

**Physikochemische Charakterisierung
bioorganischer Filme und deren Einfluss auf die
initiale bakterielle Adhäsion**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Fakultät für Physik
Universität Bielefeld

Ines Herzenstiel
Landau / Pfalz

März 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Dario Anselmetti

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Huser

Diese Arbeit entstand in Kooperation
zwischen der
Fakultät Physik der Universität Bielefeld unter der Leitung von
Prof. Dr. Dario Anselmetti
und der
BASF SE in Ludwigshafen unter der Leitung von
Dr. Markus Rückel

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Mit einer Auslegung in der Universitätsbibliothek bin ich einverstanden. Zu Archivierungszwecken wurde diese Arbeit auf alterungsbeständigem Papier gemäß DIN ISO 9706 gedruckt.

März 2011, Ines Herzenstiel

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND MOTIVATION.....	1
2	MATERIAL UND METHODEN.....	7
2.1	Materialien.....	7
2.2	Methoden	9
2.2.1	Röntgen-Photoelektronenspektroskopie.....	9
2.2.1.1	Prinzip.....	9
2.2.1.2	Präparation und Messung.....	11
2.2.2	Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie	13
2.2.2.1	Prinzip.....	13
2.2.2.2	Präparation und Messung.....	14
2.2.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	17
2.2.3.1	Prinzip.....	17
2.2.3.2	Präparation und Messung.....	19
2.2.4	Quarzkristall-Mikrowaage	22
2.2.4.1	Prinzip.....	22
2.2.4.2	Präparation und Messung.....	23
2.2.5	Rasterkraftmikroskopie.....	24
2.2.5.1	Prinzip.....	24
2.2.5.2	Immunogoldmarkierung - Präparation und Messung.....	28
2.2.5.3	Kraftspektroskopie - Präparation und Messung.....	30
2.2.6	Präparation und Messung der statischen bakteriellen Adhäsion	32
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	33
3.1	Charakterisierung des Urinfilms	33
3.1.1	Elementanalyse des Urinfilms auf verschiedenen Materialoberflächen.....	33
3.1.2	Analyse zweikomponentiger Proteinfilme und des Urinfilms mittels TOF-SIMS und der Hauptkomponentenanalyse.....	39
3.1.3	Proteindetektion mittels AFM-unterstützter Immunogoldmarkierung	43
3.1.4	Quantitative Proteindetektion auf Oberflächen durch die Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und der Quarzkristall-Mikrowaage	49

3.2 Einfluss verschiedener Materialien und bioorganischer Schichten auf die bakterielle Adhäsion	57
3.2.1 Kolloidale kraftspektroskopische Untersuchung zwischen Bakterien und unbehandelten oder beschichteten Materialoberflächen.....	57
3.2.2 Statische Untersuchung der bakteriellen Adhäsion und Vergleich mit kraftspektroskopischen Untersuchungen	65
3.2.3 Kraftspektroskopische Untersuchungen zwischen Bakterien und antiadhäsiven Materialoberflächen.....	68
4 ZUSAMMENFASSUNG	72
5 LITERATUR	75

1 Einleitung und Motivation

In natürlicher Umgebung leben schätzungsweise 99 % aller Bakterien in Biofilmen oder einzeln auf Oberflächen [1]. Costerton et al. beschreiben einen Biofilm als eine strukturierte Gemeinschaft von Bakterien, welche umschlossen von einer selbstproduzierten, polymeren Matrix auf inerten oder lebenden Oberflächen anhaften [2]. Biofilme kommen in sehr vielen verschiedenen Bereichen wie beispielsweise auf medizinischen Hilfsmitteln, in Rohrleitungssystemen für Trink- und Brauchwasser, in Klimaanlage und Wärmetauschern, in Meerwasserentsalzungsanlagen und auf Schiffsrümpfen vor [3-7]. Doch auch an alltäglichen Gegenständen wie Türklinken, Treppengeländer, Fahrstuhlknöpfen oder Telefonhörer können Bakterien anhaften. Die Adhäsion von pathogenen Bakterien an Gewebe oder Materialien ist außerdem ein kritischer Schritt in der Verursachung von nahezu allen Infektionen wie z.B. Atemwegserkrankungen, Harnwegsinfektionen und Entzündungen des Verdauungstrakts [8;9].

Zum besseren Verständnis wurde ein Modell der Biofilmbildung mit fünf charakteristischen Schritten entwickelt (Abbildung 1). Die erste Station stellt eine nackte biotische oder abiotische Oberfläche dar [5]. Diese wird im zweiten Schritt im Kontakt mit einem flüssigen Medium mit Molekülen aus diesem belegt, es bildet sich ein Conditioningfilm [10;11]. Es erfolgt anschließend die initiale Adhäsion von Bakterien, welche aufgrund Brownscher Bewegung, Sedimentation oder Eigenbewegung, einzeln oder in bereits vorher gebildeten Agglomeraten, die Oberfläche erreichen.

