven ab der Zugabe von PBS deutlich ändern, ein Zeichen dafür, dass das Umgebungsmedium eine wichtige Rolle spielt.

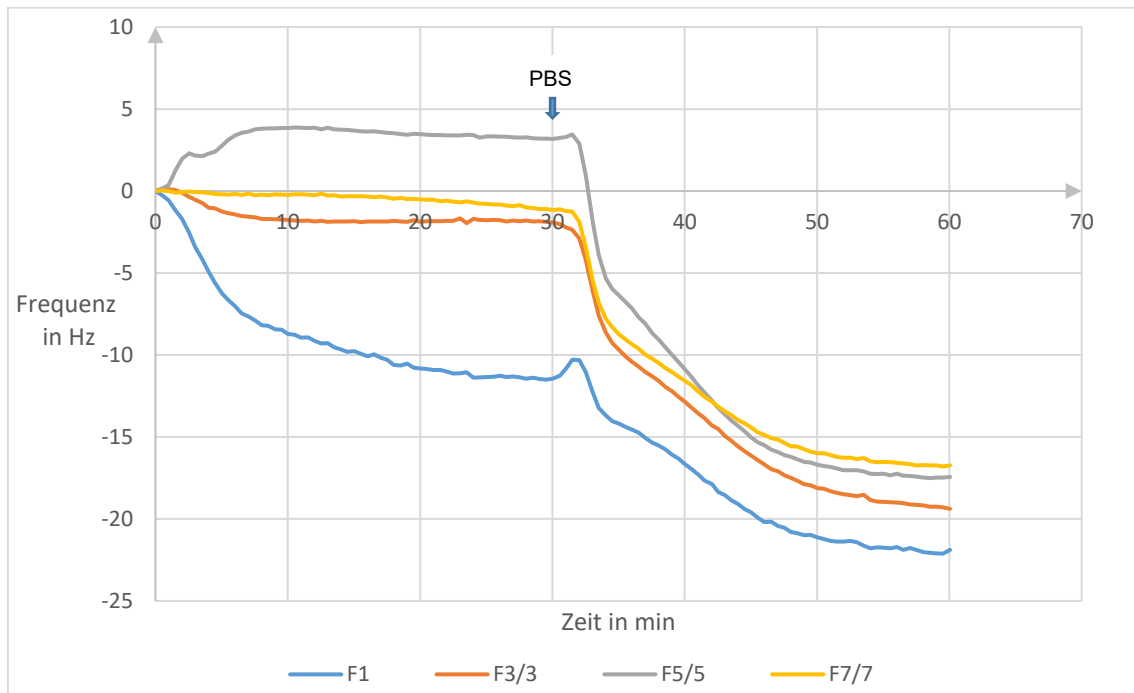


Abbildung 18: Frequenzkurven ab der Zugabe von modifiziertem Speichel. Ab Minute 30 wurde mit PBS gespült.

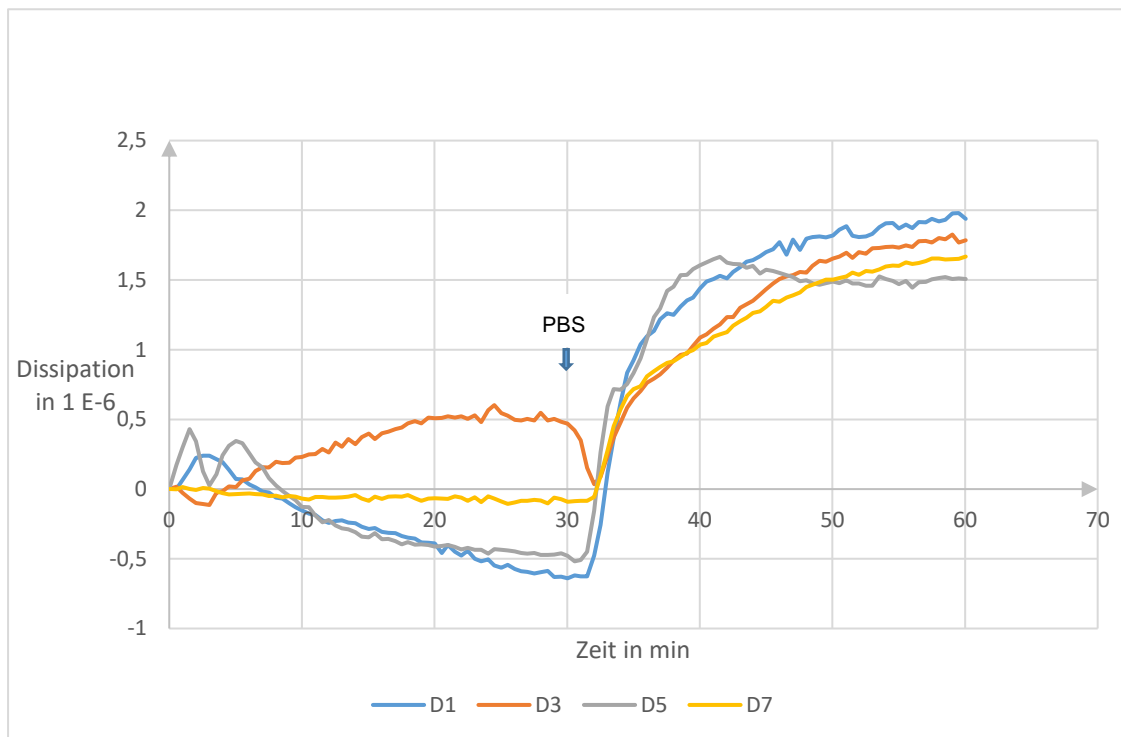


Abbildung 19: Dissipationskurven ab der Zugabe von modifiziertem Speichel. Ab Minute 30 wurde mit PBS gespült.

Trägt man die Frequenz- und Dissipationsänderungen, die sich am Ende der Speicheladsorption nach Spülung mit PBS einstellen, nebeneinander auf, erhält man die in Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse.

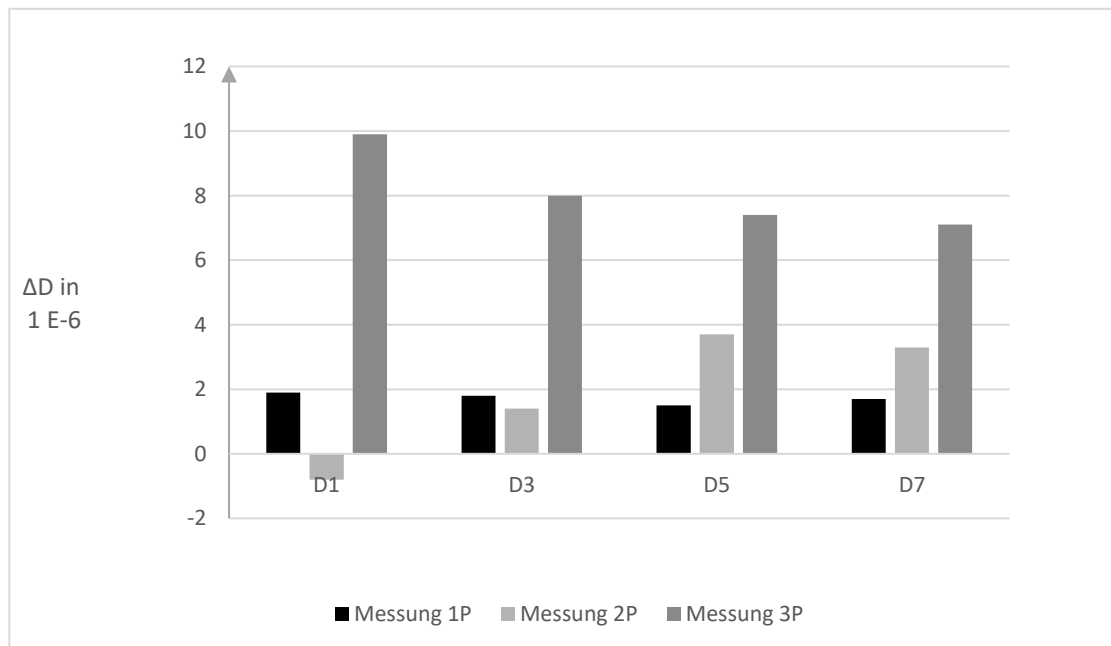
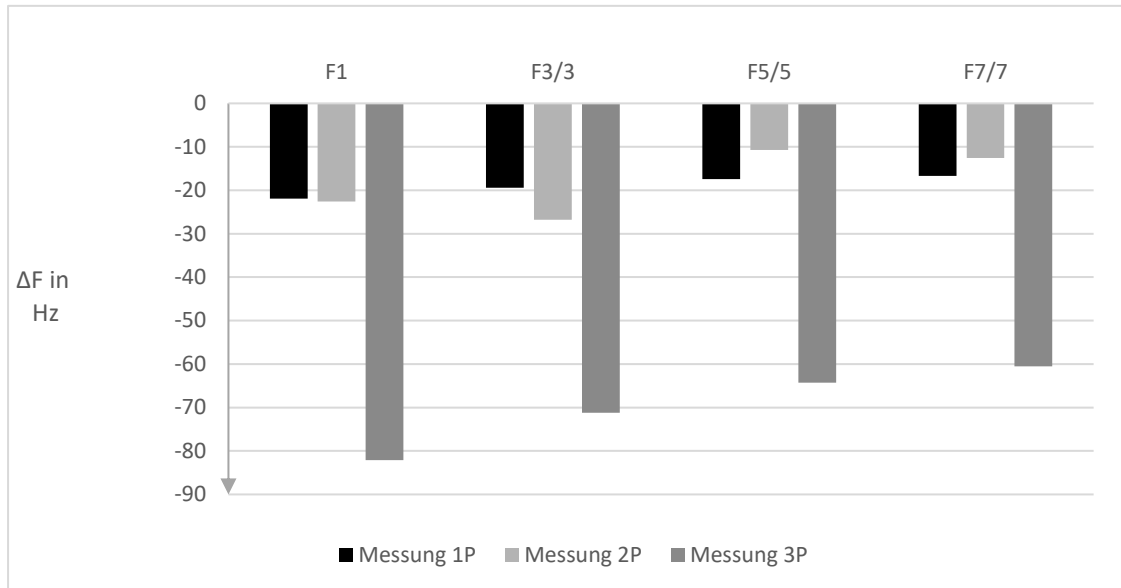


Abbildung 20: Werte für die Frequenzen (oben) und die Dissipationen (unten) bei Ende der Speicheladsorption. Messung 3P zeigt deutlich höhere Werte als die anderen Messungen.

Abbildung 21 zeigt die Massenbelegung, die mithilfe der Sauerbrey-Gleichung aus der adsorbierten Masse kalkuliert wurde.

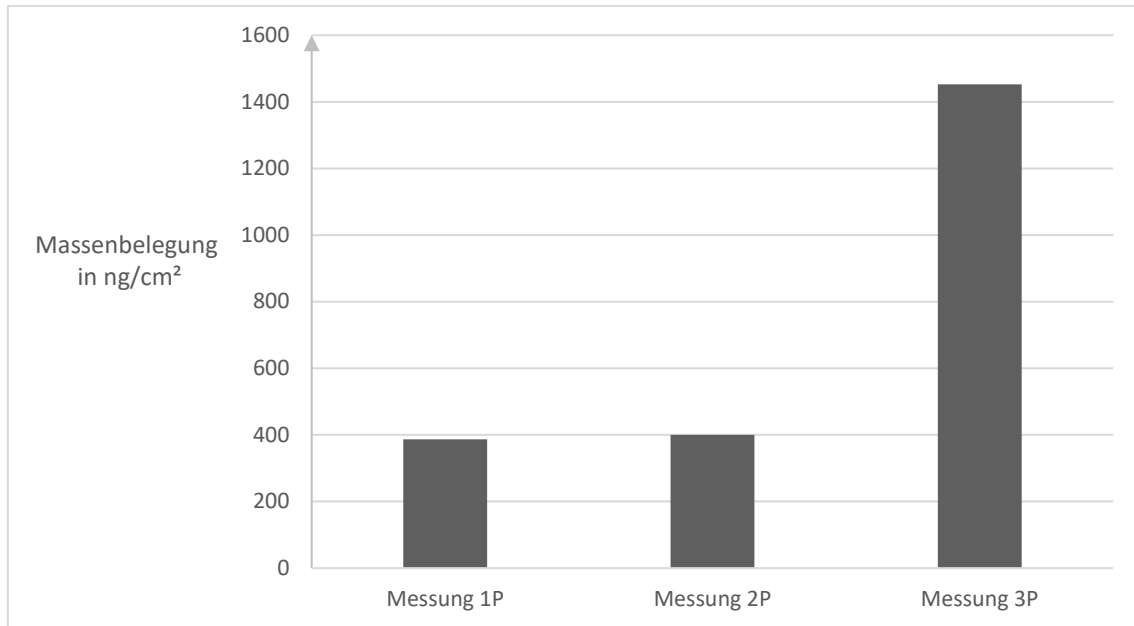


Abbildung 21: Berechnung der Massenbelegung (in ng/cm²) aus der Änderung der Grundfrequenz nach Speicheladsorption der einzelnen Messungen.

Man muss allerdings beachten, dass in dieser Versuchsreihe die Obertonfrequenzen nach Division der Obertonzahl, F_{3/3}, F_{5/5} und F_{7/7}, nicht deckungsgleich mit der Grundfrequenz F₁ waren, was ein Zeichen dafür ist, dass mit der Sauerbrey-Gleichung die Masse zu niedrig eingeschätzt wird, weil der Film wasserhaltig ist.

Messung 3P zeigt eine viel höhere Massenbelegung, und es können nur Vermutungen angestellt werden, warum die adsorbierte Masse fast 4-mal so groß ist wie bei den anderen Messungen.

3.7 QCM-D-Messungen mit Speichelkonditionierung

3.7.1 Frequenzkurven von *S. gordonii* mit Speichelkonditionierung

Messungen, bei welchen auf dem Quarzsensoren zuvor ein Pellikel durch modifizierten Speichel gebildet wurde, zeigen innerhalb einer Messung Frequenzkurven mit ähnlichem Verlauf wie die Messungen ohne Pellikel, aber mit größerer Frequenzänderung in der Grundfrequenz. Alle Messungen mit Pellikel haben als Baseline den Wert, der nach der Speicheladsorption und

halbstündiger Spülung mit PBS erreicht wurde. So wird hier nur die Frequenzänderung der Bakterienadhäsion dargestellt und nicht die der Bildung des Pellicels.

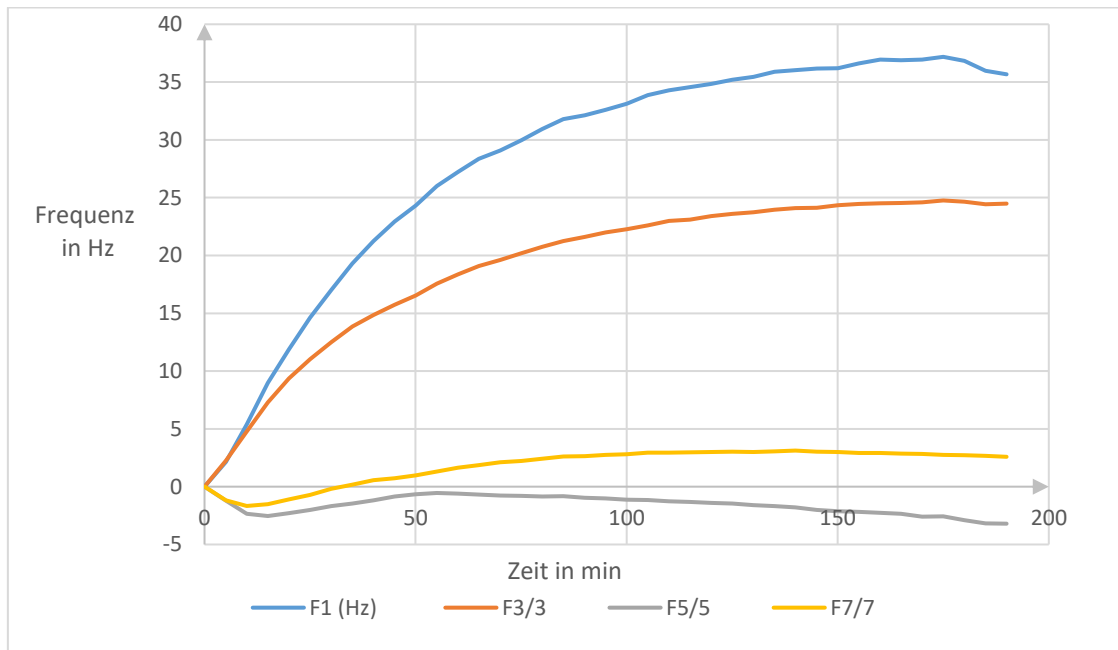


Abbildung 22: Frequenzkurven einer Messung über 3 h mit Bakterien nach Bildung eines Pellicels. Beispiel zeigt Messung 2P. Die Baseline ist der Endwert nach Speicheladsorption und Spülung mit PBS.

Wie in Abbildung 22 gezeigt fällt auf, dass die Frequenz in der 5. und 7. Obertonfrequenz zu Beginn genau wie bei den Messungen ohne Pellicel leicht abfällt, während die anderen Frequenzen sofort ansteigen.

Weiterhin haben F1 und F3/3 den Charakter einer Sättigungskurve, während F5/5 und F7/7 am Ende wieder abfallen.

3.7.2 Dissipationskurven von *S. gordonii* mit Speichelkonditionierung

Verglichen mit den Messungen ohne Pellicel waren die Dissipationswerte mit Pellicel weniger als halb so groß.

Die Dissipation nimmt, wie in Abbildung 23 gezeigt, in allen Frequenzen stetig zu, allerdings ist die Zunahme in der Grundfrequenz am stärksten und wird mit höherer Obertonfrequenz immer geringer.

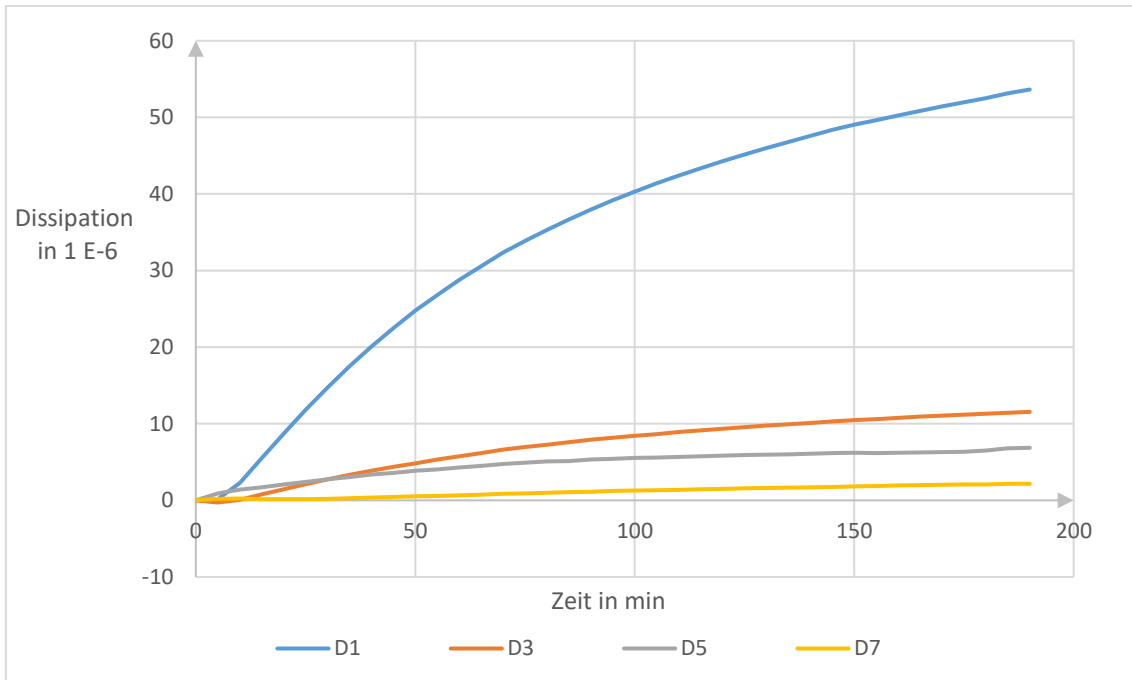


Abbildung 23: Dissipationskurven einer Messung über 3 h mit Bakterien nach Bildung eines Pellikels. Beispiel zeigt Messung 2P. Die Baseline ist der Endwert nach Speicheladsorption und Spülung mit PBS.