Durch die Belegung der Oberfläche mit einem Conditioningfilm erfolgt die Bindung an eine Oberfläche in den meisten Fällen zwischen Bakterien und Conditioningfilm und nicht direkt zwischen Bakterien und Substrat [12;13]. Die nächsten Stationen der Biofilmentstehung geschehen nicht strikt in zeitlicher Abfolge, sondern sind mehr als parallele Ereignisse zu betrachten. Zum einen beginnt die Kommunikation der Bakterien miteinander (Quorum Sensing). Zum anderen wird die bisher reversible Anhaftung der

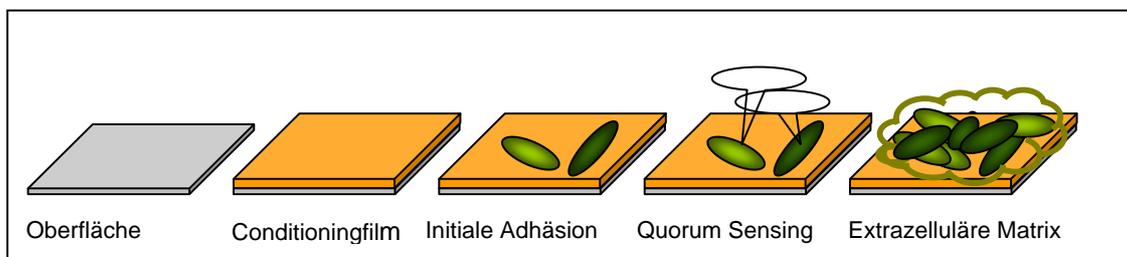


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biofilmbildung auf biotischen oder abiotischen Oberflächen

Bakterien auf der Oberfläche durch die Bildung und Sekretion einer extrazellulären, polymeren Matrix verstärkt. Der Biofilm ist ab diesem Stadium weitestgehend vor äußeren physikalischen und chemischen Einflüssen geschützt [1;14-16].

An der Entstehung eines Biofilms sind meist verschiedene Spezies von Bakterien beteiligt, so dass beispielsweise Stoffwechselprodukte der einen Spezies das Wachstum einer anderen unterstützen können [1;2;17]. Die Bakterien übernehmen in der Gemeinschaft eines Biofilms verschiedene Aufgaben und können sich in ihrer Genexpression stark unterscheiden [18]. Die von den Bakterien gebildete, extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus bakteriellen Exopolysacchariden, die große Mengen an Wasser binden können [19]. Die Zusammensetzung dieser Matrix ist außerdem abhängig von der Position im Biofilm, vom Alter des Biofilms, von der Wachstumsgeschwindigkeit, der Nährstoffzufuhr und vom matrixbildenden Bakterienstamm [19;20]. Diese umgebende Schleimschicht stellt zudem ein effektives Filtersystem dar, mittels dessen essentielle Mineralien und Nährstoffe aus der Umgebung in den Biofilm eingebracht und über interne Kanäle verteilt werden [1;21;22]. Hat sich ein Biofilm einmal entwickelt und ist von extrazellulärer Matrix umgeben, ist er nahezu resistent gegenüber Bakteriophagen, Bioziden und Antibiotika und kann der Immunantwort eines Wirtsorganismus standhalten [1;16].

Um an Oberflächen anbinden zu können, bilden Bakterien auf ihrer Membran spezielle Proteine. Diese sogenannten Adhesine wechselwirken mit Molekülen des Conditioningfilms, der die Substratoberfläche bedeckt. Adhesine besitzen eine sehr hohe Selektivität für ihre Zielmoleküle und erkennen molekulare Strukturen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip [5;9]. Da die Bindung zwischen Bakterien und einer Oberfläche sehr häufig durch einen Conditioningfilm vermittelt wird, hängt die Stabilität eines initialen Biofilms von der Struktur, dem Aufbau und der chemischen Zusammensetzung dieses Conditioningfilms ab [5;9]. Daher kommt dieser Molekülschicht eine besondere Bedeutung zu.

Das Chemieunternehmen BASF SE startete 2008 eine Forschungsinitiative an der Harvard University in Boston. Das Ziel dieser Initiative ist es, durch das grundlegende Verständnis der Biofilmbildung, neue Strategien für deren Kontrolle entwickeln zu können. In verschiedenen Arbeitsgruppen werden dazu Biofilme mit unterschiedlichsten Forschungsansätzen in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien charakterisiert und untersucht. Die vorliegende Arbeit stellte ein Teilprojekt dieser Forschungsinitiative dar und beschäftigt sich mit der Belegung der Materialoberflächen mit Biomolekülen aus dem umgebenden, flüssigen Medium. Die Ausbildung solcher bioorganischer Filme,

auch „conditioning film“ genannt, erfolgt vor der initialen Adhäsion von Bakterien und stellt damit einen der ersten Schritte in der Biofilmbildung dar (Abbildung 1).

Die ersten Untersuchungen von Oberflächen, die mit Molekülen aus einem umgebenden, flüssigen Medium belegt waren, fanden im Bereich der Meerwasserforschung statt. Dabei identifiziert Baier 1972 Proteine als Hauptbestandteil eines marinen Conditioningfilms auf Germanium [23]. Der Begriff „conditioning film“ wird erstmals 1975 von Loeb und Neihof benutzt, Compère bezeichnet dieses Ereignis als „molecular fouling“ [24;25]. Mittels XPS und TOF-SIMS wurde die Veränderung der chemischen Zusammensetzung eines Conditioningfilms mit der Zeit gezeigt. So lagern sich Proteine als eine der ersten Molekülgruppen an, nach 24 Stunden sind zusätzlich Polysaccharide nachweisbar. Dies führt zu der Vermutung, dass Proteine zum Teil gegen Polysaccharide ausgetauscht werden [24]. Der Austausch von Molekülen auf der Oberfläche ist vor allem für Proteine weithin bekannt. Kleinere Proteine adsorbieren schneller an eine Oberfläche, werden dann aber zu einem späteren Zeitpunkt teilweise durch größere Proteine mit stärkerer Affinität ersetzt. Das Phänomen ist als Vromaneffekt beschrieben [26-30].

Im medizinischen Bereich kommen Conditioningfilme überall dort vor, wo Körperflüssigkeiten mit Materialoberflächen in Kontakt kommen. Beispiele für körperfremde Materialien sind Implantate aller Art (Zahnimplantate, Gelenkimplantate), die dauerhaft im Körper verbleiben, sowie vorübergehend im Körper verbleibende Gegenstände wie Urin-, Venen- und Herzkatheter, Wunddrainagen oder auch Kontaktlinsen [31;32]. So kann ein Conditioningfilm die Anhaftung von Gewebezellen auf dauerhaft im Körper verbleibenden Implantaten begünstigen und so die Integration des Materials fördern. Andererseits kann sich ein Conditioningfilm negativ auf den Heilungsprozess nach einer Implantation auswirken, indem er die Anhaftung von Bakterien vermittelt [31;33]. Insbesondere die Conditioningfilme aus Blut, Tränen, Urin und Speichel beeinflussen die Adhäsion von Bakterien an Biomaterialien [32]. Busscher et al. beobachteten in einer Flusszelle beispielsweise ein erleichtertes Ablösen eines Biofilms, wenn die Glasoberfläche vorher mit Speichelproteinen behandelt wurde [12]. Der von Speichelproteinen gebildete Conditioningfilm auf den Zähnen wird „acquired pellicle“ genannt. Durch den Einsatz von SDS-PAGE und immunosensitiven Methoden können Albumin, Glyko- und Phosphorproteine, sowie Lipide, Enzyme und verschiedenen Antikörper als dessen Bestandteile identifiziert werden [4;34].

Auch der urininduzierte Conditioningfilm, im weiteren Urinfilm genannt, spielt im medizinischen Bereich eine wichtige Rolle. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich detailliert mit

der Charakterisierung solcher Urinfilme auf unterschiedlichen polymeren und nichtpolymeren Materialoberflächen. Diese Charakterisierung ist von besonderer Bedeutung, da solche Urinfilme an der Biofilmbildung auf Harnwegskathetern beteiligt sein können und diese Biofilme wiederum häufig zu katheterassoziierten Harnwegsinfektionen führen. In Deutschland ziehen sich jährlich ca. 155 000 Patienten im Krankenhaus eine Harnwegsinfektion zu, wovon ~ 80 % katheterbedingt sind [35-37]. Die Benutzung von Urinkathetern wurde schon in Schriften der Antike beschrieben. 1930 entwickelte Dr. Frederick Foley das Design des modernen Urinkatheters, welches sich seit nunmehr 70 Jahren bewährt hat [28]. Als Kathetermaterialien werden heute Latex, Silikon, PVC, Teflon- und Hydrogel- und Silberbeschichtungen verwendet [33]. All diese Oberflächen werden mit molekularen Bestandteilen des durchfließenden Urins belegt. Urin stellt ein dabei verändertes Ultrafiltrat des Blutplasmas dar, jedoch mit einem 1000fach niedrigeren Proteingehalt. Insgesamt befinden sich im Urin ungefähr 1500 verschiedene Proteine und 200 Peptide [38]. Die Hälfte des Gesamtproteins im Urin von 50 - 100 mg pro Tag stammt nicht aus dem Blutplasma, sondern wird von Endothelzellen im Harntrakt freigesetzt [39;40]. Das wichtigste Protein dieser Klasse ist das Tamm-Horsfall-Glykoprotein (THP), welches 1950 von Tamm und Horsfall erstmals isoliert wurde [41]. Es ist mit einem Anteil von ~ 50% der Hauptbestandteil des Urinproteoms und kann durch Interaktion mit manchen uropathogenen Bakterien, vor allem *E. coli* Spezies, deren Adhäsion an Material- oder Gewebeoberflächen verhindern [38;42].

Als Besonderheit werden im Bereich der Biofilmbildung auf Urinkathetern verkrustete und unverkrustete Biofilme unterschieden [28;30]. Für die Entwicklung von katheterverursachten Harnwegsinfektionen spielen sowohl die Biofilmbildung als auch die Entstehung von Verkrustungen eine wichtige Rolle. Diese beiden Phänomene sind nicht exakt voneinander zu trennen, beeinflussen sich gegenseitig und können zur vollständigen Blockade des Katheters führen [28;43;44]. Die Verkrustungen bestehen vorwiegend aus Ammoniummagnesiumphosphat (Struvit), Kalziumphosphat und Kalziumoxalat. Es können aber auch Proteine wie humanes Serumalbumin (HSA) beteiligt sein [30;45-47]. Der bakterielle Einfluss auf die Entstehung dieser Verkrustungen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während Stickler et al. 1993 keine Verkrustungen von Kathetern mit Urease-negativen Bakterien feststellt, detektieren Keane et al. auch Verkrustungen ohne bakteriellen Einfluss [48;49]. Eine Erklärung für diese Ergebnisse sind zwei unterschiedliche Mechanismen, die zur Entstehung von solchen Verkrustungen führen. Im ersten Fall spaltet die von Urease-positive Bakterien gebildete Urease den Harnstoff

über eine Zwischenstufe in Ammoniak und Kohlendioxid und der pH-Wert steigt an. Dadurch fallen Calcium- und Magnesiumphosphate aus, aggregieren und es kommt relativ schnell zu Verkrustungen [43;44]. Im zweiten Fall entstehen Verkrustungen ohne den Einfluss von bakterieller Urease langsam durch die Aggregation von Calciumphosphat und Calciumoxalat [28].