3.7.3 Mittelwerte der Messungen mit Speichelkonditionierung

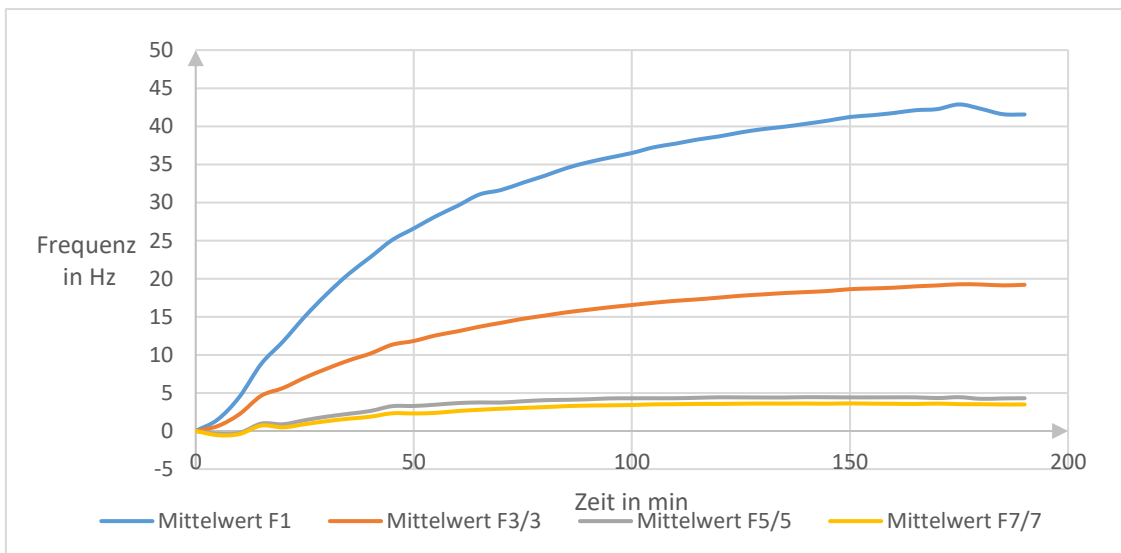


Abbildung 24: Mittelwerte der Frequenzen der Messungen 1P bis 3P mit Pellikel. Die Baseline ist der Endwert nach Speicheladsorption.

Abbildung 24 zeigt zu Beginn einen kleinen Abfall von F5/5 und F7/7. Es fällt auf, dass F5/5 und F7/7 fast identisch bis zum gleichen Wert wie in Tabelle 4 gezeigt zunehmen.

Tabelle 4: Endwerte der Frequenzen der Messungen mit Pellikel nach 3 h S. gordonii und 20 min PBS. Man beachte die starken Abweichungen zwischen den einzelnen Messungen.

Endwerte ΔF in Hz	Messung 1P	Messung 2P	Messung 3P	Mittelwert	StAbw
F1	19,93	35,67	69,05	41,55	25,08
F3/3	6,96	24,48	26,14	19,19	10,63
F5/5	0,29	-3,20	15,81	4,30	10,12
F7/7	-3,79	2,59	11,66	3,49	7,76

Abbildung 25 zeigt für die Mittelwerte der Dissipationskurven einen Sättigungsverlauf. Wie in Tabelle 5 dargestellt, ist die Dissipation in der Grundfrequenz fünf Mal höher als in den Obertonfrequenzen.

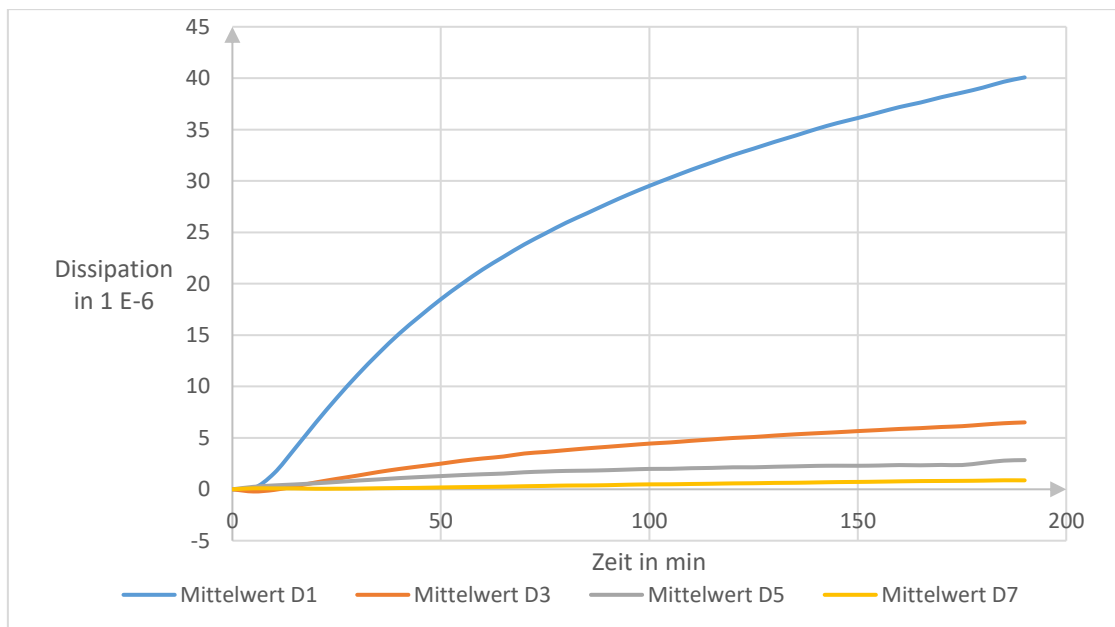


Abbildung 25: Mittelwerte der Dissipationen der Messungen 1P bis 3P mit Pellikel. Die Baseline ist der Endwert nach Speicheladsorption.

Tabelle 5: Endwerte der Dissipationen der Messungen mit Pellikel nach 3 h *S. gordonii* und 20 min PBS.

Endwerte ΔD in 1 E-6	Messung 1P	Messung 2P	Messung 3P	Mittelwert	StAbw
D1	39,54	53,63	27,05	40,08	13,30
D3	8,49	11,55	-0,51	6,51	6,27
D5	3,94	6,86	-2,28	2,84	4,67
D7	2,26	2,17	-1,83	0,87	2,33

3.8 Vergleich der Endwerte mit und ohne Speichelkonditionierung

Abbildung 26 zeigt die Endwerte der Frequenzen nach 3 Stunden Messung.

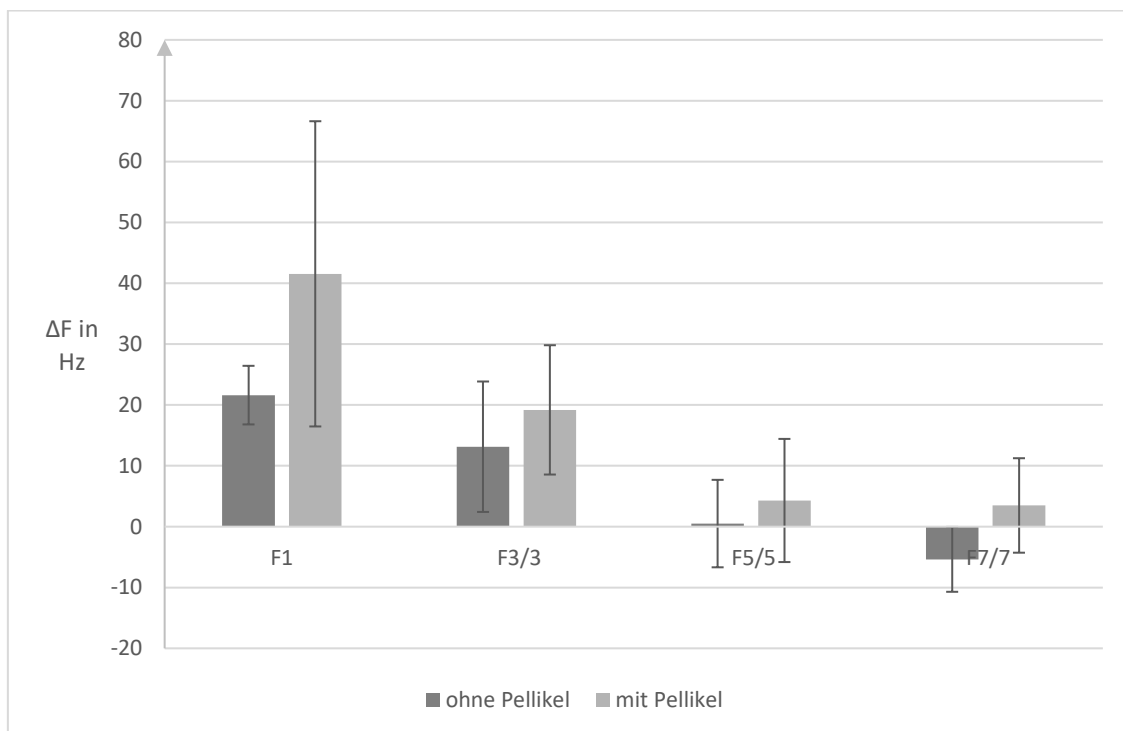


Abbildung 26: Mittelwerte und StAbw der Endwerte ΔF nach 3 h mit und ohne Pellikel.

Es ist zu erkennen, dass die Grundfrequenz mit Speichelkonditionierung deutlich höher ist. Die anderen Frequenzen sind mit Pellikel auch höher, aber nicht so deutlich.

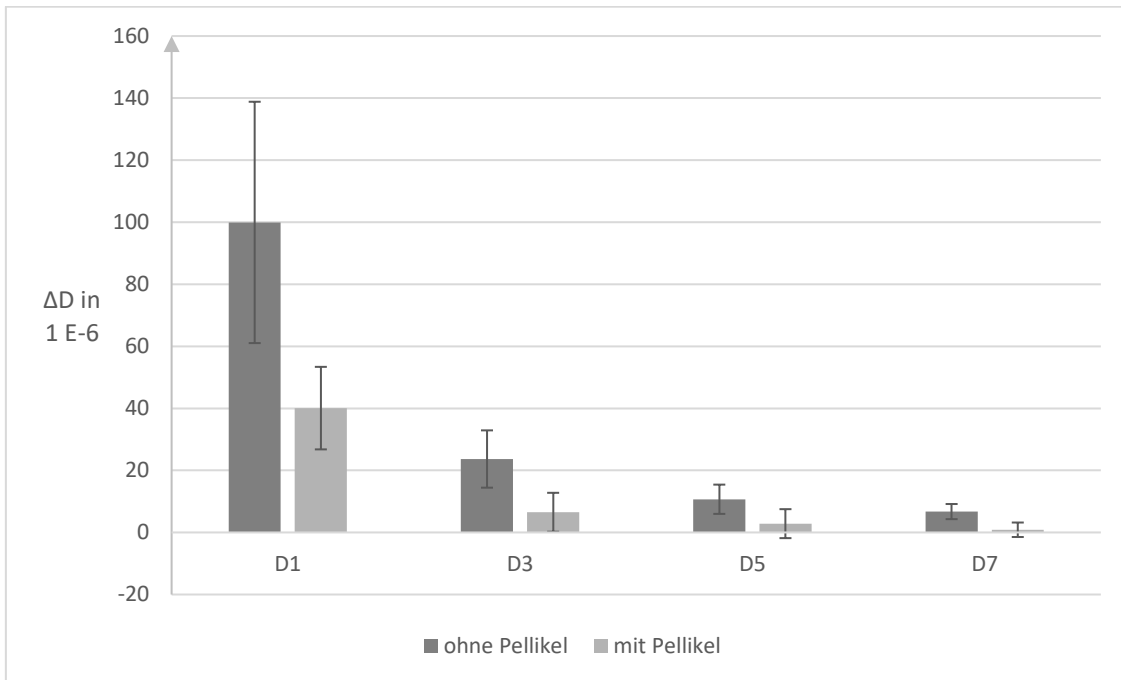


Abbildung 27: Mittelwerte und StAbw der Endwerte der Dissipationen nach 3 h mit und ohne Pellikel.

Abbildung 27 zeigt die Endwerte der Dissipationen nach 3 Stunden Messung. Die Dissipation ist ohne Pellikel sowohl in der Grundfrequenz als auch in allen Obertonfrequenzen deutlich höher.

3.9 Anfänglicher Frequenzabfall

Zu Beginn der Bakterienadsorption traten kleine negative Frequenzabfälle auf, die mit vorheriger Speichelkonditionierung schwächer ausgeprägt waren. Tabelle 6 zeigt die kleinsten gemessenen Frequenzen zu Beginn jeder Messung.

Tabelle 6: Negativwerte, die die Messungen zu Beginn ab Bakteriengabe zeigten. Es wurde das Minimum verwendet. Messung 2P zeigte in der 5. Obertonfrequenz einen negativen Drift, deshalb kann dieser Wert nicht vorbehaltlos übernommen werden.

ΔF in Hz	Ohne Pellikel			Mit Pellikel		
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 1P	Messung 2P	Messung 3P
$\Delta F1$	-2,1	-0,5	-1,1	/	/	/
$\Delta F3/3$	-1,5	-1,1	-1,7	-0,3	-0,1	/
$\Delta F5/5$	-2	-1,4	-2,5	-0,4	(-2,5)	/
$\Delta F7/7$	-2,3	-1,7	-2,4	-1	-1,7	-0,5

Es fällt auf, dass die Negativwerte der Messungen ohne Pellikel größer sind als die der Messungen mit Pellikel.

3.10 Quantifizierung von *S. gordonii* auf Pellikel mit Kristallviolett

Abbildung 28 zeigt die Messungen der optischen Dichte nach 3 Stunden Interaktion von *S. gordonii* auf Titan mit und ohne Pellikelkonditionierung. Man erkennt insgesamt niedrigere Werte für die Anzahl der Bakterien mit Pellikel. Da 2 Messungen stark von Störungen betroffen waren, konnten deren Frequenz- und Dissipationssignale nicht in die Kurvendarstellung übernommen werden, die Anzahl der Bakterien auf den Quarzen wurde aber trotzdem ausgewertet, deshalb sind hier je n=4 Messungen gezeigt.

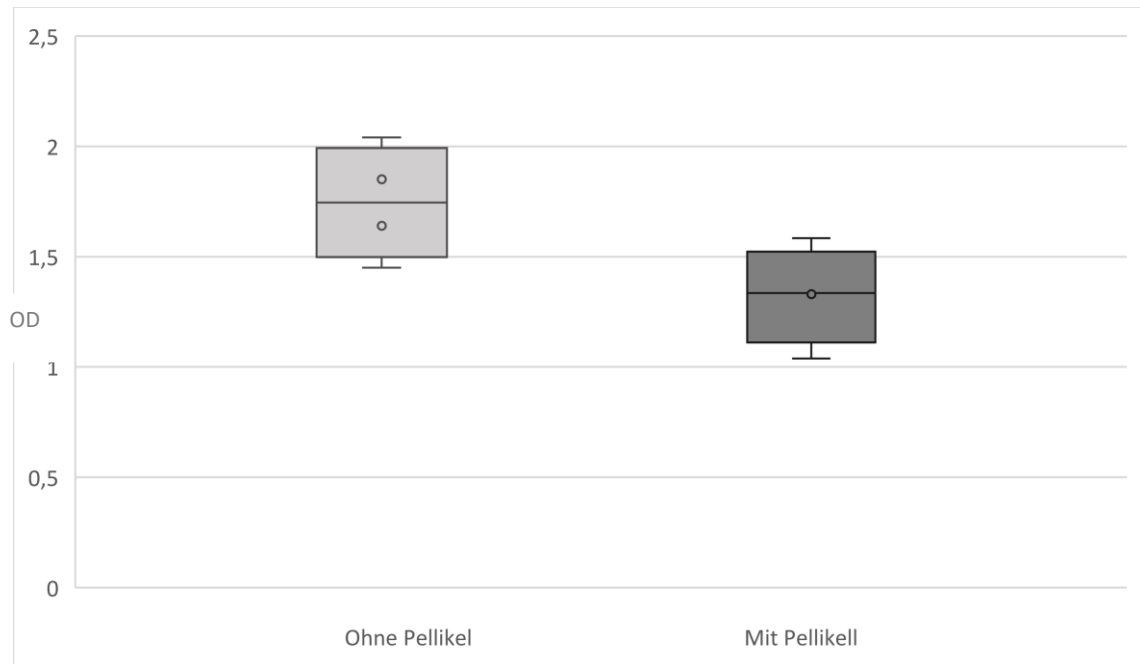


Abbildung 28: Werte der optischen Dichte der Bakterien nach 3 h, mit und ohne Pellicel. Werte aus je n=4 Messungen.

Auf den Quarzen mit Pellicel waren nach 3 Stunden 25 % weniger Bakterien vorhanden als ohne Pellicel. Der t-test gibt hier einen statistisch signifikanten Unterschied bei einem Signifikanzniveau von 5 % an.

Die Bilder der mit Kristallviolett gefärbten Quarze nach den Versuchen mit und ohne Pellicel (Abbildung 29 und 30) zeigen im Vergleich keine Unterschiede, sie sind in beiden Fällen dicht besiedelt.

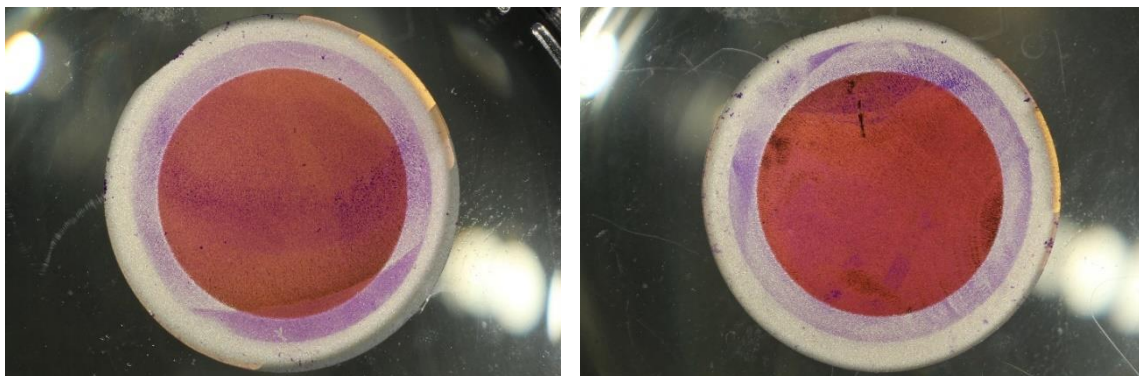


Abbildung 29: Bilder der mit Kristallviolett gefärbten Quarze nach einer Messung von 3 h ohne Pellicel (links) und mit Pellicel (rechts) in 5-facher Vergrößerung.

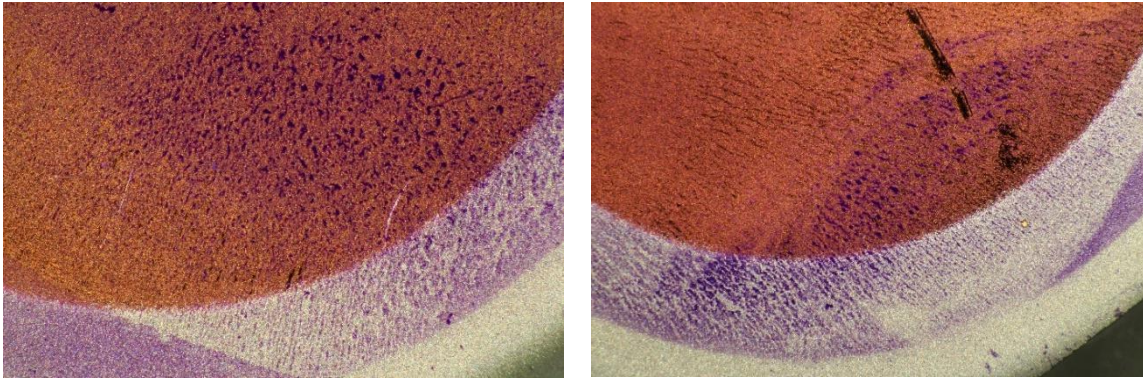


Abbildung 30: Bilder der mit Kristallviolett gefärbten Quarze nach einer Messung von 3 h ohne Pellikel (links) und mit Pellikel (rechts) in 20-facher Vergrößerung.

3.10.1 Korrelation der Bakterienzahl mit Dissipation und Frequenz

Trägt man wie in Abbildung 31 alle zugehörigen Dissipationen über der optischen Dichte auf, und zeichnet man eine lineare Trendlinie dazu, so erhält man einen R-Wert von 0,74, was auf eine nicht sehr ausgeprägte Korrelation schließen lässt.