Die Zusammensetzung des Urinfilms hat daher sowohl einen Einfluss auf die Entstehung von Verkrustungen als auch auf die bakterielle Adhäsion [28;30]. So ist das aus dem Harntrakt stammende Protein THP in der Lage die Aggregation von Calciumoxalatkristallen zu vermeiden [50]. Zudem wurde THP wiederholt auf nichtverkrusteten Kathetern detektiert [30;51]. Hohe Harnstoffkonzentrationen können die Anhaftung von uropathogenen Bakterien verringern, während verschiedene Kreatininkonzentrationen auf der Oberfläche keinen signifikanten Einfluss haben [52]. Bakterien der Gattungen *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* und *Staphylococcus epidermidis* haften zudem stärker auf einem Latexkatheter in PBS im Vergleich zu Urin oder einer Harnstofflösung. Die absolute Zahl der anhaftenden Bakterien unterscheidet sich jedoch für die verschiedene Bakterien stark [53;54]. Die bakterielle Adhäsion kann zudem durch verschiedene Beschichtungen wie Silber, Heparin oder auch α -Tropomyosin verringert werden, die Stabilität der Beschichtungen ist aber nicht immer gegeben [55-58]. Der Zusammenhang zwischen Verkrustungen und bakterieller Adhäsion wird zudem durch eine elektronenmikroskopische Aufnahme deutlich, auf der die Anhaftung von Bakterien direkt auf kristallinen Formen zu sehen ist [59].

Das Wissen um den Einfluss von urineigenen Molekülen auf die Anhaftung von Krankheitserregern soll helfen, Strategien zur Vermeidung von katheterassoziierten Harnwegsinfektionen entwickeln zu können [52;60]. Als chemische Elementanalyse findet XPS häufig Anwendung [52;54;61;62]. Als abbildende Methode werden elektronenmikroskopische Aufnahmen herangezogen, seltener auch AFM-Aufnahmen [61;63-66]. Die Proteinzusammensetzung wird in einzelnen Fällen mittels SDS-PAGE, Tandem MS-MS und Westernblot untersucht [30;51]. Die zuletzt genannten Methoden beinhalten jedoch immer einen kritischen Ablöseprozess des Conditioningfilms. Es ist weiter zu beachten, dass aufgrund der Komplexität des Urinproteoms und anderen, eventuell störenden Urinhaltsstoffen ein hoher Anspruch an die verwendeten Analysemethoden gestellt wird [38].

Die bisherigen Untersuchungen betrachten den Urinfilm bedingt durch die Wahl einer Methode nicht in seiner Gesamtbeschaffenheit, sondern fokussieren sich auf Teilaspek-

te wie einzelne Stoffgruppen oder chemische Elemente. Durch die Heterogenität des Urins sowie die geringen Konzentrationen einzelner Komponenten stoßen viele Methoden zudem an ihre Grenzen.

Die Motivation und das Ziel dieser Forschungsarbeit ist die Weiterentwicklung und Etablierung verschiedener biophysikalischer Methoden, um physikochemische Eigenschaften eines Urinfilms detailliert zu charakterisieren. Darauf aufbauend sollen später neue Konzepte und Strategien entwickelt werden, um die Biofilmbildung auf Harnwegskathetern zu verhindern. Aufgrund der erwarteten Komplexität eines Urinfilms ist diese Charakterisierung nur durch die Kombination und Synergie verschiedener Methoden möglich. Die Bestimmung der Schichtdicke und die chemische Zusammensetzung des Urinfilms auf verschiedenen Materialoberflächen geben Hinweise auf den möglichen Einfluss eines Substrats auf diese Kenngrößen. Da insbesondere Glykoproteine als Bindungsstellen von Bakterien genutzt werden, um an eine Oberfläche anzuhaften, ist die Entwicklung einer Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen direkt auf der Oberfläche besonders wichtig. Um die Adhäsionskräfte zwischen Materialien und Bakterien quantitativ beurteilen zu können, wird die Kraftspektroskopie eingesetzt. Dabei ist es wichtig ein Testsystem zu etablieren, mit dem für verschiedene Materialoberflächen die Adhäsionskraft gegenüber Bakterien bestimmt werden kann. Durch die Beschichtung der Materialoberflächen mit Urin kann zudem dessen Einfluss auf die Wechselwirkungen quantitativ studiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 1: Chemikalien und Proteine

Substanz	Firma
Albumin from human serum	Sigma Aldrich
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich
Complete EDTA-free Proteaseinhibitor	Roche
Concanavalin A Alexa Fluor 488 conjugated	Sigma Aldrich
D-Glukose	Fluka
Fibronectin from human plasma	Sigma Aldrich
Filmtracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit	Invitrogen
H Star Protein B (Hydrophobin)	BASF SE
IgG from human serum	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumphosphat monobasisch	Fluka
Lysozyme human recombinant	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Fluka
Natriumphosphat dibasisch	Fluka
Nutrient Broth	Difco
Tamm-Horsfall-Glycoprotein out of human urine	Biopur
Transferrin human	Sigma Aldrich

Tabelle 2: Primäre und sekundäre Antikörper

Antigen / Reaktivität	Konjugation	Wirt	Spezifität	Firma
Human Serum Albumin	-	Rabbit	Whole Molecule	Sigma Aldrich
Tamm-Horsfall-Glycoprotein	-	Mouse	Monoclonal	Antikörper Online
Mouse IgG	Alexa Fluor 488	Goat	Heavy & Light Chains	Invitrogen
Rabbit IgG	Alexa Fluor 488	Goat	Heavy & Light Chains	Invitrogen
Mouse IgG	Gold 10 nm	Goat	Whole Molecule	Sigma Aldrich
Rabbit IgG	Gold 10 nm	Goat	Whole Molecule	Sigma Aldrich

Tabelle 3: Bakterienstämme

Stamm	Herkunft
<i>Pseudomonas putida</i>	Stammsammlung BASF SE

Tabelle 4: Nährmedium für *Pseudomonas putida*

Substanz	Konzentration [g/L]
Nutrient Broth	8,00
Glukose	3,00

Tabelle 5: PBS-Puffer

Substanz	Konzentration [g/L]	Molarität [mM]
NaCl	8,00	137,00
KCl	0,20	2,75
Na ₂ HPO ₄	1,44	10,00
KH ₂ PO ₄	0,24	1,75

Tabelle 6: Materialien

Name	Material	Probenbezeichnung	Firma
Deckglas	Borosilikatglas	Glas	Menzel
TPU	Thermoplastisches Polyurethan	TPU	Elastogran
PVP	Polyvinylpyrrolidon	PVP	BASF SE
SAN	Styrol-Acetonitril	SAN	BASF SE
PEO	Polyethylenoxid MW: 200 000	PEO	Sigma Aldrich
Polystyrol	Polystyrol MW: 250 000	Polystyrol	Acros Organics
PVC-Folie	Polyvinylchlorid MW: 65 000	PVC	BASF/CIBA
Stahl	Stahlblech V2A 2-3 mm	Stahl	Kloeckner

Urin

Die verwendeten Urinproben wurden in der medizinischen Ambulanz der BASF SE von Männern und Frauen abgegeben, anonym gesammelt und vereint. Dadurch entstand eine heterogene Sammelurinprobe, die anschließend mit einem Protease-Inhibitor (Roche Complete) gemäß der Packungsbeilage versetzt wurde. Dieser Inhibitor verhindert den enzymatischen Abbau der im Urin vorhandenen Proteine. Die Lagerung des so vorbereiteten Urins erfolgte bei -20 °C in 15 mL bzw. 50 mL-Gefäßen. Vor der Verwendung wurde die benötigte Menge auf Raumtemperatur (20 °C) temperiert.

Zur Herstellung eines Urins, der ausschließlich Proteine mit einem Molekulargewicht < 30 kDa enthält, wurde eine VivaSpin 20 Filtereinheit (VWR) benutzt.

2.2 Methoden

Die detaillierte Untersuchung von Urinfilmen stellt aufgrund der Heterogenität und der geringen Konzentration einzelner Komponenten hohe Ansprüche an die Methoden. Vor dem Einsatz der Materialproben für eine Präparation wurden diese mit Ethanol im Ultraschallbad für 15 Minuten gereinigt, mit Reinstwasser abgespült und unter einem Stickstoffstrom getrocknet (Tabelle 6). Durch diese standardisierte Probenvorbereitung wurden störende Einflüsse durch Verunreinigungen der Materialien minimiert.

2.2.1 Röntgen-Photoelektronenspektroskopie

Die Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (*X-ray photoelectron spectroscopy*), kurz XPS, beruht auf dem Phänomen des Photoeffekts der 1905 von Einstein beschrieben wurde. Der Photoeffekt beschreibt die vollständige Übertragung der Energie eines Röntgenphotons an ein Elektron innerhalb eines Atoms der zu untersuchenden Probe, was zum Herauslösen dieses Elektrons führt. Als analytische Methode wurde XPS erstmals 1951 von Steinhardt und Serfass eingesetzt. Zwischen 1950 und 1960 entwickelte Kai Siegbahn die Ausrüstung und Theorie des XPS wie wir es grundsätzlich heute kennen und nutzen [67].

2.2.1.1 Prinzip

Eine Probenoberfläche wird mit einem Röntgenstrahl belichtet, dessen Photonen durch den vollständigen Übertrag ihrer Energie Elektronen (Photoelektronen) aus ihrer atomaren Umgebung herauslösen. Photoelektronen von Atomen, die in den oberen 10 nm der Oberfläche sitzen werden aus dem Material herausgelöst und im Hochvakuum nach ihrer Energie getrennt und gezählt. Die Energie der Photoelektronen ist spezifisch hinsichtlich ihrer atomaren und bindungsspezifischen Umgebung. Die Anzahl der Photoelektronen ist dabei abhängig von der Konzentration des jeweiligen Atoms in der Probe. So können mit Hilfe von XPS alle chemischen Elemente außer Wasserstoff und Helium ab Konzentrationen von $> 0,1$ Atomprozent identifiziert werden.