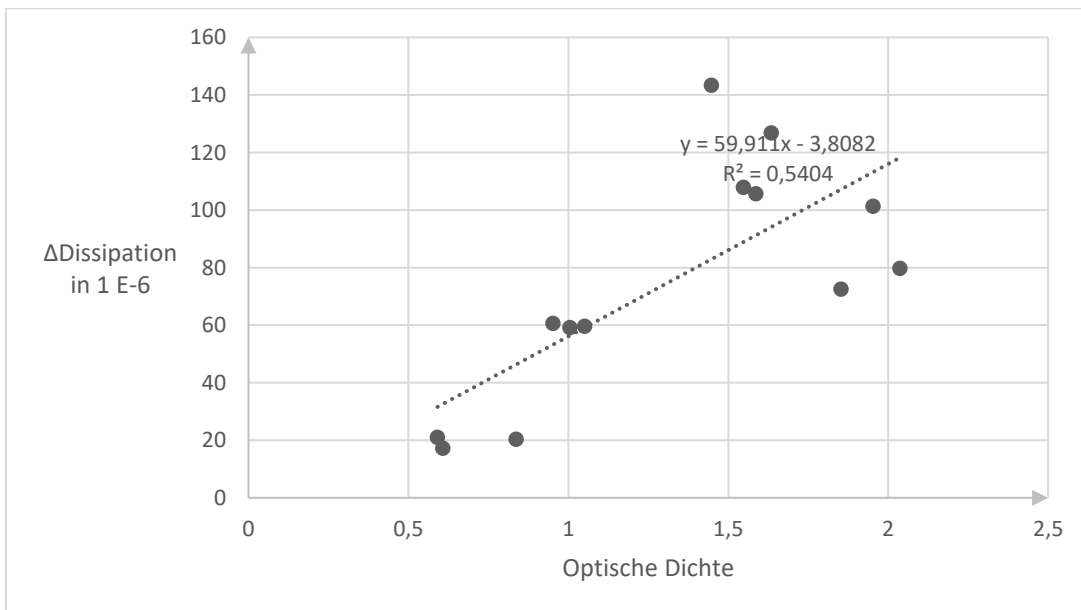


Abbildung 31: Auftragung aller Enddissipationen der Grundfrequenz über der gemessenen optischen Dichte der jeweiligen Versuche mit linearer Trendlinie. Insgesamt 13 Werte (3-mal 30 min, 3-mal 1 h, 3-mal 2 h, 4-mal 3 h). Alle Messungen ohne Pellikel.

Macht man dasselbe mit der Frequenz (Abbildung 32), kommt man auf einen deutlich geringeren Korrelationskoeffizienten von 0,47.

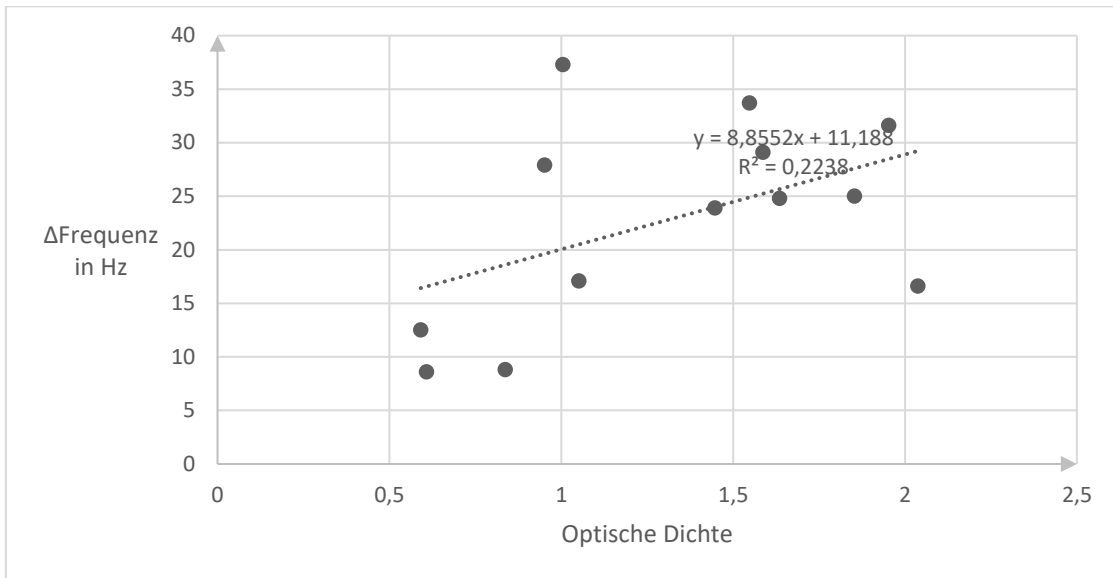


Abbildung 32: Auftragung aller Endfrequenzen der Grundfrequenz über der gemessenen optischen Dichte der jeweiligen Versuche mit linearer Trendlinie. Insgesamt 13 Werte (3-mal 30 min, 3-mal 1 h, 3-mal 2 h, 4-mal 3 h). Alle Messungen ohne Pelikel.

Beobachtet man hingegen die Kurvenverläufe der Mittelwerte in Abbildung 33, so ähneln sich die Kurven der optischen Dichte und der Dissipation über die Zeit stark.

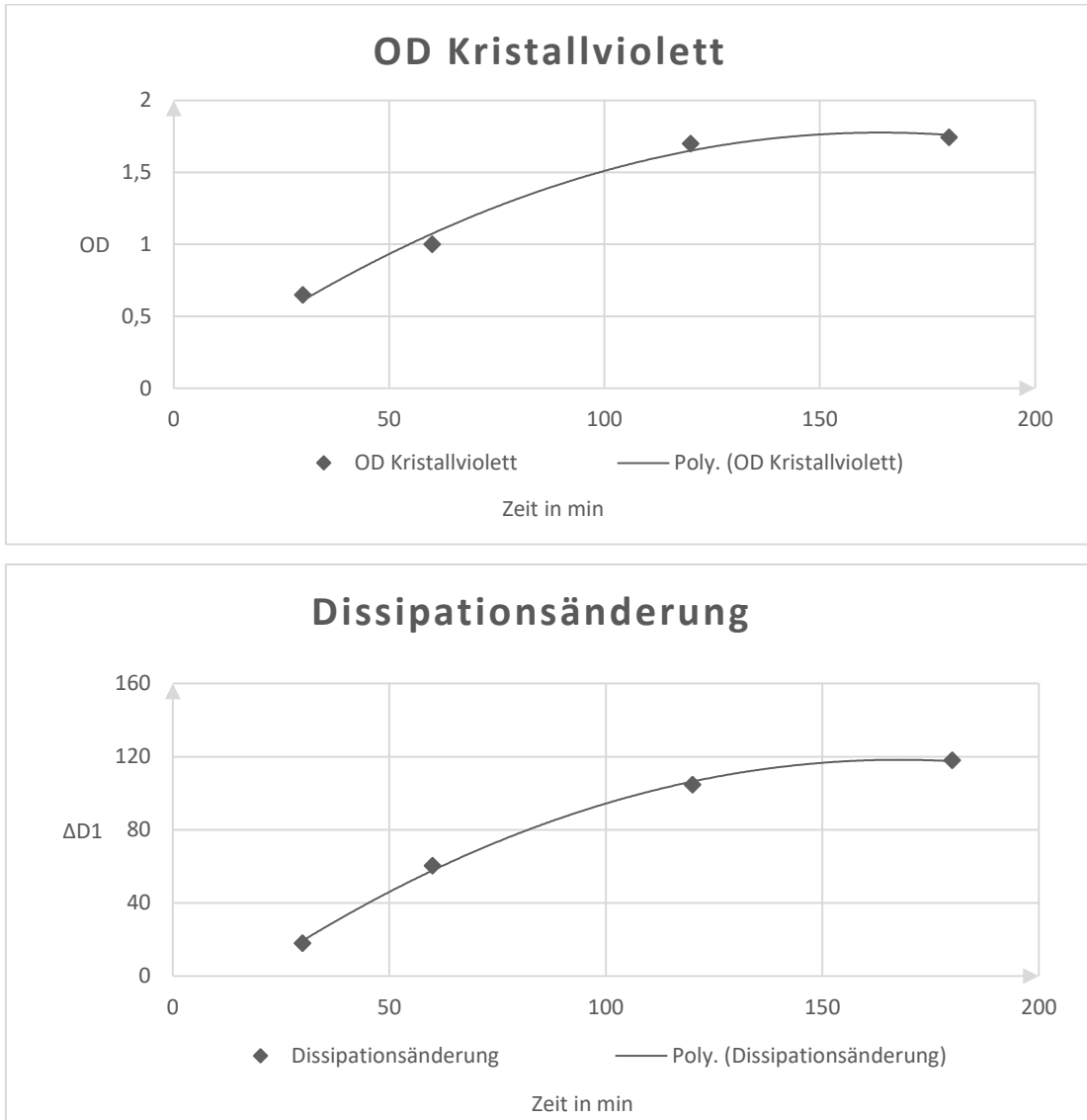


Abbildung 33: Mittelwerte der OD-Messungen (oben) und der Grundfrequenz der Dissipation (unten) nach 30 min, 1 h, 2 h und 3 h.

Eine Regressionsgerade gezeichnet mit den Mittelwerten der Dissipation und der optischen Dichte bei 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden und 3 Stunden, wie in Abbildung 34 dargestellt, ergibt einen R-Wert von 0,99, was eine große Korrelation zeigt.

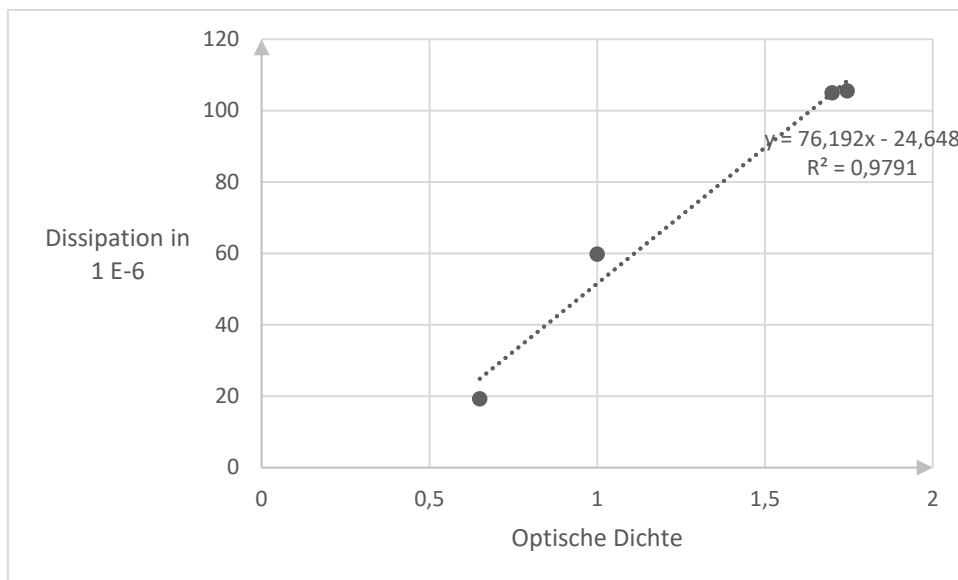


Abbildung 34: Mittelwerte der Dissipation am Ende der Messung aufgetragen über die Mittelwerte der optischen Dichte nach 30 min, 1 h, 2 h und 3 h.

Im Gegensatz dazu haben die Mittelwerte der Kristallviolett-Werte und der Frequenzwerte nur einen Korrelations-Koeffizienten von 0,78 (Werte nicht dargestellt).

4 Diskussion

4.1 Speicheladsorption

Wie in anderen Versuchen mit QCM-D, die ein Pellicel durch modifizierten Speichel, der über eine Titanoberfläche geschickt wurde, erzeugten, kommt es bei der Adsorption von Speichel auf Titan zu einem Frequenzabfall [142, 146-148]. Bei diesen Versuchen war eine zwei-stufige Adsorption zu erkennen, nach der Spülung mit PBS wurde die Frequenz negativer. Dieser zwei-stufige Prozess ist auch in der durchgeführten Versuchsreihe zu erkennen, bis zur 8. Minute der Speicheladsorption fällt die Frequenz stärker ab, danach wird die Kurve flacher. Da im Speichel viele Bestandteile mit verschiedenen Bindungsmechanismen auch untereinander vorkommen, ist davon auszugehen, dass verschiedene Speichelbestandteile zeitversetzt adsorbieren.

Eine Messung zeigt viel höhere Werte bei der Speicheladsorption als die anderen Messungen. Möglicherweise unterschied sich die Proteinzusammensetzung des modifizierten Speichels, oder der Speichel wurde nicht stark genug durchgemischt und es adsorbierten mehr Speichelbestandteile.

Die Dissipation erhöht sich bei der Speicheladsorption leicht, da der Film Wasser enthält und so die Schwingung abdämpft. Das gebildete Pellicel ist eher starr und wenig wasserhaltig, da es aus Proteinen, also aus kleinen Komponenten im Nanometerbereich besteht, die sich dichter zusammenlagern können als größere Bestandteile wie Bakterien. Erkennbar wird dies an der negativen Frequenzänderung in allen Frequenzen und der geringen Dissipation.

Ein interessanter Aspekt ist auch, dass die Adsorptionskurven, sobald nach dem verdünnten und modifizierten Speichel mit PBS gespült wird, stärker abfallen. Das trat auch bei anderen Versuchen mit Speicheladsorption auf [84, 147]. Dies hängt mit der unterschiedlichen Viskosität und dem Ionengehalt der einzelnen Flüssigkeiten zusammen.

In Versuchen von Döring mit unverdünntem modifizierten Speichel auf einem

titanbeschichteten Quarzsensoren traten im Durchschnitt höhere Frequenz- und Dissipationsänderungen auf [148], während bei Xu et al. bei einer Speichelkonzentration von 20 % eine ähnliche Menge adsorbierte [142]. Möglicherweise adsorbieren durch die Verdünnung etwas weniger Speichelbestandteile.

4.2 Agglutination von *S. gordonii* mit Speichel

Die Agglutination von *S. gordonii* mit verdünntem modifiziertem Speichel ist eine interessante Nebenerkenntnis dieser Versuche. Da schon nach 4 Stunden sichtbare Ausfällungen zu erkennen waren, kann vermutet werden, dass *S. gordonii* nicht nur an Speichelbestandteile, die auf Oberflächen adsorbiert sind andockt, sondern auch an frei im Speichel vorkommende Proteine. Dies ist evolutionär gesehen interessant, da der Speichel sowohl anhaftungsfördernd als auch eliminierend auf Bakterien wirken kann. Die Antikörper im Speichel könnten für die Verklumpung verantwortlich sein. Es könnten aber auch Speichelproteine sein, die an keiner Oberfläche haften, aber *S. gordonii* mit seinen Adhäsinen trotzdem binden, wie zum Beispiel Sialinsäuren [85] oder Muzine [104].

Vermutlich ist Amylase nicht bei dieser Agglutination beteiligt, da Scannapieco et al. zeigten, dass reine Amylase nicht zur Agglutination von *S. gordonii* führte [39]. Interessant ist auch, dass auf Bildern der verklumpten Bakterien (Abbildung 35) in der Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung dichte Ansammlungen roter (also toter) Bakterien zu sehen sind. Dies könnten Bakterien sein, die so stark agglutiniert wurden, dass sie keine normale Funktion mehr ausführen konnten und abgestorben sind.

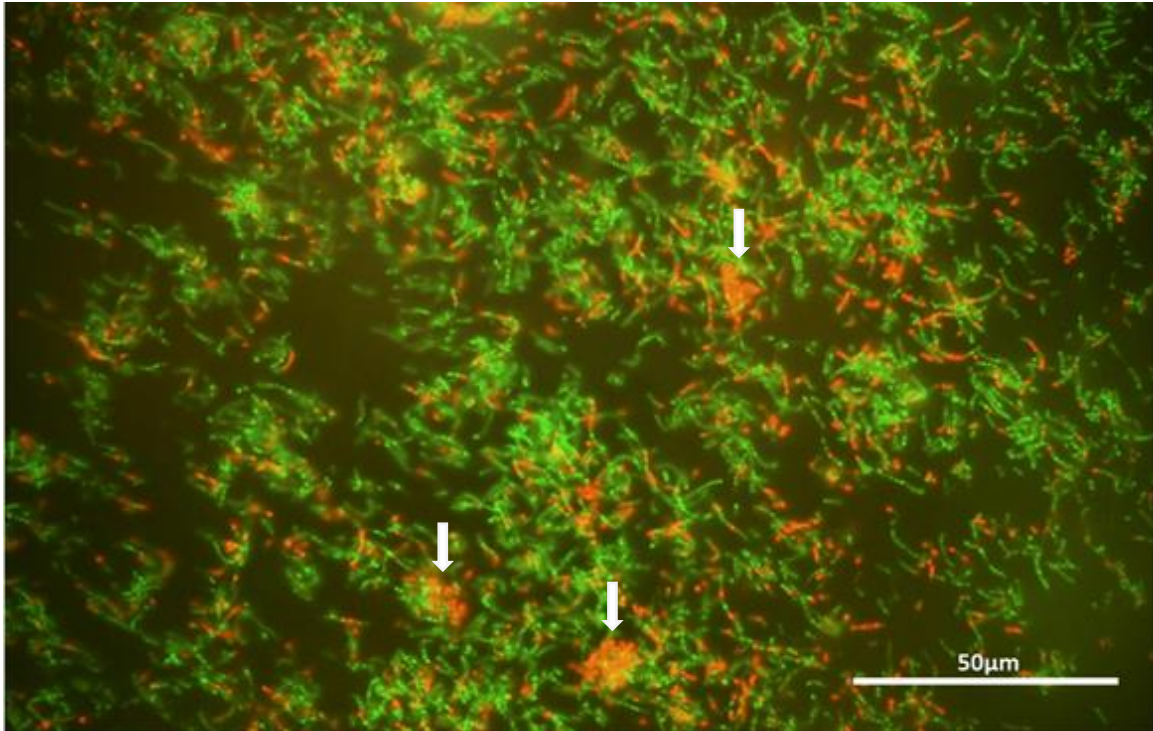


Abbildung 35: Ausstrich von verklumpten Bakterien im Abfallgefäß nach einer 25-stündigen Messung. Vergrößerung 600-fach. Auffällig sind die verklumpten roten Ansammlungen von Bakterien (Pfeile).

4.3 Positive Frequenzänderungen

In dieser Versuchsreihe traten durchweg positive Frequenzänderungen ab Bakterienzugabe auf.

Da diese Versuche die initiale bakterielle Adhäsion bei einer Maximaldauer von 3 Stunden untersucht haben, wird vermutet, dass die Messung beim Vorhandensein der Einzelkultur von *S. gordonii* nicht durch andere Mikroorganismen beeinflusst wird.

Normalerweise würde eine Frequenzzunahme auf eine Desorption, also eine Abnahme der Masse schließen lassen. Da dies aber bei einer blanken Titanoberfläche, die mit Bakterien überspült wird, unmöglich sein dürfte, und da auf den mikroskopisch untersuchten Quarzen immer Bakterien vorhanden waren, muss man nach anderen Erklärungen suchen.

Positive Frequenzänderungen traten schon bei diversen anderen Versuchen in verschiedenen Bereichen auf.

Lapidot et al. ließen Kalziumsulfat-Kristalle auf einem QCM-D Sensor wachsen, was anfangs durchweg negative Frequenzänderungen hervorrief, aber im späteren Stadium des Kristallwachstums vor allem in den Obertonfrequenzen zu positiven Frequenzänderungen führte [149]. Sie entwickelten ein Modell, das annimmt, dass die Kristalle anfangs starr sind und nach dem Sauerbrey-Modell Frequenzabnahmen hervorrufen, während im späteren Stadium die größeren Kristalle elastisch schwingen, den Quarzsensoren durch die starre Kopplung stärker in Schwingung versetzen und positive Frequenzänderungen erzeugen [149].

Bei lebenden Zellen beobachteten Molino et al. positive Frequenzänderungen bei Messungen mit Kieselalgen. Sie vermuteten, dass die Frequenzänderungen durch sich aktiv mit Aktinfilamenten fortbewegende Kieselalgen verursacht wurden [150]. In dieser Studie konnten die Frequenzänderungen nicht durch morphologische Veränderungen oder viskoelastische Effekte der Kieselalgen hervorgerufen worden sein, da diese eine harte Siliziumdioxidschale besitzen. Da *S. gordonii* sich nicht aktiv fortbewegen kann, kann diese Erklärung nicht auf die Ergebnisse der Versuche dieser Arbeit übertragen werden.