Beim Auftreffen eines Photons auf ein Atom kann es zu drei möglichen Ereignissen kommen. Im ersten Fall geht das Photon durch das Atom hindurch und es kommt zu keiner Wechselwirkung mit dessen Elektronen. Im zweiten Fall verliert das Photon durch den Zusammenstoß mit einem Elektron nur einen Teil seiner Energie, was auch als Compton-Effekt bezeichnet wird. Im dritten Fall kommt es zu dem tatsächlichen Photo-

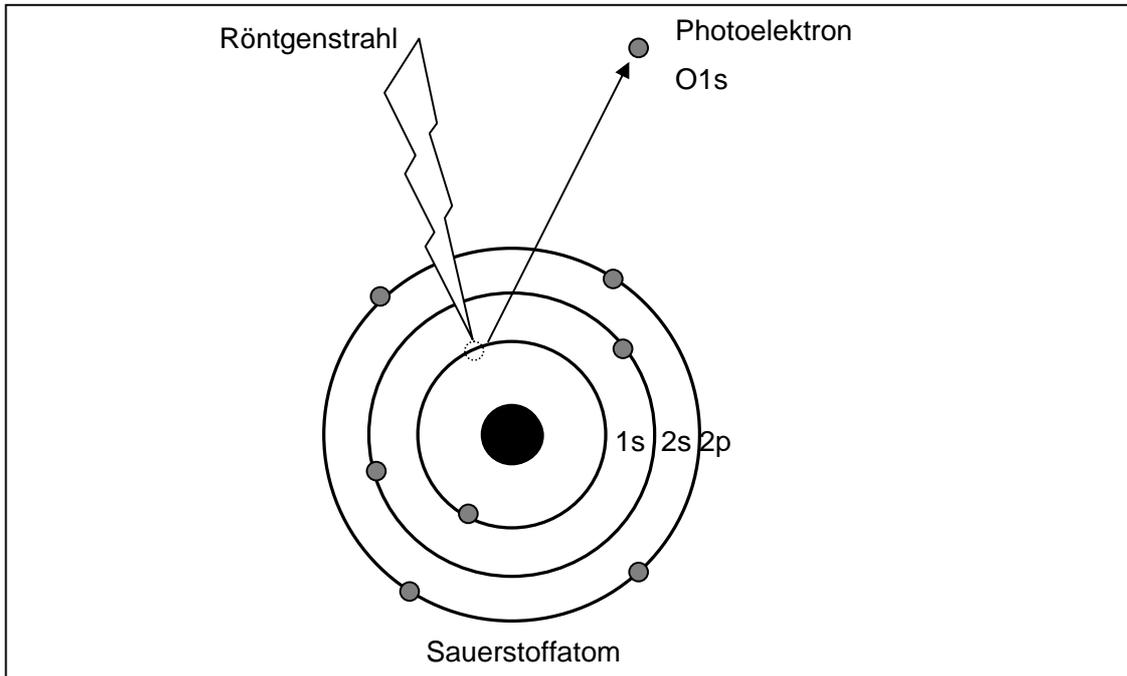


Abbildung 2: Emission eines Photoelektrons aus einem Sauerstoffatom durch den verlustfreien Übertrag der Energie beim Zusammenprall zwischen Photon und Elektron

effekt, dem verlustfreien Energieübertrag beim Zusammenprall zwischen Photon und Elektron (Abbildung 2). Zwischen der Anregung durch das Photon und der Emission des Photoelektrons liegen typischerweise $\sim 10^{-16}$ Sekunden. Physikalisch wird dieser Prozess durch die Formel 2.1 beschrieben.

$$E_B = h\nu - KE$$

E_B = Bindungsenergie

$h\nu$ = Energie der Röntgenquelle

KE = kinetische Energie

Formel 2.1: Einsteinsche Formel

Da die Energie der Röntgenquelle $h\nu$ bekannt ist und kinetische Energie KE am XPS gemessen wird, kann die Bindungsenergie in Elektronenvolt [eV] errechnet und angegeben werden. Dabei ist zu beachten, dass die Bindungsenergie von der Umgebung des Elektrons abhängt. Die negativ geladenen Elektronen werden von dem positiv geladenen Atomkern angezogen. Je näher ein Elektron dem Kern ist, desto größer ist dessen

Bindungsenergie. Eine Änderung der Bindungsenergie eines Elektrons wird im XPS immer dann detektiert, wenn das Atom kovalent oder ionisch an ein anderes Atom gebunden ist. Diese Änderung der Bindungsenergie wird chemische Verschiebung (*chemical shift*) oder Bindungsenergieverschiebung (*binding energy shift*) genannt. Anhand der Verschiebung der Bindungsenergie kann auf die molekulare Umgebung eines Atoms geschlossen werden. Mittels XPS werden ausschließlich Information der obersten 10 nm einer Probe analysiert, obwohl der Röntgenstrahl deutlich tiefer in die Probe eindringt. Denn nur Photoelektronen aus den oberen 10 nm können ohne Energieverlust aus der Probe austreten. Alle Photoelektronen, die aus tiefer sitzenden Atomen generiert werden, treten entweder gar nicht aus der Oberfläche aus oder verlieren vor dem Austritt einen Teil ihrer Energie. Somit tragen diese Photoelektronen nicht zum Emissionspeak, sondern zum Hintergrundsignal des XPS-Spektrums bei. Zur Auswertung von XPS-Spektren wird dieses Hintergrundsignal mit einem von Shirley entwickelten Modell beschrieben [68]. Um aus den Spektren die maximale Information gewinnen zu können, müssen für jeden Teilpeak eines bestimmten Orbitales die Peakfläche und die Bindungsenergie (Peakposition) berechnet werden. Dies geschieht grundsätzlich mit einer Multippeak-Fitting-Prozedur. Die Parameter, die dabei beachtet werden sind neben dem Hintergrund die Peakform, Peakposition, Peakhöhe und Peakbreite. Anhand von Voruntersuchungen oder begründeten Vermutungen zu molekularen Bindungen werden die Positionen und die Anzahl der einzelnen Peaks ungefähr positioniert um anschließend mit der Methode der kleinsten Quadrate die endgültigen Werte zu bestimmen.