Positive Frequenzänderungen bei eukaryonten Zellen wurden von Galli Marxer et al. festgestellt [139]. In deren Studie traten bei der Zugabe eines Aktin-Polymerisations-Beschleunigers auf Leberepithelzellen positive Frequenzänderungen auf. Es wurde vermutet, dass eine festere Zelle, in der mehr Zytoskelett vorhanden ist, eher positive Frequenzänderungen hervorruft als eine normale Zelle.

Bakterien unterscheiden sich nicht nur in ihrer Größe von Leberepithelzellen, trotzdem könnte der Ansatz, dass festere Zellen positivere Frequenzänderungen hervorrufen, auf *S. gordonii* übertragen werden. Eine festere Anhaftung auf der Oberfläche (durch mehr Adhäsion-Rezeptor-Bindungen) könnte zu einem steiferen Biofilm führen, der positivere Frequenzänderungen hervorruft.

Bei Tymchenko et al. traten auch positive Frequenzänderungen auf, bei der Adhäsion von Fibroblasten auf Kollagen und Fibronectin [151]. Es wurden morphologische Veränderungen der Zellen durch Zugabe von Cytochalasin D

induziert, und es wurde angenommen, dass die viskoelastischen Eigenschaften der Zellen für die QCM-D Signale verantwortlich sind [151].

Olsson et al. brachten positive Frequenzänderungen verschiedener *S. salivarius* Linien in Zusammenhang mit deren Fimbrienlänge und -dichte [137]. Es zeigten sich größere positive Frequenzänderungen bei Linien mit mehr und dichteren Fimbrien. Dies wurde mit einem größeren Abstand zum Sensor und nicht mehr in die Bakterien-schicht hineinreichenden Obertonfrequenzen erklärt.

Außerdem wurde in einer anderen Arbeit das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und einer fimbrienfreien Mutante auf einem Quarzsensoren untersucht [152]. Es traten positive Frequenzänderungen auf, die beim Wildtyp stark ausgeprägt und bei der fimbrienfreien Mutante nur sehr schwach waren [152].

Es wurden von Olsson et al. zwei Theorien für die positiven Frequenzänderungen aufgestellt:

1. Die abschwächende Scherschwingung des QCM-D-Geräts trifft mit der Zellwand des Bakteriums auf ein dichteres Medium (davor Wasser), das die Welle reflektiert. So könnte eine stehende Welle entstehen, die sich zwischen den Bakterien und dem Quarzsensoren befindet, und so selbst Oszillationen hervorrufen könnte. Dies würde erklären, warum positive Frequenzänderungen vor allem bei der Grundschwingung und niedrigen Obertonfrequenzen entstehen (durch tiefere Eindringtiefe erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer stehenden Welle).

2. Die Bakterien sind Massen, die punktförmig über die Fimbrien mit der Quarzoberfläche verbunden sind. Durch die punktförmigen Kontakte ist die Masse des Bakteriums nicht fest mit dem Sensor verbunden und wird durch die Oszillation des Quarzes selbst in Schwingung versetzt. Durch die punktförmigen Kontakte und die Größe der Bakterien kommt allerdings eine Trägheit hinzu, die auf den Quarzsensoren eine Rückstellkraft ausübt, die wiederum zu einer höheren Frequenz des Sensors führen kann. Die „aufgehängten“ Bakterien wirken wie ein

mitschwingendes Pendel, das im Gesamtsystem eine höhere Schwingung hervorruft. Diese Theorie wird, wie bei Dybwad (siehe Seite 81) [153] als „coupled-resonator-model“ bezeichnet.

Olsson et al. stellten außerdem fest, dass die Beschaffenheit der Grenzfläche von entscheidender Bedeutung ist.

Allerdings kann man die Ergebnisse von Olsson et al. nicht direkt auf die hier durchgeführten Versuche übertragen. Man muss bedenken, dass nicht jedes *S. gordonii* Bakterium Fimbrien besitzt, und dass diese nach heutigen Erkenntnissen auch nicht sehr dicht verteilt sind [84]. Man würde eine fimbrienfreie Mutante von *S. gordonii* benötigen, um nachzuprüfen, ob diese auch positive Frequenzänderungen hervorruft oder nicht.

Es kann aber vermutet werden, dass ein Abstand zwischen Bakterium und Sensor besteht. Ob dieser durch die spärlichen Fimbrien ausgelöst wird, oder ob eventuell Speichelbestandteile oder EPS die Bakterien auf Abstand halten, ist nicht sicher.

Le et al. untersuchten die Adhäsion von *Lactococcus lactis* [154] (eine Linie, die eine starke Adhäsion zu PGM zeigte, und eine, die dies nicht tat) auf PGM (Pig Gastric Mucin) und auf Styropor. Der Keim mit bekannter starker Adhäsion zeigte auf PGM eine deutlich größere positive Frequenz- und Dissipationsänderung als der andere Keim. Die Autoren vermuten hier eine Adhäsion nach dem coupled-resonator-model von Olsson et al. [137] bzw. Dybwad [153] mit positiven Frequenzänderungen. Weiterhin auffällig hier ist, dass trotz der eigentlich stärkeren Adhäsion weniger Bakterien auf PGM als auf reinem Styropor adhärten. Dies wird auf die eigentlich protektive Funktion des Muzins zurückgeführt.

Auch hier konnten die Daten nicht nach Sauerbrey ausgewertet werden, und es wurde vermutet, dass die Steifigkeit der Bindungen eine wichtige Rolle spielt.

Bei Marcus et al. wurden positive Frequenzänderungen bei der Adhäsion von *P. aeruginosa* auf hydrophoben Oberflächen gemessen, sowohl wenn der Sensor

hydrophob war, als auch wenn die Bakterienoberfläche hydrophob war. Es wurde eine stabile elastische Verbindung vermutet, bei der die Hydrophobie dafür sorgt, dass mehr Wassermoleküle die Oberfläche verlassen und durch Zellwandkomponenten ersetzt werden [155].

Dybwad benutzte QCM schon 1985, um den Kontakt zwischen dem Quarzsensoren und einer darauf liegenden Kugel an Luft zu untersuchen [153]. Da die Kugel einen punktförmigen Kontakt zum Quarzsensoren hat, ist sie elastisch mit diesem verbunden und hat beim Anlegen der Spannung eine eigene Resonanzfrequenz. Ist die Masse der Kugel gering, ist die eigene Resonanzfrequenz der Kugel viel größer als die des Quarzkristalls. Diese Situation wäre mit der Sauerbrey-Gleichung berechenbar.

Hat die Kugel aber eine Größe im Mikrometerbereich, ist die Eigenfrequenz der Kugel geringer als die des Quarzes. Dies resultiert in positiven Frequenzänderungen nach dem coupled-resonator-model proportional zur Steifheit des Kontaktes und unabhängig von der Masse der Kugel [153].

Pomorska et al. übertrugen die Versuche von Dybwad ins wässrige Milieu und untersuchten Kolloid-Partikel verschiedener Größe [156]. Sie fanden heraus, dass größere Partikel (über 1 μm) auch in wässrigem Milieu positive Frequenzänderungen zeigten. Durch Finite-Elemente Kalkulationen wurde angenommen, dass diese Frequenzänderungen durch Punktkontakte zwischen den Partikeln und der Sensoroberfläche hervorgerufen wurden [156]. Adhärenz große Objekte mit schwachen Bindungen auf dem Kristall, zeigte die positive Frequenzänderung wie bei Dybwad nicht die Masse, sondern die Steifigkeit der Verbindung des Objekts auf dem Quarz.

Dies ist sehr interessant, da punktförmige Kontakte auch bei Bakterien eine Rolle spielen könnten. *S. gordonii* ist kugelförmig und hat nur eine geschätzte Größe von 0,5 μm , könnte aber trotzdem noch in das Modell passen.

Auch für *S. gordonii* traten schon mit einem QCM-Messsystem mit einem 10 MHz Quarz (qCell T-Gerät, 3T analytik, Tuttlingen, Deutschland) positive

Frequenzänderungen sowohl auf Pellikel als auch auf thrombozytenarmem Blutplasma auf einem Goldsensor auf, während sich mit thrombozytenreichem Blutplasma negative Frequenzänderungen zeigten [84].

Da *S. gordonii* viele Bindungsstellen für Thrombozyten hat, wurde angenommen, dass der Film mit thrombozytenreichem Blutplasma eine höhere Steifigkeit hat und mit der konventionellen Massentheorie erklärt werden kann, während auf Speichel und thrombozytenarmem Plasma weichere Filme entstehen.

Mit demselben qCell T-Gerät traten bei *S. gordonii* auf einem Titansensor große negative Frequenzänderungen auf, während auf Pellikel schwache positive Frequenzänderungen wie in dieser Versuchsreihe zu erkennen waren [142].

Bei QCM-D-Messungen mit *S. gordonii* mit einem neuen System (OpenQCM Q⁻¹, Novaetech, Neapel, Italien) und einem 10 MHz Quarz traten auch positive Frequenzänderungen auf [157], allerdings auf Gold. Es ist trotzdem auffällig, dass *S. gordonii* wohl auf Gold ähnlich adhärert wie auf Titan.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass viele der hier erwähnten Studien positive Frequenzänderungen mit punktförmigen Kontakten oder einer erhöhten Steifigkeit der Bindung oder der Zellen selbst in Verbindung brachten.

Man muss allerdings beachten, dass bei den meisten Versuchen schwache Verbindungen vorhanden waren. Das legt den Schluss nahe, dass positive Frequenzänderungen insgesamt auf elastische und eher schwache Kontakte hinweisen. Innerhalb der schwachen Verbindungen sind jedoch diejenigen mit höheren positiven Frequenzänderungen steifer. Bei einer starken Verbindung, die nicht mehr elastisch ist, sind dann negative Frequenzänderungen zu erwarten.

Da *S. gordonii* bekanntermaßen viele Adhäsine für Speichelproteine hat, und bei den Versuchen mit Pellikel größere positive Frequenzänderungen zu sehen waren, ist es wahrscheinlich, dass auch hier mit Pellikel eine steifere Verbindung als bei *S. gordonii* auf reinem Titan besteht. Diese Erkenntnis würde sich mit den Versuchen von Pomorska et al. decken [156].

4.4 Anfänglicher Abfall der Frequenz

Der anfängliche Abfall der Frequenz ab Bakterienzugabe trat ohne Pellikel stärker auf (siehe 3.9 Tabelle 6), und war in den hohen Obertonfrequenzen größer. Er ereignete sich ohne Pellikel innerhalb der ersten 25 Minuten ab Bakteriengabe, und hatte das Minimum bei 10 – 15 Minuten. Bei Adhäsion auf die Pellikelschicht trat er schwächer und auch nur in der 5. und 7. Obertonfrequenz auf, und zwar innerhalb der ersten 15 Minuten mit Minimum bei ca. 10 Minuten.

Zu Beginn fällt die Frequenz leicht ab, die positiven Frequenzänderungen finden also erst nach ca. 20 Minuten statt. Es liegt nahe, dass die Bakterien zu Beginn noch über den Quarzsensor „rollen“ und sich nur wenige Bindungen ausbilden. Die wenigen schwach gebundenen Bakterien reichen nicht aus, um den Quarzsensor nach dem coupled-resonator-model zu stärkerer Schwingung anzuregen. Stattdessen dämpfen sie die Schwingung des Quarzes ab, was zu einem kleinen Frequenzabfall führt. Erst im weiteren Verlauf binden die Bakterien elastisch an den Quarz und sind auf der Oberfläche immer dichter gepackt, bis sie Seite an Seite stehen und die Schwingungsenergie des Quarzes nicht mehr an das Umgebungsmedium abgeben können. Erst in dieser Form können sie die Frequenz des Quarzes erhöhen und positive Frequenzänderungen hervorrufen.

Ohne Pellikel würde der Vorgang der schwachen Bindungen länger dauern, da die Adhäsion mit unspezifischeren Bindungen abläuft, während mit Pellikel schneller elastische Bindungen zu den Proteinen des Pellikels und so auch zum Quarz ausgebildet werden können. Der Übergang zu den positiven Frequenzänderungen findet mit Pellikel schneller statt.

4.5 Vergleich der Sensorsignale mit und ohne Pellikel

4.5.1 Frequenz

Die Frequenz ist in der Grundfrequenz mit Pellikel am Ende der Messung doppelt so hoch wie ohne Pellikel.

Da aber nicht mehr, sondern weniger Bakterien vorhanden sind, kann die größere positive Frequenzänderung nicht von einer erhöhten schwingenden Bakterienmasse herrühren. Der Grund für die Änderung muss innerhalb des Biofilms liegen.

Eine wahrscheinliche Erklärung ist, dass die durch das Pellikel gegebene spezifische Anhaftung eine steifere Verbindung zwischen Bakterien und Quarz erzeugt, die dafür sorgt, dass weniger Energie an das Umgebungsmedium abgegeben wird, und mehr an den Quarz. So schwingt das Gesamtsystem aus Quarz und daran haftendem Bakterium schneller und die Frequenz erhöht sich entsprechend dem coupled-resonator-model von Olsson et al. [137] bzw. Dybwad [153]. Die verantwortlichen spezifischen Bindungen zwischen Adhäsinen und Pellikel sind unspezifische Kräfte, die aber hochlokalisiert auf bestimmten Oberflächenregionen auftreten und deshalb stärker als unspezifische Bindungen sind [30].

Betrachtet man *S. gordonii* mit seinen vielen Adhäsinen für Bestandteile des Pellikels, erscheint es logisch, dass es durch Rezeptoren für Amylase [78], Sialinsäuren [86], PRPs [102], Muzine und Glykoproteine [104] eine steifere Verbindung zum Pellikel aufbauen kann als zu einer reinen Titanoberfläche, auf die es mit unspezifischen Anhaftungssystemen adhäriert.

Dass die positive Frequenzänderung mit der Höhe der Obertonfrequenz geringer wird, könnte daran liegen, dass die Grundfrequenz am weitesten in die Probe hineinreicht (252 nm), also die Bakterien am besten noch erreichen kann. Da die Obertonfrequenzen nur 146 nm (F3), 113 nm (F5) und 95 nm (F7) weit in die Probe reichen, nehmen sie weniger der positiven Signale der Bakterien auf und messen eher in der Nähe des Pellikels, wo Proteine adsorbiert sind.

4.5.2 Dissipation

Im Gegensatz zur Frequenz ist die Dissipation bei Messungen mit Pellikel in allen Frequenzen geringer. Dies zeigt einen deutlich geringeren Einschluss von Wasser in dem Biofilm mit Pellikel und eine höhere Steifigkeit.

Je höher die Obertonfrequenz, desto niedriger die Dissipation. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass der Biofilm weiter von der Sensoroberfläche entfernt immer wasserhaltiger wird, weil dort Bakterien detektiert werden, während in den untersten Schichten Proteine (entweder vom Pellikel oder eventuell auch von den Bakterien sekretierte Proteine wie Glykosyltransferasen oder AbpA) vorhanden sind, die den Film in den tieferen Ebenen dichter machen.

Auffällig ist weiterhin die Dissipation von 100 E-6 ohne Pellikel und von nur 40 E-6 mit Pellikel in der Grundfrequenz. Daran kann man erkennen, dass das Pellikel, das sich ja nur in der untersten Ebene direkt über dem Quarzsensor befindet, trotzdem einen Einfluss auf die Beschaffenheit des Biofilms über die gesamten 252 nm, die detektiert werden können, hat. Die viel schwächere Dissipation mit Pellikel legt einen geringeren Einschluss von Wasser nahe, der durch einen dichteren Biofilm zu erklären ist.

Es stellt sich allerdings die Frage, warum dann trotz dichteren Biofilm weniger Bakterien an das Pellikel binden als an die blanke Titanoberfläche. Möglicherweise sorgen die vergleichsweise großen Bakterien dafür, dass zwischen den Bakterien mehr Wasser eingelagert ist. Mit einer erhöhten Bakterienmasse könnte dann der Film wasserhaltiger werden.

Möglicherweise ist der Biofilm mit Pellikel auch insgesamt steifer, sodass die evaneszente Welle des QCM-D-Geräts nach Beenden der Anregung nicht so schnell zum Stillstand kommt wie beim Biofilm ohne Pellikel, der nicht so steif gebunden ist.

4.5.3 D/F Verhältnis

Man kann die Dissipation über die Frequenz auftragen, um die Rigidität des Biofilms zu beurteilen. Dabei zeigt ein niedriges $\Delta D/\Delta F$ Verhältnis, also eine niedrige Steigung der Kurve, eine Massezunahme ohne signifikanten Dissipationsanstieg. Dies bedeutet, dass ein eher fester, starrer Film vorliegt [154].

Ein hohes Verhältnis spricht dagegen für einen weichen und dissipativen Film.

Abbildung 36 zeigt ohne Pellikel eine steilere Kurve, was für einen weicheren Film spricht. Auffällig ist der anfängliche Ausfall ins Negative, der den anfänglichen Abfall der Frequenz bei der Messung ohne Pellikel zeigt. Das deutet auf eine starre und dämpfungsarme Bindung zu Beginn hin.

Die Kurven der Obertonfrequenzen verlaufen ähnlich, auch dort sind die Kurven mit Pellikel flacher.

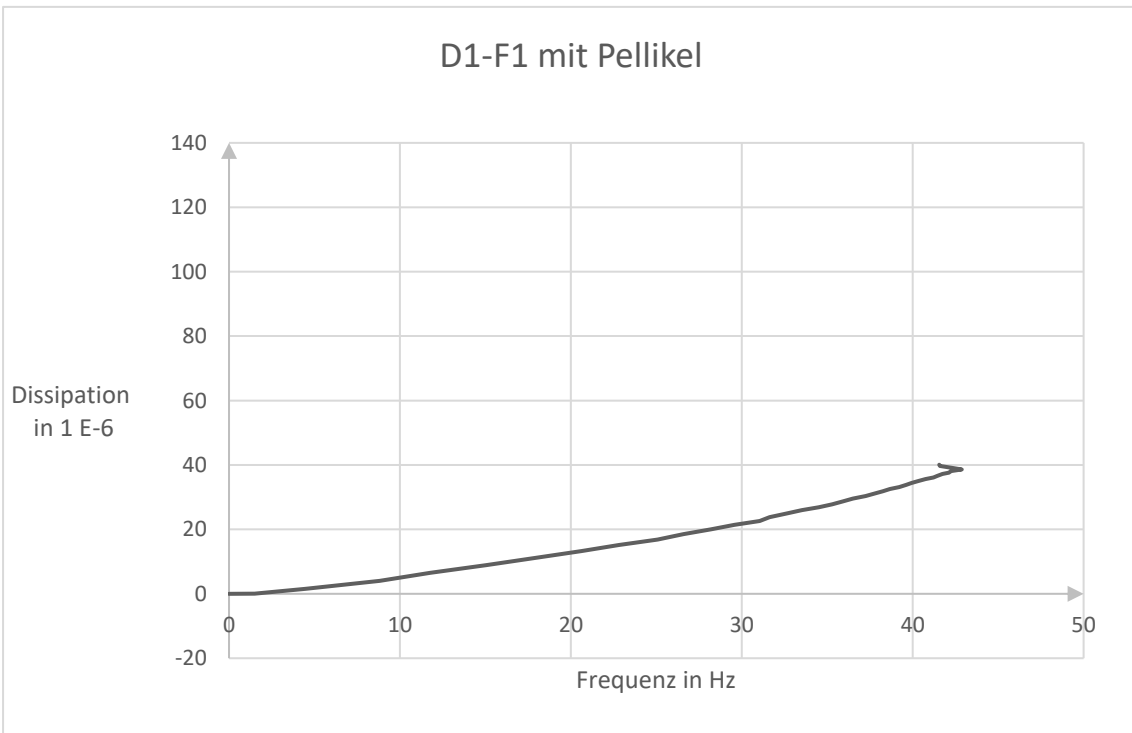
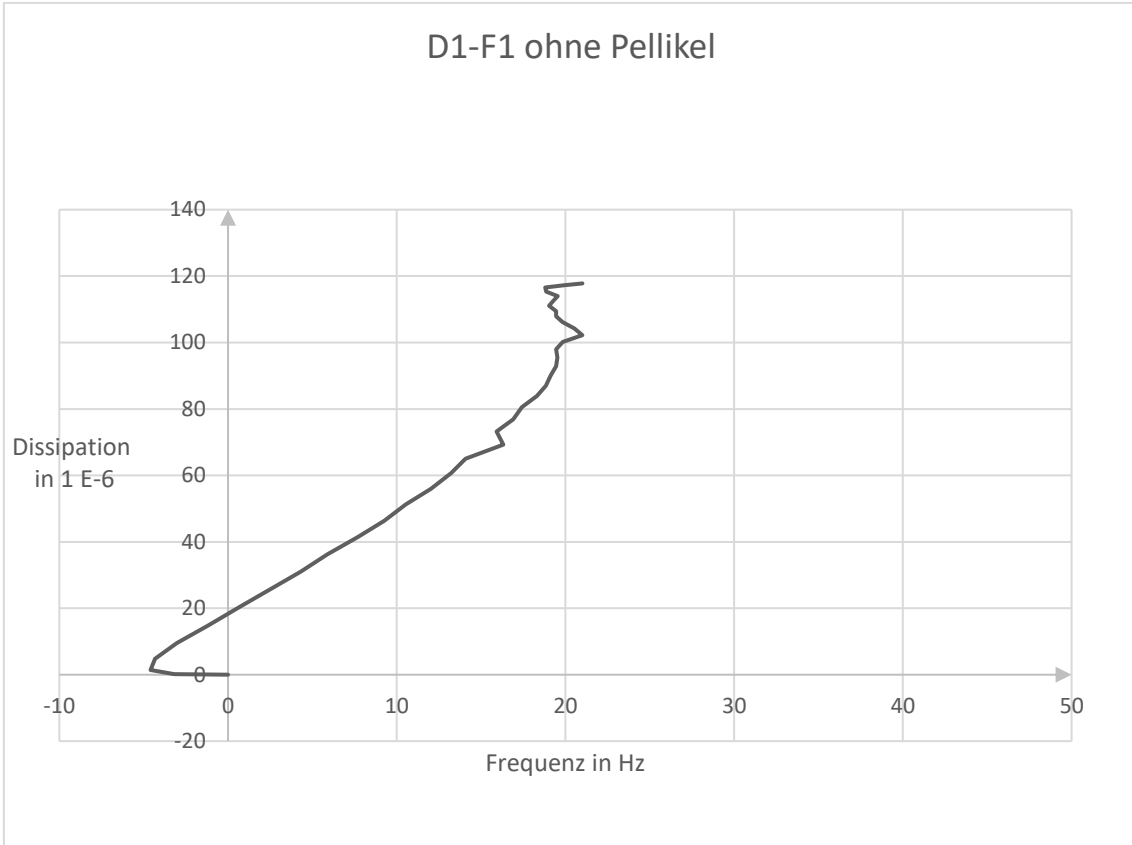


Abbildung 36: D-F-Diagramme ohne Pellikel (oben) und mit Pellikel (unten).
 Zusammengestellt aus den Mittelwerten der Grundfrequenz und den dazu
 gehörenden Mittelwerten der Dissipation der Grundfrequenz.

4.5.4 Kristallviolett

Auf der Titanoberfläche mit Pellikel waren weniger Bakterien vorhanden als auf dem unkonditionierten Titan. Dies entspricht dem Ergebnis von Rogers, der die Adhäsion von *S. gordonii* DL1 auf Hydroxylapatit mit und ohne Pellikel verglich [158].

Zur Adhärenz von *S. gordonii* mit und ohne Pellikel gibt es sehr widersprüchliche Ergebnisse.

So zeigten Versuche von Gibbons et al. mit *S. gordonii* (hier Blackburn-Stamm) mehr Bakterien auf Hydroxylapatit mit Pellikel [102].

Genauso stellten Edgerton et al., allerdings nur mit HSMSL-Pellikel (nur aus *Gl. submandibularis* und *sublingualis*) eine erhöhte Adhäsion von *S. gordonii* auf Titan fest [38]. Es ist aber zu beachten, dass die Bedingungen nicht identisch waren. Während in den Versuchen dieser Arbeit eine Messzelle mit einer planen Sensor-Oberfläche benutzt wurde, verwendeten Edgerton et al. Titan-Granulat in Tubes und inkubierten die Bakterien für 2 Stunden auf einem Schüttler. Dabei traten vermutlich größere Scherkräfte auf als in der hier durchgeführten Versuchsreihe. Dies könnte die These unterstützen, dass die Bakterien auf Oberflächen mit Pellikel stärker anhaften. Da auf einem Pellikel mehr spezifische und somit stärkere Bindungen vorhanden sind, könnte es sein, dass diese bei großen Scherkräften besser haften als Bakterien mit unspezifischen Bindungen ohne Pellikel.

Die Scherkräfte, die in dieser Versuchsreihe auftraten, sind sehr gering. Wu et al. zeigten schon, dass in einer QCM-D-Messzelle bei einer Durchflussrate von 110 $\mu\text{l}/\text{min}$ Scherraten von $0,064 \text{ s}^{-1}$ auftraten [147]. Bei kleinen Scherkräften dieser Größenordnung können diese vernachlässigt werden. Werden die Scherkräfte jedoch größer, wie in der Studie von Edgerton et al., so könnten auf dem Pellikel mehr Bakterien haften als auf der bloßen Titanoberfläche, weil sie durch die Bindung am Pellikel besser gegen Abscherung geschützt sind.

Die Bakterienadhäsion ist also sehr sensibel, Faktoren wie der Bakterienstamm, die Oberflächencharakteristik oder die Fließgeschwindigkeit der umgebenden Flüssigkeit können starke Einflüsse ausüben.

Mithilfe der Kristallviolett-messung konnte gezeigt werden, dass bei in dieser Versuchsreihe gebildeten Biofilmen mit Pellikel weniger Bakterien vorhanden waren, trotz größerer Frequenzzunahme. Dies zeigt, dass die Frequenzzunahme durch eine Veränderung innerhalb des Biofilms und nicht durch die Bakterienanzahl hervorgerufen wurde.

Hingegen steigt die Dissipation mit der Anzahl der Bakterien an, vermutlich weil eine größere Anzahl von Bakterien mehr Wasser mitzieht, beziehungsweise einschließt.

Möglicherweise adhären mit Pellikel weniger Bakterien, weil die antibakteriellen Bestandteile des Speichels (unter anderem IgA, Lactoferrin und Lysozym) eine bestimmte Anzahl der Bakterien eliminieren. Diese Theorie ist aber eher unwahrscheinlich, da Bakterien im Überschuss durch die Messzelle geschickt werden, und im Verhältnis dazu die Menge der adsorbierten Speichelmoleküle eher gering ist.

Die weiteren Erklärungen für dieses Phänomen werden in Kapitel 4.7 Hypothesen diskutiert.

4.6 Vorgänge an der Grenzfläche

Fasst man alle bisherigen Erkenntnisse zusammen, kommt man zu dem Schluss, dass die in dieser Versuchsreihe gebildeten Biofilme sich in ihrer Festigkeit unterscheiden. So hat der auf Pellikel gebildete Biofilm einen geringeren Wassergehalt (D niedriger als ohne Pellikel) und enthält weniger Bakterien (KV niedriger als ohne Pellikel), während die Steifigkeit größer (F höher als ohne Pellikel) ist. Der Biofilm, der sich ohne Pellikel bildet, hat einen höheren Wassergehalt, enthält mehr Bakterien und ist weniger steif.

Wie aber bei bisher allen Versuchen mit positiven Frequenzänderungen können auch hier nur Hypothesen aufgestellt werden, da die Interpretation dieser Daten schwierig ist, und die Herkunft der positiven Signale noch nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Al-Ahmad et al. beschreiben in ihren Versuchen zur initialen Besiedelung von Implantatmaterialien, dass fast nur die Oberflächentopografie für die Besiedelung

ausschlaggebend ist [54]. Betrachtet man nun die sich unterscheidenden Frequenzen und Dissipationen mit und ohne Pellicel, die unter dem Mikroskop außer der Anzahl der Bakterien keine Veränderungen zeigen, aber eine Veränderung der Struktur des Biofilms nahelegen, ist das Pellicel ebenfalls eine wichtige Komponente bei der bakteriellen Adhäsion und sollte bei Versuchen mit Biofilmen, die den Mundraum betreffen, nicht ignoriert werden.

Für die weitere Forschung wäre es sehr interessant, die Bindung von *S. gordonii* an das Pellicel zu unterdrücken, da dies einen ersten Schritt zur Entwicklung von bakterienarmen Oberflächen darstellen würde.

4.7 Hypothesen

Da bei den hier durchgeführten Versuchen mit zunehmender Bakterienmasse die Frequenz steigt und nicht wie man vermuten würde abfällt, taucht man in das Gebiet der bakteriellen Wechselwirkungen an Grenzflächen ein, eine für diese Organismen lebensnotwendige und evolutionär stark ausgeprägte Eigenschaft. Die Bindung von Bakterien an Oberflächen ist nicht starr, sondern geschieht in verschiedenen Stufen und involviert verschiedene unspezifische und spezifische Anhaftungssysteme (siehe 1.6.4 Adhäsine).

Aufgrund der verschiedenen Anhaftungssysteme von Bakterien ist es schwer zu differenzieren, welches im Einzelnen für eine bestimmte Reaktion verantwortlich ist.

Im Folgenden werden 3 Hypothesen aufgestellt, wie die Veränderungen beim Biofilm, der sich auf Pellicel bildet, zu erklären sind.

1. Krajewski et al. entdeckten mithilfe von Rasterkraftmikroskopie, dass Fimbrien vor allem an den Polen von *S. gordonii* DL1 lokalisiert sind [84]. Nimmt man nun an, dass *S. gordonii*-Ketten vor allem mit ihren Fimbrien an den Polen an das reine Titan binden, da durch die vergrößerte Oberfläche stärkere Van-der-Waals Kräfte wirken, könnten sich die Bakterienketten im weiteren Verlauf teilweise aufstellen, da die mittleren Bakterien in der Kette nicht so stark binden können und von neuen

endständigen Bakterien anderer Ketten verdrängt werden. Im Gegensatz dazu wären im Versuch mit Pellikel auf allen Bakterien (nicht nur an den endständigen) viele Bindungsstellen für das Pellikel vorhanden (dies sind zum Beispiel Adhäsine auf der Zellwand für Amylase, Sialinsäurereste, Glykoproteine, prolinreiche Proteine, Muzine und Agglutinin, siehe 1.6.4). Dadurch legen sich die Streptokokkenketten auf die mit Pellikel konditionierte Oberfläche und sie adhären fester, sorgen dadurch aber auch dafür, dass weniger Bakterien insgesamt adhären können. Diese Theorie, in Abbildung 37 skizziert, würde die größere Anzahl von Bakterien ohne Pellikel erklären, genauso wie die größere Dissipation ohne Pellikel (Die Bakterien stehen nicht so dicht, die Ketten ragen beweglich und dämpfend ins Medium hinein und es befindet sich mehr Wasser in den Zwischenräumen) und die geringere Frequenzänderung ohne Pellikel (aufgrund des nicht so steifen Films).

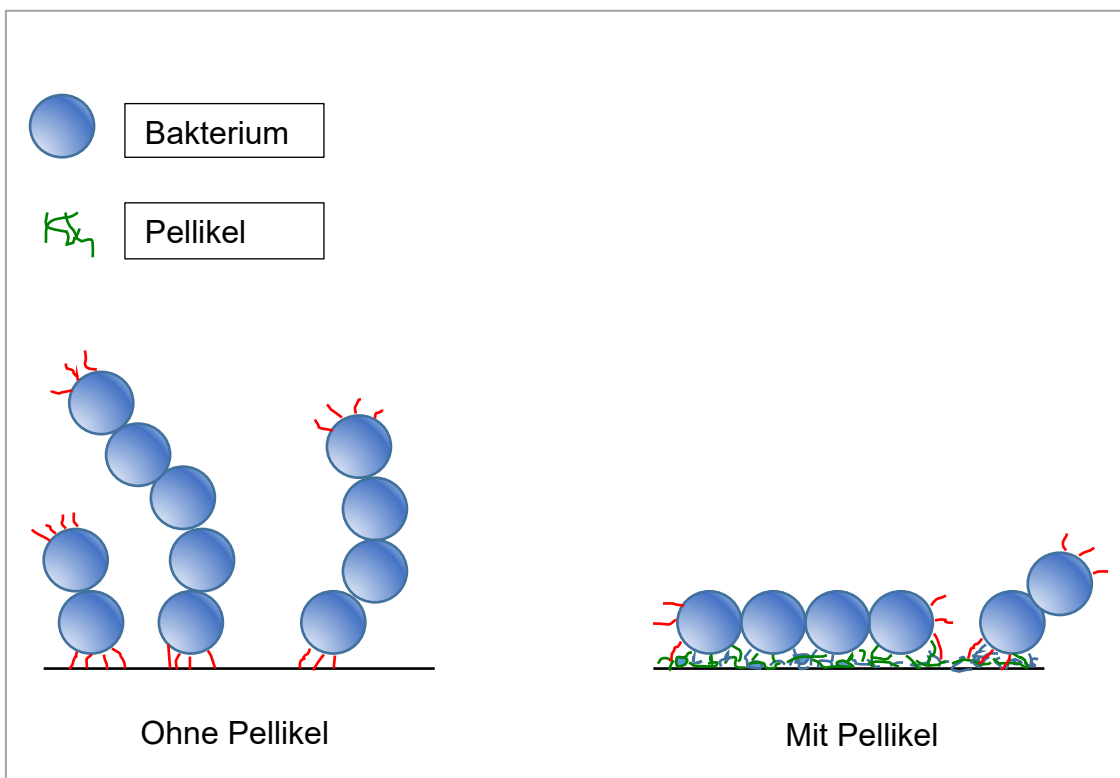


Abbildung 37: Schematische Darstellung von Hypothese 1: Ohne Pellikel binden die Bakterien vor allem mit ihren Fimbrien (rot), die an den polaren Regionen lokalisiert sind, am Quarz, während mit Pellikel (grün) Rezeptoren auf der gesamten Quarzoberfläche gebunden werden können.

2. Abbildung 38 zeigt schematisch, wie spezifische Bindungen im Pellikel für ein stärkeres Anhaften der Bakterien sorgen könnten. Es sind mehr Bindungen vom Biofilm zum Quarz vorhanden, dadurch entsteht eine steifere Verbindung zwischen Quarz und Bakterien und der Quarz wird aufgrund des coupled-resonator-models stärker in Schwingung versetzt. So steigt die Frequenz stärker als bei den schwächer gebundenen Bakterien ohne Pellikel. Die erhöhte Anzahl von spezifischen, also stärkeren Bindungen kann gut mit dem Vorhandensein des Pellikels und mit den darin enthaltenen verschiedenen Speichelproteinen, die an *S. gordonii* binden, erklärt werden. Ohne Pellikel binden die Bakterien nur mit unspezifischen Bindungen, sind elastischer gebunden und versetzen den Quarz nicht so stark in Schwingung wie die steifer an das Pellikel gebundenen Bakterien. Dass ein Bakterium *S. sanguinis*, ein naher Verwandter von *S. gordonii*, 13.000 bis 33.000 Proteine Amylase binden kann [159], zeigt anschaulich, wie viel mehr Bindungsstellen mit Pellikel vorhanden sein könnten. Weiterhin ist Amylase nur eines der Proteine, an das *S. gordonii* binden kann, es gehört zu den Bakterien mit den meisten Bindungsstellen für Bestandteile des Speichels [5]. Eventuell sind mit Pellikel weniger Bakterien vorhanden, weil die anhaftenden Bakterien in einen Biofilmmodus wechseln, bei dem zwischen den Bakterien mehr Abstand gelassen wird, um später genug Platz für Nährstoffe und die Biofilmmatrix zu haben.

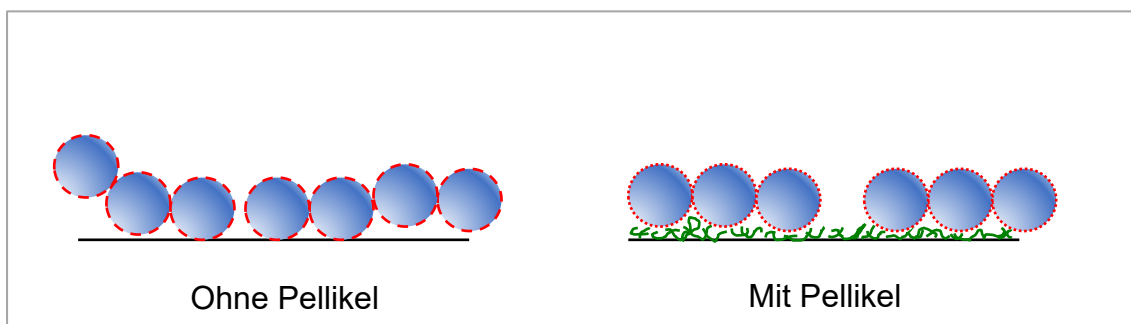


Abbildung 38: Schematische Darstellung von Hypothese 2: Ohne Pellikel sind nicht so viele Bindungsstellen (rote Areale auf den Bakterien) vorhanden, was für ein schwächeres Anhaften sorgt. Mit Pellikel (grün) gibt es mehr Bindungsstellen und die Bakterien können mehr Bindungen zum Pellikel ausbilden.

3. *S. gordonii* sekretiert Substanzen sobald es mit Pellikelbestandteilen in Berührung kommt. Da in Vorversuchen schon die Gabe von Zuckerlösung das QCM-D Signal veränderte, ist es wahrscheinlich, dass sezernierte Substanzen dies auch tun würden. Im Überstand von Bakterienkulturen von oralen Streptokokken wurde AbpA nachgewiesen [17]. Weiterhin kann *S. gordonii*, wie in der Einleitung erklärt, Glykosyltransferasen freisetzen, die Glukane bilden. Die Produktion dieser Proteine und möglicherweise weiterer, bis jetzt noch nicht identifizierter Proteine, könnte zu einer dichteren Verteilung dieser Proteine in der Nähe des Quarzsensors führen. Nicht sicher ist allerdings, ob *S. gordonii* wirklich mehr dieser Proteine herstellt, wenn ein Pellikel vorhanden ist. Bis jetzt ist nur bekannt, dass AbpA vermehrt hergestellt wird, wenn in der Umgebung von *S. gordonii* Maltose oder Maltotriose vorhanden sind. Im modifizierten Speichel könnten diese vorhanden sein. Zwar wurde der Speichel nüchtern gesammelt, dennoch könnten noch Reste von Stärke oder deren Abbauprodukte durch Amylase vorhanden gewesen sein. Die sezernierten Substanzen würden, wie in Abbildung 39 skizziert, für einen dichteren Biofilm sorgen und erklären, warum die Dissipation mit Pellikel geringer ist. Falls die sezernierten Substanzen Adhäsine sind, könnten sie wiederum für eine stärkere Bindung der Bakterien an den Quarz sorgen und zu größerer Frequenzänderung führen.

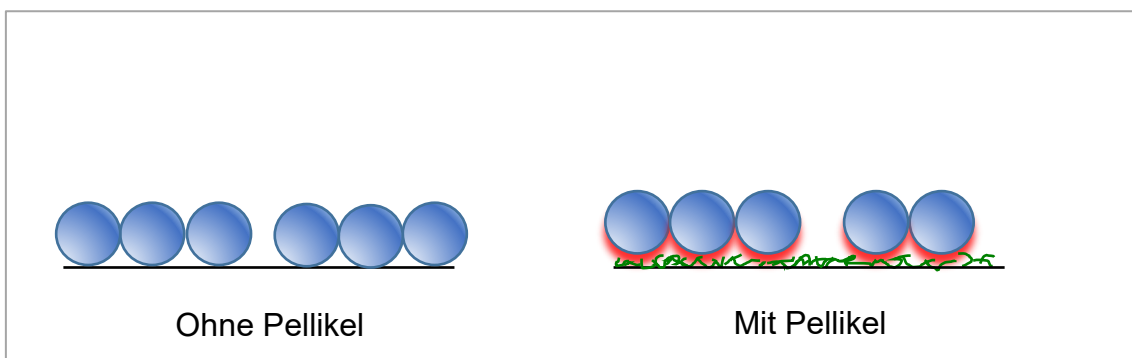


Abbildung 39: Schematische Darstellung von Hypothese 3: Ohne Pellikel binden die Bakterien unspezifisch. Mit Pellikel (grün) wird durch dessen Bestandteile die Ausschüttung von Stoffen ausgelöst (rot), die den Biofilm verdichten.