2.2.1.2 Präparation und Messung

Die gereinigten Materialien wurden in 50 mL Urin für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Urin möglichst turbulenzarm abgegossen und durch Reinstwasser ersetzt. Nach 2 Minuten wurde das Wasser vorsichtig entfernt und die Materialien aufrecht stehend bei Raumtemperatur auf einem Papiertuch getrocknet. Die Referenzproben wurden nach der Reinigung direkt zur Messung verwendet. Diese wurden an einem Phi-XPS-5600-System mit monochromatisierter Al-K α Strahlung (300 W) auf einer Messfläche von 500 μm^2 durchgeführt. Die Pass-Energie für die Übersichtsspektren betrug 117 eV bei einer Messzeit von 45 Minuten und einer Schrittweite von 0,5 eV. Die Detail-Spektren der einzelnen Elemente wurden mit einer Pass-Energie von 23,5 eV, einer Messzeit von 6 Minuten und einer Schrittweite von 0,1 eV aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der XPS-Software Casa XPS

2.3.15 auf Basis der Φ -Standard Sensitivitätsfaktoren. Zur Korrektur der differentiellen Aufladung der Isolatoroberfläche wurde das Peakmaximum des Kohlenstoffsignals auf 284,8 eV verschoben. Nach der Definition der Quantifizierungsregionen der einzelnen Elemente wurde die Hintergrundsubtraktion nach Shirley auf den größten Peak aller Elemente angewendet. Zur Berechnung der Atomkonzentration erfolgte durch Formel 2.2.

$$C_{\text{Element}} (\text{Atom} - \%) = \frac{A_{\text{Elementpeak}} \cdot \text{RSF}_{\text{Elementpeak}} \cdot T_{(E_{\text{kin}} \text{ Photoelektronen})}}{\sum A_{\text{alle Elementpeaks}}}$$

C_{Element}	= Elementkonzentration in Atomprozent
$A_{\text{Elementpeak}}$	= Flächeninhalt des zu quantifizierenden Elementpeaks
RSF	= Φ -Sensitivitätsfaktor
$T_{(E_{\text{kin}} \text{ Photoelektronen})}$	= Transmissivität des Analysator abhängig von der kinetischen Energie der Photoelektronen

Formel 2.2: Berechnung der Atomkonzentration mit Korrektur um Φ -Sensitivitätsfaktor und Transmissivität des Analysators

2.2.2 Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie

Die Sekundärionen-Massenspektrometrie (*Secondary Ion Mass Spectroscopy*), kurz SIMS, in Verbindung mit einem Flugzeitmassenanalysator (*Time of Flight*), zusammen TOF-SIMS genannt, ist eine oberflächenaktive Massenspektrometrie von Ionen, die durch die Beschießung von festen Oberflächen mit energiereichen, primären Molekülen herausgelöst werden. Obwohl schon 1910 die Emission von Sekundärionen aus Oberflächen beobachtet wurde, konnte SIMS erst 1970, aufbauend auf den Arbeiten von Benninghoven, in der Oberflächenanalytik eingesetzt werden [69].

2.2.2.1 Prinzip

Ein Strom von Ionen mit Energien zwischen 10-40 keV trifft auf eine feste Oberfläche. Die Energie wird dabei auf die Atome der Oberfläche übertragen, wobei kleine „Kollisionen“ zwischen den Atomen entstehen. Diese Zusammenstöße führen zur Emission von Elektronen, neutralen Teilchen, Atomen, Atomcluster und Molekülen (Abbildung 3). Den größten Anteil stellen die neutralen Teilchen dar, welche von TOF-SIMS nicht ausgewertet werden. Ausschließlich die ionisierten Teilchen werden vom Massendetektor analysiert. Heute werden als Quellen anstatt atomaren Ionen wie Ar^+ , Ga^+ oder Cs^+ Cluster-Primärionen wie Au_n^+ , Bi_n^+ , SF_n^+ , oder C_{60}^+ benutzt, da sie höhere Ausbeuten an Sekundärionen erzeugen und somit die Sensitivität der Methode noch verbessern konnten.