4.8 Korrelation der Bakterienzahl mit Frequenz und Dissipation

Die Kristallviolett färbung zeigt, dass die Dissipation besser mit der Bakterienzahl korreliert als die Frequenz. In den einzelnen Messungen ist dieser Trend nicht sehr deutlich auszumachen, was vermutlich an dem zwar schwachen, aber unterschiedlich starken Drift, der in den verschiedenen Messungen vorkam, liegt. Auch Westas et al. fanden, allerdings bei menschlichen Fibroblasten, eine Korrelation zwischen Dissipation und Zellzahl auf den Quarzsensoren [160].

Die Korrelation der Dissipation mit der Anzahl der Bakterien ist nachvollziehbar, da die Dissipation anzeigt, wie viel Wasser ein Film enthält und durch eine höhere Anzahl vergleichsweise großer Bakterien der Film wasserhaltiger wird.

Für die Korrelation der Bakterienzahl mit der Dissipation spricht weiterhin, dass mit Pellicel kleinere Dissipationswerte und gleichzeitig weniger Bakterien auftraten, während ohne Pellicel mehr Bakterien adhärten und dort auch die Dissipation höher war. Trotzdem waren mit Pellicel 72,2 % der Bakterien verglichen mit der Zahl ohne Pellicel vorhanden, während die Dissipation nur 40 % verglichen mit der Dissipation ohne Pellicel war. Im Vergleich mit und ohne Pellicel passt die Korrelation nicht so gut wie im Vergleich verschiedener gleicher Messungen über die gesamte Zeit.

Nicht nur deshalb sollte die Dissipation nicht vorbehaltlos als Indikator der Bakterienanzahl übernommen werden. Es können zwischen einzelnen Messungen auch leicht größere Schwankungen, zum Beispiel verursacht durch einen anfänglichen Drift, entstehen. Kristallviolett messungen sind ein wesentlich sichererer Indikator für die Anzahl der Bakterien.

Ein weiteres Problem ergibt sich bei unterschiedlichen Anhaftungsbedingungen wie in den hier durchgeführten Versuchen. Da mit Pellicel der komplette Anhaftungsprozess verändert wurde, kann man nicht mit Sicherheit sagen, ob mögliche Änderungen des Wassergehaltes von einer Veränderung der Bakterienzahl oder von einer Änderung der Struktur des Biofilms herrühren.

4.9 Vergleich des D300-Systems mit anderen QCM-D-Systemen

Es wurden schon diverse Versuche mit QCM-D und *S. gordonii* durchgeführt, bei denen unterschiedliche QCM-D-Systeme zur Anwendung kamen. Um die Ergebnisse zu vergleichen und einzuordnen, wurde Tabelle 7 erstellt, die Versuche zeigt, deren Durchlaufprotokolle denen dieser Arbeit ähneln.

Xu et al. [142] und Krajewski et al. [84] benutzten das qCell T-Gerät (3T analytik, Tuttlingen, Deutschland), das eine Grundfrequenz von 10 MHz hat und keine Obertonfrequenzen aufzeichnet, während Schultheiß [157] das relativ neue OpenQCM Q⁻¹ (Novaetech, Neapel, Italien) benutzte. Dieses kann mit Quarzsensoren mit verschiedenen Grundfrequenzen betrieben werden, und es können Obertonschwingungen gemessen werden, allerdings nicht simultan. Weiterhin konnte mit diesem System die Temperatur in der Messzelle nicht konstant gehalten werden, was die Messungen etwas verfälscht.

Die Laufzeiten der Versuche in dieser Arbeit waren länger, da die Kurven aber einen Sättigungscharakter hatten und sich in der letzten Stunde nicht mehr stark veränderten, können sie verglichen werden. Die Flussrate dieser Arbeit (110 µl/min) war auch höher als die der anderen hier zitierten Versuche (60-71 µl/min), kann aber immer noch als sehr gering eingestuft werden. Es ist unwahrscheinlich, dass sich das Adhäsionsverhalten bei einem Unterschied der Flussrate dieser Größenordnung ändert.

Da bei allen Arbeiten *S. gordonii* über Titan und Gold mit und ohne Speichelkonditionierung geschickt wurde, sollten die erhaltenen Werte für die einzelnen Metalle ähnlich sein. Auf Titan sollten die Werte der 10 MHz-Sensoren zwischen den gemessenen 5 MHz und 15 MHz Werten dieser Arbeit liegen.

Es fällt allerdings auf, dass die gemessenen Werte ohne Pellikel sich sehr stark voneinander unterscheiden, die beobachteten Frequenzänderungen gehen von +59 bis -445 Hz, während die gemessene Dissipation sogar von +24 bis +1298 E-6 reicht.

Im Gegensatz dazu sind die gemessenen Werte mit Pellikel einheitlich, und auf Titan mit Pellikel stimmen die Werte nahezu überein.

Tabelle 7: Vergleich verschiedener QCM-D-Messungen mit S. gordonii mit und ohne Pellikel. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen sind Mittelwerte aus mindestens n=3 Messungen, die mit (E) gekennzeichneten Werte sind Einzelwerte.

	Diese Arbeit	Xu et al.	Schultheiß	Krajewski et al.
Sensoroberfläche	Titan	Titan	Gold	Gold
QCM-D-Gerät	Q-Sense D300	3T analytik qCell T	OpenQCM Q ⁻¹	3T analytik qCell T
Aufgezeichnete Frequenzen	5 MHz, 15 MHz, 25 MHz, 35 MHz	10 MHz	10 MHz	10 MHz
Laufzeit Bakterien	180 min	120 min	120 min	150 min
Flussrate	110 µl/min	60 µl/min	70,8 µl/min	60 µl/min
Kontaktwinkel	22° hydrophil	47° moderat hydrophil	n. a.	66° moderat hydrophil
ΔF nur S. g. (Hz)				
5 MHz	+22		+59	-445
10 MHz		-226		
15 MHz	+14			
ΔD nur S. g. (1 E-6)				
5 MHz	+100			
10 MHz		+398	+135 (E)	+1298
15 MHz	+24			
ΔF Pellikel + S. g. (Hz)				
5 MHz	+42			
10 MHz		+39	+144	+101
15 MHz	+20			
ΔD Pellikel + S. g. (1 E-6)				
5 MHz	+40			
10 MHz		+28	+35 (E)	+76
15 MHz	+7			

Mit Pellikel fällt die Oberfläche des Sensors nicht stark ins Gewicht, es sind sowohl auf Titan als auch auf Gold positive Frequenz- und Dissipationsänderungen zu erkennen.

Es ist bekannt, dass abhängig von der Oberfläche unterschiedliche Bestandteile des Speichels in unterschiedlichem Maße adsorbieren [38]. Daran bindende Bakterien könnten dann ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten auf Titan und Gold zeigen, was die kleineren Unterschiede in Frequenz und Dissipation zwischen den Versuchen mit Pellikel auf Gold- und Titanoberflächen erklären würde.

Ohne Pellicel spielt die Oberfläche eine große Rolle. Während unter dem Mikroskop bei allen Versuchen dicht mit Bakterien besiedelte Sensoren zu erkennen waren, zeigen die QCM-D-Signale eine unterschiedliche Art der Anhaftung.

Die Anhaftung von Bakterien wird beeinflusst durch das Material, auf das die Bakterien adhären, aber auch durch Oberflächeneigenschaften dieser Materialien. Da sich die Signale auf Titan in den zwei Versuchen (diese Arbeit und Xu et al.) so stark voneinander unterscheiden, stellt sich die Frage, was den Unterschied verursacht haben könnte. Die Sensoren des Q-Sense und des qCell T Geräts haben eine vergleichbare Rauheit, deshalb können die Unterschiede nicht damit erklärt werden. Die Hydrophilie unterschied sich in den Versuchen. Schon 1988 zeigte Absalom, dass sowohl die Hydrophilie von Bakterien als auch die Hydrophilie von Oberflächen eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Adhäsion spielen [161]. Schweikl et al. fanden eine schwache Korrelation der Hydrophilie der Oberflächen von zahnärztlichen Werkstoffen zur Anzahl von adhärenen *S. gordonii* [162]. Mit zuvor aufgetragenem Speichel gab es keine solche Korrelation [162]. Möglicherweise hat die Hydrophilie einer Oberfläche Auswirkungen auf das Adhäsionsverhalten von *S. gordonii*.

Es wurde schon festgestellt, dass *S. mutans* aus der Gruppe der Viridans-Streptokokken abhängig vom Umgebungsmedium seine Hydrophilie ändern kann [163], möglicherweise kann *S. gordonii* dies auch.

Auch die Reinigung des Quarzes könnte für die unterschiedlichen Signale verantwortlich sein, entweder aufgrund nicht detektierbarer Verschmutzungen auf der Oberfläche oder der Änderung der Hydrophilie durch bestimmte Reinigungsprotokolle.

In Abbildung 40 sind schematisch zwei Bakterien in verschiedenen Abständen zum Sensor dargestellt, zusammen mit den Eindringtiefen der akustischen Wellen der verschiedenen QCM-D-Systeme.

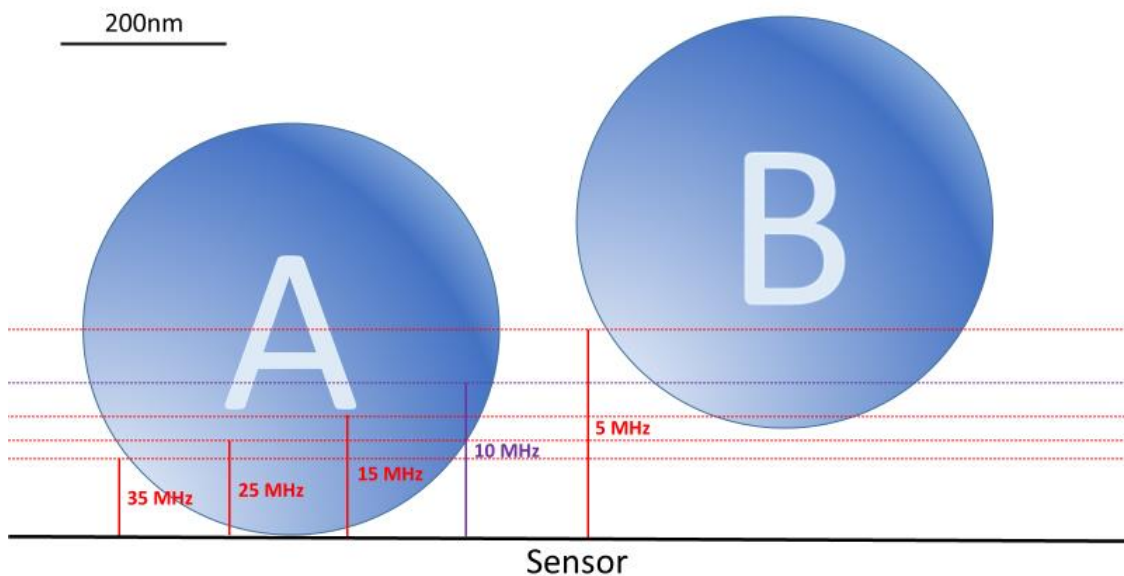


Abbildung 40: Schematische Darstellung von zwei Bakterien (A und B) in verschiedenen Abständen vom QCM-D-Sensor. Größen näherungsweise maßstabsgetreu mit: Durchmesser Bakterien 500 nm, und den akustischen evaneszenten Wellen, die 252 nm (5 MHz), 180 nm (10 MHz), 146 nm (15 MHz), 113 nm (25 MHz) und 95 nm (35 MHz) in das Medium ragen. 10 MHz werden vom qCell T-Gerät und vom OpenQCM Q⁻¹ aufgezeichnet, die restlichen Frequenzen vom Q-Sense Gerät.

Bakterium A würde, sofern verhältnismäßig fest auf dem Sensor gebunden, negative Frequenzänderungen in allen Frequenzen hervorrufen. Bakterium B würde, sofern eine punktförmige Bindung zum Sensor besteht, positive Frequenzänderungen unter bestimmten Bedingungen hervorrufen. Dafür muss die Eigenresonanzfrequenz f_E des Bakteriums unter der Resonanzfrequenz des Quarzsensors liegen [152]. Die Eigenresonanzfrequenz wird mit der folgenden Gleichung, abgeleitet von der Schwingungsgleichung eines Federpendels, beschrieben [152, 153, 156, 164].

$$f_E = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}$$

Hierbei ist

f_E = Eigenresonanzfrequenz in Hz

k = Steifheit des Kontaktes zum Sensor in N/m

m = Masse des Bakteriums in kg

Wenn die Steifheit des Kontakts groß genug ist, um eine Eigenresonanzfrequenz hervorzurufen, die über der des Quarzsensors liegt, entstehen negative Frequenzänderungen, ist die Steifheit des Kontakts geringer, werden positive Frequenzänderungen aufgezeichnet.

Diese Gleichung gilt allerdings nur für punktförmige Kontakte. Sollten die Bakterien über eine größere Fläche mit dem Quarz fest verbunden sein, würden sie immer negative Frequenzänderungen nach der konventionellen Massenbeladungstheorie hervorrufen.

Bakterium B würde also bei geringer Steifheit des Kontakts zum Sensor bei 5 MHz, 10 MHz und 15 MHz positive Frequenzänderungen hervorrufen. Bei 25 MHz und 35 MHz würden keine Veränderungen zu erkennen sein. Da davon auszugehen ist, dass nicht alle Bakterien genau den gleichen Abstand zum Sensor haben, werden die Frequenzsignale sich gegenseitig überlagern und eine durchschnittliche Gesamtfrequenzänderung hervorrufen.

Wegen der großen negativen Frequenzänderungen in beiden Versuchen mit dem qCell T-System ohne Pellikel ist es wahrscheinlich, dass die Bakterien relativ fest auf dem Quarz liegen (vergleiche Bakterium A, Abbildung 40) und keine punktförmigen Kontakte vorhanden sind. Beim Q-Sense Gerät und beim Open QCM⁻¹ sind ohne Pellikel allerdings, aufgrund der positiven Frequenzänderungen, punktförmige Kontakte vorhanden (vergleiche Bakterium B, Abbildung 40). Es kann vermutet werden, dass verschiedene Oberflächeneigenschaften der unterschiedlichen Sensoren dafür verantwortlich sind. Ob es wirklich die Hydrophilie der Oberfläche ist, die diesen großen Unterschied bei der Anhaftung verursacht, wäre für die weitere Forschung sehr interessant. Es könnte an beiden

Sensoren eine Plasmareinigung durchgeführt werden, um ihnen eine vergleichbare Hydrophilie zu geben, was mit einer Kontaktwinkelmessung bestätigt werden könnte. Wären die Ergebnisse dann ähnlich, wäre ersichtlich, dass die Hydrophilie das Adhäsionsverhalten der Bakterien stark beeinflusst.

Mit Pellicel können die Bakterien nicht mehr direkt auf dem Quarz liegen und es entstehen punktförmige Kontakte, durch Fimbrien, Adhäsine oder EPS. Es liegt immer ein Abstand zum Sensor vor und die Werte werden bei allen drei QCM-D-Systemen vergleichbar.

Sowohl auf Titan als auch auf Gold kann *S. gordonii* also positive oder negative Frequenzänderungen zeigen, während auf Pellicel nach jetzigem Kenntnisstand auf Titan und Gold bei 5 MHz und 10 MHz immer positive Frequenzänderungen auftreten.

4.10 QCM-D zur Detektion von Biofilmen

QCM-D ist allein nicht geeignet, um die genaue Beschaffenheit von Biofilmen festzustellen. Es können nur Hinweise entnommen werden, die ohne zusätzliche Untersuchungen mit anderen Methoden schwer zu entschlüsseln sind. Dies trifft insbesondere auf die im Versuch erhaltenen Ergebnisse mit positiven Frequenzänderungen zu. Man kann nicht sicher sagen, ob die positiven Frequenzänderungen nach dem coupled-resonator-model erfolgen, oder ob manche Bakterien negative Frequenzänderungen hervorrufen, die von den positiven überlagert werden. Die Dissipation kann allerdings einen Hinweis darauf liefern, wie wasserhaltig der Biofilm ist, und in diesem Fall auch, wie viele Bakterien darin enthalten sind.

Da der Biofilm mit Pellicel weniger Wasser enthält, ist es wahrscheinlich, dass die Bakterien fester an das Pellicel binden oder Substanzen sekretieren. Daraus resultieren eine stärkere Bindung und ein festerer Biofilm. Um genauere Informationen zu erhalten, sollte der auf den Sensoren gebildete Biofilm, und auch die Oberfläche der Bakterien genauer untersucht werden.

Es gibt mittlerweile auch QCM-D-Systeme, die bis zur 13ten Obertonfrequenz

messen, bei Versuchen mit Bakterien zeigten diese aber meist sehr ähnliche Werte für alle Obertonfrequenzen oberhalb der Siebten [154]. Da Bakterien verhältnismäßig groß sind, und die höheren Obertonfrequenzen immer weniger tief in die Probe reichen, sind diese Systeme mit höheren Obertonfrequenzen zumindest für die Detektion von Bakterien nicht notwendig.

Dass sich die gebildeten Biofilme auf reinem Titan mit zwei verschiedenen QCM-D-Systemen stark unterschieden, legt nahe, dass Eigenschaften wie die freie Oberflächenenergie und die Hydrophilie eine große Rolle bei der bakteriellen Adhäsion spielen. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, kann bei Versuchen mit Bakterien empfohlen werden, wenn möglich, die Sensoren mit einer vorher aufgetragenen Schicht (Pellicel, Nährmedium, etc.) zu versehen, damit die Ergebnisse mit anderen Systemen verglichen werden können.

QCM-D ist ein sehr gutes Messgerät zur Detektion von Proteinen und auch der Bindung von Proteinen an andere Proteine und Oberflächen.

Für die Messung mit Bakterien ist es jedoch bis jetzt nur bedingt geeignet, da es noch nicht möglich ist, die Ergebnisse eindeutig zu interpretieren. Allerdings lässt das Auftreten von positiven Frequenzänderungen auf ein verändertes Bindungsverhalten schließen, was mit anderen Methoden nicht festzustellen gewesen wäre.

QCM-D hat großes Potenzial für lebende Zellen, da es deren Signale live und ohne Markierung auswerten kann. Unter einem Mikroskop sehen die Biofilme, die mit und ohne Pellicel gebildet werden, identisch aus, trotzdem können mit QCM-D Unterschiede detektiert werden, die sonst unentdeckt bleiben würden. Ein weiterer Vorteil von QCM-D ist, dass sehr viele Versuchsaufbauten möglich sind. So können die Quarze nicht nur mit den verschiedensten Materialien beschichtet werden, es können auch verschiedene Flüssigkeiten durch die Messzelle geschickt werden und die Strömungsgeschwindigkeit kann verändert werden. Gerade die Strömungsgeschwindigkeit könnte für zukünftige Versuche interessant sein. Man könnte sowohl mit als auch ohne Pellicel gebildete Biofilme in speziellen Durchflusszellen höheren Scherkräften aussetzen und herausfinden, ob der Biofilm mit Pellicel wirklich stabiler und schwieriger abzulösen ist.

Abbildung 41 zeigt die Vorgänge am Sensor, und nur einige der Faktoren, die Einfluss auf die gemessenen Frequenzen haben könnten. In Anbetracht der Größenverhältnisse sollten bei Messungen mit Bakterien alle Frequenzen betrachtet werden, da die Obertonfrequenzen möglicherweise die Bakterien gar nicht detektieren können.

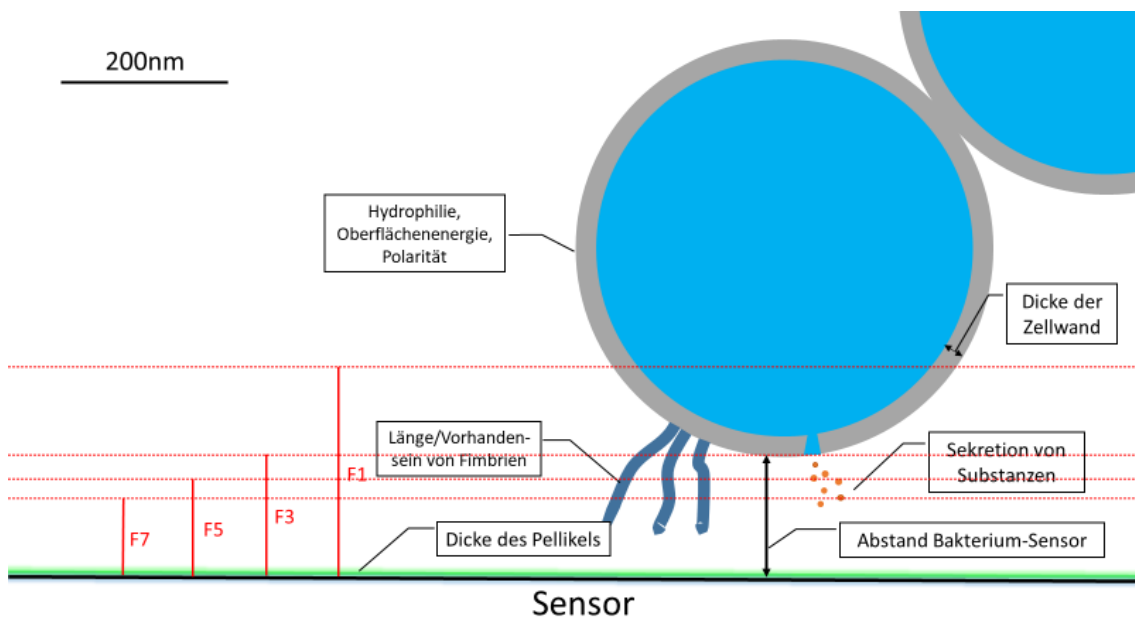


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Vorgänge am QCM-D Sensor bei Bakterienadhäsion mit möglichen Einflussfaktoren. Größen näherungsweise maßstabsgetreu mit: Bakterien 500 nm Durchmesser, Zellwand 20-80 nm Dicke, Fimbrien 150 nm Länge, und den akustischen evaneszenten Wellen, die 252 nm (F1), 146 nm (F3), 113 nm (F5) und 95 nm (F7) in das Medium ragen.

5 Zusammenfassung

Biofilme sind ein wichtiger Gegenstand der dentalen Forschung. Da die meisten Erkrankungen der Zähne durch sie ausgelöst werden, und diese Biofilme auch systemische Auswirkungen haben können, wie zum Beispiel das erschwerte Einstellen eines Diabetes bei gleichzeitig vorhandener Parodontitis, oder eine durch aus der Mundhöhle eingeschleppte Bakterien ausgelöste Endokarditis, werden sie das auch noch lange sein.

Eine Schwingquarzmikrowaage mit Dissipationsmessung misst kleinste Masseveränderungen im Nanogrammbereich in Echtzeit, indem die Frequenzänderungen eines angeregten Quarzsensors ausgewertet werden. In einer Durchflusszelle montiert kann QCM-D auch den Wassergehalt eines aufgetragenen Films anzeigen.

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass die Adhäsion von *S. gordonii* auf reinem Titan und auf einem Pellikel, gemessen mit QCM-D, positive Frequenzänderungen entgegen der konventionellen Massenbeladungstheorie hervorruft.

In den Versuchen konnte weiterhin gezeigt werden, dass *S. gordonii*, ein Frühbesiedler mit vielen Adhäsinen für das dentale proteinreiche Pellikel, unterschiedlich adhärert, wenn auf einer Titanoberfläche ein Pellikel vorhanden ist. Der Biofilm, der sich auf Pellikel bildet, besteht aus weniger Bakterien, hat weniger Wasseranteile und ist höchstwahrscheinlich steifer gebunden als auf reinen Titanoberflächen.

Um diese Ergebnisse abzusichern, und auch um die aufgestellten Hypothesen betreffend des Biofilmaufbaus und der unterschiedlichen Sensoren zu bestätigen oder zu widerlegen, werden die positiven Frequenzänderungen noch genauer eingeordnet werden müssen. Diese traten zwar schon in verschiedenen Versuchen auch mit Bakterien auf, aber eine eindeutige Erklärung steht noch aus. Die Agglutination von *S. gordonii* in verdünntem modifiziertem Speichel ist ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit und zeigt die antibakteriellen Eigenschaften des Speichels, der Bakterien verklumpt, damit sie verschluckt und aus der Mundhöhle

eliminiert werden können.

Es ist für die Zahnmedizin von großem Interesse, die Mechanismen der Adhärenz von Frühbesiedlern in Biofilmen zu verstehen. Um den ersten Schritt genauer zu untersuchen, ist das Bakterium *S. gordonii* sehr gut geeignet, da es nach aktuellem Kenntnisstand die meisten bekannten Adhäsine für Bestandteile des Speichels hat und so ein grobes Modell der ersten Besiedelungsphase der von Speichel bedeckten Titanoberfläche darstellt.

Außerdem ist es durch Bindungsstellen für das bekanntermaßen bei Parodontitis und Periimplantitis involvierte *P. gingivalis* ein Risikofaktor für eine spätere pathologische Ausdifferenzierung des Biofilms.

Ein großer Vorteil des QCM-D-Geräts ist, dass sowohl die Steifigkeit der Bindung als auch das im Biofilm eingeschlossene Wasser in Echtzeit dargestellt werden. Diese Vorteile mit optischen Verfahren zu kombinieren könnte in Zukunft tiefere Einblicke in die genauen Adhäsionsmechanismen von Biofilmen gewähren.

Weitere Forschung und entsprechende Assayentwicklung ist nötig, um Bakteriensignale mit QCM-D sicher interpretieren zu können, aber sobald dies gelingt, werden zweifelsfrei viele neue Erkenntnisse zu den Vorgängen an Grenzflächen folgen.

6 Literaturverzeichnis

1. Sender, R., S. Fuchs, R. Milo, *Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans*. Cell, 2016. **164**(3): p. 337-40.
2. Mahajan, A., B. Singh, D. Kashyap, A. Kumar, P. Mahajan, *Interspecies communication and periodontal disease*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 765434.
3. Aas, J.A., B.J. Paster, L.N. Stokes, I. Olsen, F.E. Dewhirst, *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(11): p. 5721-32.
4. Yoshida, A., H.K. Kuramitsu, *Multiple Streptococcus mutans Genes Are Involved in Biofilm Formation*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(12): p. 6283-91.
5. Kolenbrander, P.E., R.J. Palmer, Jr., S. Periasamy, N.S. Jakubovics, *Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(7): p. 471-80.
6. Flemming, H.C., J. Wingender, *The biofilm matrix*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(9): p. 623-33.
7. Adamietz, I.K., R., A. Laubert, R. Schilcher, *Maligne Rezidive im Kopf-Hals-Bereich*. 2003: Schattauer.
8. Schmidt, R.F., F. Lang, M. Heckmann, *Physiologie des Menschen; mit Pathophysiologie*. 2011: Springer Verlag.
9. Bardow, A., D. Moe, B. Nyvad, B. Nauntofte, *The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂*. Arch Oral Biol, 2000. **45**(1): p. 1-12.
10. Buchalla, W. *Speichel - Zusammensetzung und Funktion eines oft unterschätzten Helfers*. http://www.zm-online.de/hefte/Zusammensetzung-und-Funktion-eines-oft-unterschaetzten-Helfers_115620.html#1, 2013. [Zugriff 14.03.14]
11. Bardow, A., J. Lykkeaa, V. Qvist, K. Ekstrand, S. Twetman, N.E. Fiehn, *Saliva composition in three selected groups with normal stimulated salivary flow rates, but yet major differences in caries experience and dental erosion*. Acta Odontol Scand, 2014. **72**(6): p. 466-73.
12. Offner, G.D., R.F. Troxler, *Heterogeneity of high-molecular-weight human salivary mucins*. Adv Dent Res, 2000. **14**: p. 69-75.
13. Li, J., E.J. Helmerhorst, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim, *Identification of in vivo pellicle constituents by analysis of serum immune responses*. J Dent Res, 2004. **83**(1): p. 60-4.
14. Klimek, J. *Skript speichel und mundgesundheit* http://www.Zahnerhaltung.Ukw.De/fileadmin/uk/zahnerhaltung/dokument_e/student_skript.Pdf. [Zugriff 02.03.2013]
15. Aguirre, A., M.J. Levine, R.E. Cohen, L.A. Tabak, *Immunochemical quantitation of alpha-amylase and secretory IgA in parotid saliva from people of various ages*. Arch Oral Biol, 1987. **32**(4): p. 297-301.
16. Scannapieco, F.A., G. Torres, M.J. Levine, *Salivary alpha-amylase: role in*

- dental plaque and caries formation*. Crit Rev Oral Biol Med, 1993. **4**(3-4): p. 301-7.
17. Nikitkova, A.E., E.M. Haase, F.A. Scannapieco, *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**(2): p. 416-23.
 18. Scannapieco, F.A., L. Solomon, R.O. Wadenya, *Emergence in human dental plaque and host distribution of amylase-binding streptococci*. J Dent Res, 1994. **73**(10): p. 1627-35.
 19. Al-Hashimi, I., M.J. Levine, *Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle*. Arch Oral Biol, 1989. **34**(4): p. 289-95.
 20. Kilian, M., B. Nyvad, *Ability to bind salivary alpha-amylase discriminates certain viridans group streptococcal species*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(11): p. 2576-7.
 21. Douglas, C.W., *Characterization of the alpha-amylase receptor of Streptococcus gordonii NCTC 7868*. J Dent Res, 1990. **69**(11): p. 1746-52.
 22. Tennant, S.M., E.L. Hartland, T. Phumoonna, D. Lyras, J.I. Rood, R.M. Robins-Browne, I.R. van Driel, *Influence of gastric acid on susceptibility to infection with ingested bacterial pathogens*. Infect Immun, 2008. **76**(2): p. 639-45.
 23. Amerongen, A.V., J.G. Bolscher, E.C. Veerman, *Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology?* Caries Research, 2004. **38**(3): p. 247-253.
 24. Van Snick, J.L., P.L. Masson, J.F. Heremans, *The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation*. J Exp Med, 1974. **140**(4): p. 1068-84.
 25. Arnold, R.R., J.E. Russell, W.J. Champion, M. Brewer, J.J. Gauthier, *Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation*. Infect Immun, 1982. **35**(3): p. 792-9.
 26. Arnold, R.R., M.F. Cole, J.R. McGhee, *A bactericidal effect for human lactoferrin*. Science, 1977. **197**(4300): p. 263-5.
 27. Hellwege, K.-D., *Die Praxis der zahnmedizinischen Prophylaxe: ein Leitfaden für die Individualprophylaxe, Gruppenprophylaxe und initiale Parodontaltherapie*. 2003: Georg Thieme Verlag.
 28. Prakobphol, A., F. Xu, V.M. Hoang, T. Larsson, J. Bergstrom, I. Johansson, . . . S.J. Fisher, *Salivary agglutinin, which binds Streptococcus mutans and Helicobacter pylori, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 39860-6.
 29. Moreno, E.C., K. Varughese, D.I. Hay, *Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate*. Calcif Tissue Int, 1979. **28**(1): p. 7-16.
 30. Teughels, W., N. Van Assche, I. Sliepen, M. Quirynen, *Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development*. Clin Oral Implants Res, 2006. **17 Suppl 2**: p. 68-81.
 31. Evaldson, G., A. Heimdahl, L. Kager, C.E. Nord, *The normal human anaerobic microflora*. Scand J Infect Dis Suppl, 1982. **35**: p. 9-15.
 32. Hannig, M., A. Joiner, *The structure, function and properties of the acquired pellicle*. Monogr Oral Sci, 2006. **19**: p. 29-64.

33. Sipahi, C., N. Anil, E. Bayramli, *The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials*. J Dent, 2001. **29**(3): p. 197-204.
34. Baier, R.E., P.O. Glantz, *Characterization of oral in vivo films formed on different types of solid surfaces*. Acta Odontol Scand, 1978. **36**(5): p. 289-301.
35. Amaechi, B.T., S.M. Higham, W.M. Edgar, A. Milosevic, *Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion*. J Dent Res, 1999. **78**(12): p. 1821-8.
36. Siqueira, W.L., W. Custodio, E.E. McDonald, *New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle*. J Dent Res, 2012. **91**(12): p. 1110-8.
37. Busscher, H.J., R. Bos, H.C. van der Mei, *Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion*. FEMS Microbiol Lett, 1995. **128**(3): p. 229-34.
38. Edgerton, M., S.E. Lo, F.A. Scannapieco, *Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of streptococci*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1996. **11**(4): p. 443-9.
39. Scannapieco, F.A., G.I. Torres, M.J. Levine, *Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite*. J Dent Res, 1995. **74**(7): p. 1360-6.
40. Trappetti, C., A. Kadioglu, M. Carter, J. Hayre, F. Iannelli, G. Pozzi, . . . M.R. Oggioni, *Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host*. J Infect Dis, 2009. **199**(10): p. 1497-505.
41. Kohlenbrander, P.E., *<Adhere Today, Here Tomorrow: Oral Bacterial Adherence>*. Journal of Bacteriology, 1993: p. 3247-3252.
42. Gibbons, R.J., *Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases*. J Dent Res, 1989. **68**(5): p. 750-60.
43. Hoiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu, *Antibiotic resistance of bacterial biofilms*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **35**(4): p. 322-32.
44. Costerton, J.W., B. Ellis, K. Lam, F. Johnson, A.E. Khoury, *Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(12): p. 2803-9.
45. Kuramitsu, H.K., X. He, R. Lux, M.H. Anderson, W. Shi, *Interspecies interactions within oral microbial communities*. Microbiol Mol Biol Rev, 2007. **71**(4): p. 653-70.
46. Folwaczny, M.H., R., *Biofilm - Problem oder Perspektive?* Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, 2003. **12**(58): p. 648-659.
47. Biradar, B., P. Devi, *Quorum sensing in plaque biofilms: challenges and future prospects*. J Contemp Dent Pract, 2011. **12**(6): p. 479-85.
48. Costerton, J.W., P.S. Stewart, E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
49. Ritzert, B., *Zahnimplantate zunehmend erste Wahl: 1,3 Millionen werden in Deutschland pro Jahr eingepflanzt*, DGI-Pressestelle, Editor. 2018: idw.
50. Quirynen, M., R. Vogels, W. Peeters, D. van Steenberghe, I. Naert, A. Haffajee, *Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-*

- implant pockets*. Clin Oral Implants Res, 2006. **17**(1): p. 25-37.
51. Meffert, R.M., *Periodontitis vs. peri-implantitis: the same disease? The same treatment?* Crit Rev Oral Biol Med, 1996. **7**(3): p. 278-91.
 52. Subramani, K., R.E. Jung, A. Molenberg, C.H. Hammerle, *Biofilm on dental implants: a review of the literature*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2009. **24**(4): p. 616-26.
 53. Hahnel, S., A. Wieser, R. Lang, M. Rosentritt, *Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials*. Clin Oral Implants Res, 2014.
 54. Al-Ahmad, A., M. Wiedmann-Al-Ahmad, A. Fackler, M. Follo, E. Hellwig, M. Bachle, . . . R. Kohal, *In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials*. Arch Oral Biol, 2013. **58**(9): p. 1139-47.
 55. Matarasso, S., G. Quaremba, F. Coraggio, E. Vaia, C. Cafiero, N.P. Lang, *Maintenance of implants: an in vitro study of titanium implant surface modifications subsequent to the application of different prophylaxis procedures*. Clin Oral Implants Res, 1996. **7**(1): p. 64-72.
 56. Klinge, B., J. Meyle, G. Working, *Peri-implant tissue destruction. The Third EAO Consensus Conference 2012*. Clin Oral Implants Res, 2012. **23 Suppl 6**: p. 108-10.
 57. Haussen, T., J. Karbach, B. Al-Nawas, *Lösungsansätze für die Prävention und Behandlung periimplantärer Entzündungen*. Quintessenz Implantologie, 2015. **66**(6): p. 665-672.
 58. Mettraux, G.R., A. Sculean, W.B. Burgin, G.E. Salvi, *Two-year clinical outcomes following non-surgical mechanical therapy of peri-implantitis with adjunctive diode laser application*. Clin Oral Implants Res, 2016. **27**(7): p. 845-9.
 59. Mettraux, G.R., *Möglichkeiten zum Einsatz dentaler Laser in der Parodontitis- und Periimplantitistherapie*. Quintessenz Zahnmedizin, 2020. **71**(2): p. 138-149.
 60. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, M.A. Cugini, C. Smith, R.L. Kent, Jr., *Microbial complexes in subgingival plaque*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(2): p. 134-44.
 61. Cook, G.S., J.W. Costerton, R.J. Lamont, *Biofilm formation by Porphyromonas gingivalis and Streptococcus gordonii*. J Periodontal Res, 1998. **33**(6): p. 323-7.
 62. Heitz-Mayfield, L.J., N.P. Lang, *Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis*. Periodontol 2000, 2010. **53**: p. 167-81.
 63. Kawamura, Y., X.G. Hou, F. Sultana, H. Miura, T. Ezaki, *Determination of 16S rRNA sequences of Streptococcus mitis and Streptococcus gordonii and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol, 1995. **45**(2): p. 406-8.
 64. Doern, C.D., C.A. Burnham, *It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(11): p. 3829-35.
 65. Nobbs, A.H., R.J. Lamont, H.F. Jenkinson, *Streptococcus adherence and colonization*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(3): p. 407-50, Table of Contents.

66. Ahn, S.J., H.S. Kho, K.K. Kim, D.S. Nahm, *Adhesion of oral streptococci to experimental bracket pellicles from glandular saliva*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2003. **124**(2): p. 198-205.
67. Facklam, R., *What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(4): p. 613-30.
68. Kilian, M., L. Mikkelsen, and J. Henrichsen, *Taxonomic Study of Viridans Streptococci: Description of Streptococcus gordonii sp. nov. and Emended Descriptions of Streptococcus sanguis (White and Niven 1946), Streptococcus oralis (Bridge and Sneath 1982), and Streptococcus mitis (Andrewes and Horder 1906)* Int. J. Syst. Bacteriol. , 1989. **39**(4): p. 471-484.
69. Zheng, W., M.F. Tan, L.A. Old, I.C. Paterson, N.S. Jakubovics, S.W. Choo, *Distinct Biological Potential of Streptococcus gordonii and Streptococcus sanguinis Revealed by Comparative Genome Analysis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2949.
70. Ruoff, K.L., *Dealing with Viridans Streptococci in the Clinical Laboratory: The Continuing Challenge*. Clinical Microbiology Newsletter, 1993. **15**(10): p. 73-76.
71. Human Microbiome Project, C., *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 207-14.
72. van der Meer, J.T., W. van Vianen, E. Hu, W.B. van Leeuwen, H.A. Valkenburg, J. Thompson, M.F. Michel, *Distribution, antibiotic susceptibility and tolerance of bacterial isolates in culture-positive cases of endocarditis in The Netherlands*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1991. **10**(9): p. 728-34.
73. Vriesema, A.J., J. Dankert, S.A. Zaat, *A shift from oral to blood pH is a stimulus for adaptive gene expression of Streptococcus gordonii CH1 and induces protection against oxidative stress and enhanced bacterial growth by expression of msrA*. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1061-8.
74. Sommer, P., C. Gleyzal, S. Guerret, J. Etienne, J.A. Grimaud, *Induction of a putative laminin-binding protein of Streptococcus gordonii in human infective endocarditis*. Infect Immun, 1992. **60**(2): p. 360-5.
75. Schneewind, O., D.M. Missiakas, *Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1592): p. 1123-39.
76. Lima, B.P., K. Kho, B.L. Nairn, J.R. Davies, G. Svensater, R. Chen, . . . M.C. Herzberg, *Streptococcus gordonii Type I Lipoteichoic Acid Contributes to Surface Protein Biogenesis*. mSphere, 2019. **4**(6).
77. Moses, P.J., D.A. Power, A.M. Jesionowski, H.F. Jenkinson, E.A. Pantera, Jr., M.M. Vickerman, *Streptococcus gordonii collagen-binding domain protein CbdA may enhance bacterial survival in instrumented root canals ex vivo*. J Endod, 2013. **39**(1): p. 39-43.
78. Scannapieco, F.A., K. Bhandary, N. Ramasubbu, M.J. Levine, *Structural relationship between the enzymatic and streptococcal binding sites of human salivary alpha-amylase*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173**(3): p. 1109-15.
79. Rogers, J.D., E.M. Haase, A.E. Brown, C.W. Douglas, J.P. Gwynn, F.A. Scannapieco, *Identification and analysis of a gene (abpA) encoding a major amylase-binding protein in Streptococcus gordonii*. Microbiology,

1998. **144 (Pt 5)**: p. 1223-33.
80. Nikitkova, A.E., E.M. Haase, F.A. Scannapieco, *Effect of starch and amylase on the expression of amylase-binding protein A in Streptococcus gordonii*. Mol Oral Microbiol, 2012. **27**(4): p. 284-94.
 81. Marsh, P., M.V. Martin, *Orale Mikrobiologie*. 2003: Thieme, Stuttgart. 260.
 82. Ligtenberg, A.J., E. Walgreen-Weterings, E.C. Veerman, J.J. de Soet, J. de Graaff, A.V. Amerongen, *Influence of saliva on aggregation and adherence of Streptococcus gordonii HG 222*. Infect Immun, 1992. **60**(9): p. 3878-84.
 83. McNab, R., H. Forbes, P.S. Handley, D.M. Loach, G.W. Tannock, H.F. Jenkinson, *Cell wall-anchored CshA polypeptide (259 kilodaltons) in Streptococcus gordonii forms surface fibrils that confer hydrophobic and adhesive properties*. J Bacteriol, 1999. **181**(10): p. 3087-95.
 84. Krajewski, S., J. Rheinlaender, P. Ries, D. Canjuga, C. Mack, L. Scheideler, . . . F. Rupp, *Bacterial interactions with proteins and cells relevant to the development of life-threatening endocarditis studied by use of a quartz-crystal microbalance*. Anal Bioanal Chem, 2014. **406**(14): p. 3395-406.
 85. Nobbs, A.H., H.F. Jenkinson, N.S. Jakubovics, *Stick to your gums: mechanisms of oral microbial adherence*. J Dent Res, 2011. **90**(11): p. 1271-8.
 86. Rose, M.C., J.A. Voynow, *Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 245-78.
 87. Takamatsu, D., B.A. Bensing, H. Cheng, G.A. Jarvis, I.R. Siboo, J.A. Lopez, . . . P.M. Sullam, *Binding of the Streptococcus gordonii surface glycoproteins GspB and Hsa to specific carbohydrate structures on platelet membrane glycoprotein Ibalpha*. Mol Microbiol, 2005. **58**(2): p. 380-92.
 88. Bensing, B.A., J.A. Lopez, P.M. Sullam, *The Streptococcus gordonii surface proteins GspB and Hsa mediate binding to sialylated carbohydrate epitopes on the platelet membrane glycoprotein Ibalpha*. Infect Immun, 2004. **72**(11): p. 6528-37.
 89. Urano-Tashiro, Y., A. Yajima, Y. Takahashi, K. Konishi, *Streptococcus gordonii promotes rapid differentiation of monocytes into dendritic cells through interaction with the sialic acid-binding adhesin*. Odontology, 2012. **100**(2): p. 144-8.
 90. Takamatsu, D., B.A. Bensing, A. Prakobphol, S.J. Fisher, P.M. Sullam, *Binding of the streptococcal surface glycoproteins GspB and Hsa to human salivary proteins*. Infect Immun, 2006. **74**(3): p. 1933-40.
 91. Bensing, B.A., P.M. Sullam, *An accessory sec locus of Streptococcus gordonii is required for export of the surface protein GspB and for normal levels of binding to human platelets*. Mol Microbiol, 2002. **44**(4): p. 1081-94.
 92. Christie, J., R. McNab, H.F. Jenkinson, *Expression of fibronectin-binding protein FbpA modulates adhesion in Streptococcus gordonii*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 6): p. 1615-25.
 93. Giomarelli, B., L. Visai, K. Hijazi, S. Rindi, M. Ponzio, F. Iannelli, . . . G. Pozzi, *Binding of Streptococcus gordonii to extracellular matrix proteins*.

- FEMS Microbiol Lett, 2006. **265**(2): p. 172-7.
94. Nobbs, A.H., B.H. Shearer, M. Drobni, M.A. Jepson, H.F. Jenkinson, *Adherence and internalization of Streptococcus gordonii by epithelial cells involves beta1 integrin recognition by SspA and SspB (antigen I/II family) polypeptides*. Cell Microbiol, 2007. **9**(1): p. 65-83.
 95. Holmes, A.R., C. Gilbert, J.M. Wells, H.F. Jenkinson, *Binding properties of Streptococcus gordonii SspA and SspB (antigen I/II family) polypeptides expressed on the cell surface of Lactococcus lactis MG1363*. Infect Immun, 1998. **66**(10): p. 4633-9.
 96. Kerrigan, S.W., N.S. Jakubovics, C. Keane, P. Maguire, K. Wynne, H.F. Jenkinson, D. Cox, *Role of Streptococcus gordonii surface proteins SspA/SspB and Hsa in platelet function*. Infect Immun, 2007. **75**(12): p. 5740-7.
 97. Park, Y., M.R. Simionato, K. Sekiya, Y. Murakami, D. James, W. Chen, . . . R.J. Lamont, *Short fimbriae of Porphyromonas gingivalis and their role in coadhesion with Streptococcus gordonii*. Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 3983-9.
 98. Roky, M., J.O. Trent, D.R. Demuth, *Identification of functional domains of the minor fimbrial antigen involved in the interaction of Porphyromonas gingivalis with oral streptococci*. Mol Oral Microbiol, 2020.
 99. Kayser, F.B., K.; Eckert, J.; Zinkernagel, R., *Medizinische Mikrobiologie*. 2005: Georg Thieme Verlag.
 100. Lin, X., J. Wu, H. Xie, *Porphyromonas gingivalis minor fimbriae are required for cell-cell interactions*. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 6011-5.
 101. Patil, P.C., J. Tan, D.R. Demuth, F.A. Luzzio, *'Second-generation' 1,2,3-triazole-based inhibitors of Porphyromonas gingivalis adherence to oral streptococci and biofilm formation*. Medchemcomm, 2019. **10**(2): p. 268-279.
 102. Gibbons, R.J., D.I. Hay, D.H. Schlesinger, *Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adherence of Streptococcus gordonii to apatitic surfaces*. Infect Immun, 1991. **59**(9): p. 2948-54.
 103. Amerongen, A.V., J.G. Bolscher, E.C. Veerman, *Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity*. Glycobiology, 1995. **5**(8): p. 733-40.
 104. Murray, P.A., A. Prakobphol, T. Lee, C.I. Hoover, S.J. Fisher, *Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins*. Infect Immun, 1992. **60**(1): p. 31-8.
 105. Ruhl, S., A.L. Sandberg, J.O. Cisar, *Salivary receptors for the proline-rich protein-binding and lectin-like adhesins of oral actinomyces and streptococci*. J Dent Res, 2004. **83**(6): p. 505-10.
 106. Kesimer, M., N. Kilic, R. Mehrotra, D.J. Thornton, J.K. Sheehan, *Identification of salivary mucin MUC7 binding proteins from Streptococcus gordonii*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 163.
 107. Banas, J.A., M.M. Vickerman, *Glucan-binding proteins of the oral streptococci*. Crit Rev Oral Biol Med, 2003. **14**(2): p. 89-99.
 108. Zeng, L., N.C. Martino, R.A. Burne, *Two gene clusters coordinate galactose and lactose metabolism in Streptococcus gordonii*. Appl Environ

- Microbiol, 2012. **78**(16): p. 5597-605.
109. Tanzer, J.M., A. Thompson, K. Sharma, M.M. Vickerman, E.M. Haase, F.A. Scannapieco, *Streptococcus mutans* out-competes *Streptococcus gordonii* in vivo. J Dent Res, 2012. **91**(5): p. 513-9.
 110. Wang, B.Y., H.K. Kuramitsu, *Interactions between oral bacteria: inhibition of Streptococcus mutans bacteriocin production by Streptococcus gordonii*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(1): p. 354-62.
 111. Nascimento, C.D., M.S. Pita, F.H. Fernandes, V. Pedrazzi, R.F. de Albuquerque Junior, R.F. Ribeiro, *Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces*. Clin Oral Implants Res, 2013.
 112. Xu, Y., J. Kreth, *Role of LytF and AtIS in eDNA release by Streptococcus gordonii*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e62339.
 113. Kaplan, C.W., R. Lux, S.K. Haake, W. Shi, *The Fusobacterium nucleatum outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm*. Mol Microbiol, 2009. **71**(1): p. 35-47.
 114. Dutton, L.C., K.H. Paszkiewicz, R.J. Silverman, P.R. Splatt, S. Shaw, A.H. Nobbs, . . . M. Ramsdale, *Transcriptional landscape of trans-kingdom communication between Candida albicans and Streptococcus gordonii*. Mol Oral Microbiol, 2015.
 115. Sauerbrey, G., *Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung*. Zeitschrift für Physik, 1959. **155**(2): p. 206-222.
 116. Sauter, R. *Grundlagen - Die Theorie hinter QCM-D*. Spectrum 2018 [cited 150 5]; Available from: <https://lot-qd.de/en/news/product-application-news-spectrum/spectrum-150/grundlagen-die-theorie-hinter-qcm-d/?newsid=974>.
 117. Baltus, R.E., K.S. Carmon, L.A. Luck, *Quartz crystal microbalance (QCM) with immobilized protein receptors: comparison of response to ligand binding for direct protein immobilization and protein attachment via disulfide linker*. Langmuir, 2007. **23**(7): p. 3880-5.
 118. T. Nomura, O.H., *Determination of micromolar concentrations of cyanide in solution with a piezoelectric detector*. Analytica Chimica Acta, 1980. **115**(15): p. 323-326.
 119. Rodahl, M., F. Hook, B. Kasemo, *QCM Operation in Liquids: An Explanation of Measured Variations in Frequency and Q Factor with Liquid Conductivity*. Anal Chem, 1996. **68**(13): p. 2219-27.
 120. Rickert, J., A. Brecht, W. Gopel, *QCM Operation in Liquids: Constant Sensitivity during Formation of Extended Protein Multilayers by Affinity*. Anal Chem, 1997. **69**(7): p. 1441-8.
 121. Dixon, M.C., *Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: enabling real-time characterization of biological materials and their interactions*. J Biomol Tech, 2008. **19**(3): p. 151-8.
 122. Rodahl, M., F. Hook, C. Fredriksson, C.A. Keller, A. Krozer, P. Brzezinski, . . . B. Kasemo, *Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion*. Faraday Discuss, 1997(107): p. 229-46.
 123. Voinova, M.V., M. Jonson, B. Kasemo, *Missing mass effect in biosensor's*

- QCM applications. Biosens Bioelectron, 2002. **17**(10): p. 835-41.
124. Voinova, M.V., M. Rodahl, M. Jonson, B. Kasemo, *Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach*. Physica Scripta, 1999. **59**(5).
 125. Reviakine, I., D. Johannsmann, R.P. Richter, *Hearing what you cannot see and visualizing what you hear: interpreting quartz crystal microbalance data from solvated interfaces*. Anal Chem, 2011. **83**(23): p. 8838-48.
 126. Kanazawa, K.K., J.G. Gordon, *The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid*. Analytica Chimica Acta, 1985. **175**: p. 99-105.
 127. Olsson, A.L., I.R. Quevedo, D. He, M. Basnet, N. Tufenkji, *Using the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring to evaluate the size of nanoparticles deposited on surfaces*. ACS Nano, 2013. **7**(9): p. 7833-43.
 128. Guleryuz, H., I. Kaus, C.C. Buron, C. Filiatre, N. Hedin, L. Bergstrom, M.A. Einarsrud, *Deposition of silica nanoparticles onto alumina measured by optical reflectometry and quartz crystal microbalance with dissipation techniques*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. **443**(20): p. 384-390.
 129. Fung, Y.S., Y.Y. Wong, *Self-assembled monolayers as the coating in a quartz piezoelectric crystal immunosensor to detect Salmonella in aqueous solution*. Anal Chem, 2001. **73**(21): p. 5302-9.
 130. Ding, Y., H. Lu, G. Shi, J. Liu, G. Shen, R. Yu, *Cell-based immobilization strategy for sensitive piezoelectric immunoassay of total prostate specific antigen*. Biosens Bioelectron, 2008. **24**(2): p. 228-32.
 131. Pohanka, M., *Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications*. Materials (Basel), 2018. **11**(3).
 132. Rondelli, V., E.D. Cola, A. Koutsioubas, J. Alongi, P. Ferruti, E. Ranucci, P. Brocca, *Mucin Thin Layers: A Model for Mucus-Covered Tissues*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(15).
 133. Suthar, J., E.S. Parsons, B.W. Hoogenboom, G.R. Williams, S. Guldin, *Acoustic immunosensing of exosomes using a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring*. Anal Chem, 2020.
 134. Speight, R.E., M.A. Cooper, *A survey of the 2010 quartz crystal microbalance literature*. J Mol Recognit, 2012. **25**(9): p. 451-73.
 135. Zhou, B., Y. Hao, S. Chen, P. Yang, *A quartz crystal microbalance modified with antibody-coated silver nanoparticles acting as mass signal amplifiers for real-time monitoring of three latent tuberculosis infection biomarkers*. Mikrochim Acta, 2019. **186**(4): p. 212.
 136. BD, V., L. EK, W. WL, W. CC, *Effect of Film Thickness on the Validity of the Sauerbrey Equation for Hydrated Polyelectrolyte Films*. J. Phys. Chem. B., 2004. **108**(34): p. 12685-12690.
 137. Olsson, A.L., H.C. van der Mei, H.J. Busscher, P.K. Sharma, *Influence of cell surface appendages on the bacterium-substratum interface measured real-time using QCM-D*. Langmuir, 2009. **25**(3): p. 1627-32.
 138. Fatisson, J., F. Azari, N. Tufenkji, *Real-time QCM-D monitoring of cellular responses to different cytomorphic agents*. Biosens Bioelectron, 2011. **26**(7): p. 3207-12.
 139. Galli Marxer, C., M. Collaud Coen, T. Greber, U.F. Greber, L. Schlapbach,

- Cell spreading on quartz crystal microbalance elicits positive frequency shifts indicative of viscosity changes.* Anal Bioanal Chem, 2003. **377**(3): p. 578-86.
140. Hussain, M., F. Rupp, H.P. Wendel, F.K. Gehring, *Bioapplications of acoustic crystals, a review.* Trends in Analytical Chemistry, 2018. **102**: p. 194-209.
 141. Sader, R., J. Holländer, J. Lorenz, S. Ghanaati *Keramikimplantate - Eine Übersicht.* 2015.
 142. Xu, Z., L. Coriand, R. Loeffler, J. Geis-Gerstorfer, Y. Zhou, L. Scheideler, . . . F. Rupp, *Saliva-coated titanium biosensor detects specific bacterial adhesion and bactericide caused mass loading upon cell death.* Biosens Bioelectron, 2019. **129**: p. 198-207.
 143. Vassilakos, N., T. Arnebrant, P.O. Glantz, *Adsorption of whole saliva onto hydrophilic and hydrophobic solid surfaces: influence of concentration, ionic strength and pH.* Scand J Dent Res, 1992. **100**(6): p. 346-53.
 144. Lee, B.C., G.Y. Jung, D.J. Kim, J.S. Han, *Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro.* J Adv Prosthodont, 2011. **3**(2): p. 81-4.
 145. Kim, H.Y., I.S. Yeo, J.B. Lee, S.H. Kim, D.J. Kim, J.S. Han, *Initial in vitro bacterial adhesion on dental restorative materials.* Int J Artif Organs, 2012. **35**(10): p. 773-79.
 146. Rupp, F., M. Haupt, M. Eichler, C. Doering, H. Klostermann, L. Scheideler, . . . C. von Ohle, *Formation and photocatalytic decomposition of a pellicle on anatase surfaces.* J Dent Res, 2012. **91**(1): p. 104-9.
 147. Wu, Y., J. Geis-Gerstorfer, L. Scheideler, F. Rupp, *Photocatalytic antibacterial effects on TiO₂-anatase upon UV-A and UV-A/VIS threshold irradiation.* Biofouling, 2016. **32**(5): p. 583-95.
 148. Döring, C.F., *In Vitro Untersuchung des photokatalytischen Abbaus von Protein- und Speichelfilmen an Anatas zur Biofilmbilösung an Implantaten,* in *Poliklinik für zahnärztliche Prothetik und Propädeutik.* 2011, Tübingen.
 149. Lapidot, T., K.L. Sedransk Campbell, J.Y. Heng, *Model for Interpreting Surface Crystallization Using Quartz Crystal Microbalance: Theory and Experiments.* Anal Chem, 2016. **88**(9): p. 4886-93.
 150. Molino, P.J., O.M. Hodson, J.F. Quinn, R. Wetherbee, *The quartz crystal microbalance: a new tool for the investigation of the bioadhesion of diatoms to surfaces of differing surface energies.* Langmuir, 2008. **24**(13): p. 6730-7.
 151. Tymchenko, N., E. Nileback, M.V. Voinova, J. Gold, B. Kasemo, S. Svedhem, *Reversible changes in cell morphology due to cytoskeletal rearrangements measured in real-time by QCM-D.* Biointerphases, 2012. **7**(1-4): p. 43.
 152. Olsson, A.L., M.R. Mitzel, N. Tufenkji, *QCM-D for non-destructive real-time assessment of Pseudomonas aeruginosa biofilm attachment to the substratum during biofilm growth.* Colloids Surf B Biointerfaces, 2015. **136**: p. 928-34.
 153. Dybwad, G.L., *A sensitive new method for the determination of adhesive bonding between a particle and a substrate.* J. Appl. Phys., 1985. **58**(7): p. 2789-2790.
 154. Le, D.T., S. Zanna, I. Frateur, P. Marcus, P. Loubiere, E. Dague, M. Mercier-

- Bonin, *Real-time investigation of the muco-adhesive properties of Lactococcus lactis using a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring*. Biofouling, 2012. **28**(5): p. 479-90.
155. Marcus, I.M., M. Herzberg, S.L. Walker, V. Freger, *Pseudomonas aeruginosa attachment on QCM-D sensors: the role of cell and surface hydrophobicities*. Langmuir, 2012. **28**(15): p. 6396-402.
156. Pomorska, A., D. Shchukin, R. Hammond, M.A. Cooper, G. Grundmeier, D. Johannsmann, *Positive frequency shifts observed upon adsorbing micron-sized solid objects to a quartz crystal microbalance from the liquid phase*. Anal Chem, 2010. **82**(6): p. 2237-42.
157. Schultheiß, J., *Evaluation der OpenQCM Q-1 Quarzkristall-Mikrowaage als Instrument zur Charakterisierung biologischer Wechselwirkungen an Implantatoberflächen*, in *Sektion Medizinische Werkstoffkunde und Technologie des Universitätsklinikums Tübingen*. 2019, Eberhard-Karls Universität Tübingen.
158. Rogers, J.D., R.J. Palmer, Jr., P.E. Kolenbrander, F.A. Scannapieco, *Role of Streptococcus gordonii amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation*. Infect Immun, 2001. **69**(11): p. 7046-56.
159. Scannapieco, F.A., E.J. Bergey, M.S. Reddy, M.J. Levine, *Characterization of salivary alpha-amylase binding to Streptococcus sanguis*. Infect Immun, 1989. **57**(9): p. 2853-63.
160. Westas, E., L.M. Svanborg, P. Wallin, B. Bauer, M.B. Ericson, A. Wennerberg, . . . M. Andersson, *Using QCM-D to study the adhesion of human gingival fibroblasts on implant surfaces*. J Biomed Mater Res A, 2015.
161. Absolom, D.R., *The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion*. Can J Microbiol, 1988. **34**(3): p. 287-98.
162. Schweikl, H., K.A. Hiller, U. Carl, R. Schweiger, A. Eidt, S. Ruhl, . . . G. Schmalz, *Salivary protein adsorption and Streptococcus gordonii adhesion to dental material surfaces*. Dent Mater, 2013. **29**(10): p. 1080-9.
163. Koga, T., H. Asakawa, N. Okahashi, I. Takahashi, *Effect of subculturing on expression of a cell-surface protein antigen by Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol, 1989. **135**(12): p. 3199-207.
164. Olsson, A.L., H.C. van der Mei, H.J. Busscher, P.K. Sharma, *Acoustic sensing of the bacterium-substratum interface using QCM-D and the influence of extracellular polymeric substances*. J Colloid Interface Sci, 2011. **357**(1): p. 135-8.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Sektion Medizinische Werkstoffkunde und Technologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Frank Rupp durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Frank Rupp

Die Versuche am QCM-D und die Benetzungsanalytik wurden nach Einarbeitung durch Labormitarbeiterin Ingrid Stephan von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

8 Danksagung

Ich möchte an erster Stelle Prof. Dr. Jürgen Geis-Gerstorfer und Prof. Dr. Frank Rupp für die Möglichkeit, die Dissertation in der Sektion Medizinische Werkstoffkunde und Technologie durchzuführen, danken.

Besonders möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. F. Rupp darüber hinaus für die wissenschaftliche Unterstützung und hilfreichen Diskussionen während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation danken.

Außerdem gilt mein Dank Frau Ingrid Stephan, die mich im Labor eingearbeitet und unterstützt hat, und den anderen Mitarbeitern der Sektion MWT, die mir bei kleineren und größeren Problemen immer gern geholfen haben. Vielen Dank für die angenehme Zusammenarbeit.

Ich möchte an dieser Stelle auch meiner Familie und meinen Freunden für die Motivierung und Unterstützung während der gesamten Zeit danken.