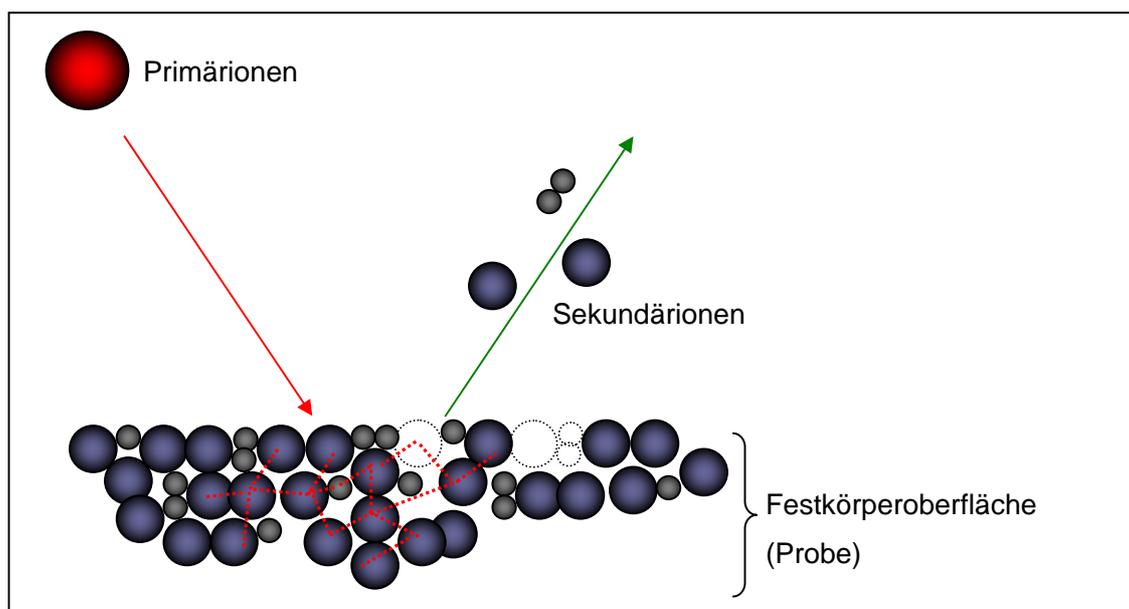


Abbildung 3: Prinzip der Erzeugung von Sekundärionen in der Sekundärionen-Massenspektrometrie

Die Ionisierung der austretenden Teilchen erfolgt direkt oder sehr dicht beim Austreten aus der Oberfläche. Dies hat zur Folge, dass die umgebende Materialmatrix einen großen Einfluss auf diesen Prozess hat. Dabei wird die Ausbeute an Sekundärionen stark vom Elektronenzustand der Analyseoberfläche beeinflusst, was als Matrixeffekt bezeichnet wird. Die Bildung von Sekundärionen von organischen Materialien kann durch verschiedene Ereignisse entstehen wie beispielsweise durch das Herauslösen eines Elektrons aus dem Atomorbital, durch Säure-Base-Reaktionen von polaren Molekülen oder durch Kationisierung bzw. Anionisierung von neutralen Molekülen.

Zur Analyse all dieser Ionen können drei verschiedene Arten von Detektoren verwendet werden, der Quadrupol-Analysator, der magnetische Sektorfeldanalysator oder der Flugzeitmassenanalysator. Der verwendete Flugzeitmassenanalysator beschleunigt den gepulsten Sekundärionenstrahl mit einer festen Spannung, so dass alle Ionen nahezu die gleiche kinetische Energie besitzen. Nach dem Durchqueren eines Flugrohrs treffen sie auf die Analyseeinheit, die aus einer Sammellinse, einem Halbkugelanalysator und einem Mehrfachkanaldetektor besteht. Schwere Teilchen benötigen mehr Zeit das Flugrohr zu durchqueren. Die Flugzeit kann durch die Formel 2.3 beschrieben werden, woraus sich die Masse errechnen lässt. Im Halbkugelanalysator erfolgt anschließend eine Auftrennung nach der Ladung.

$$t = L \left(\frac{m}{2zV} \right)^{\frac{1}{2}}$$

t = Flugzeit

L = Länge des Flugrohrs

V = Beschleunigungspotential

m/z = Masse-Ladungs-Verhältnis

Formel 2.3 : Berechnung der Flugzeit für ein Molekül mit bekanntem Masse-Ladungs-Verhältnis

2.2.2.2 Präparation und Messung

Die Inkubation der gereinigten Materialien Glas, SAN, TPU und Stahl fand in 2 mL Testlösung für 24 Stunden bei 37 °C statt (Tabelle 7 / Tabelle 8). Anschließend wurden die Lösungen möglichst turbulenzarm abgegossen und durch Reinstwasser ersetzt. Nach 2 Minuten wurde das Wasser entfernt und die Materialien aufrecht stehend bei Raum-

temperatur auf einem Papiertuch getrocknet. Die Referenzproben für die Materialien wurden nach der Reinigung direkt zur Messung verwendet. Die Primärionen stammten aus einer Bi_2^+ -Quelle, die für eine Messdauer von 100 Sekunden auf eine Fläche von $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ fokussiert wurden. Pro Probe wurden bis zu 9 Messungen an verschiedenen Stellen durchgeführt.

Die positiven Spektren der Sekundärionen konnten mit H-Ionen und H_2 -Ionen kalibriert, die Intensitäten normiert und eine Nominalpeakliste der Massen 1 - 750 u erstellt werden. Dabei wurde für jedes ganzzahlige Massenfragment die Intensitäten innerhalb der Grenzen von $\pm 0,45$ u aufaddiert. Die Grenzen wurden dabei so gewählt, dass jeweils die gesamte Peakfläche betrachtet wurde. Zur Analyse von Proteinzusammensetzungen konnte eine Nominalpeakliste von 33 proteinrelevanten Massenfragmenten nach Suzuki erstellt und verwendet werden [70]. Die Intensitäten für jeweils drei Nominalpeaklisten wurden gemittelt und damit eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Eine Hauptkomponentenanalyse ist ein mathematisches Verfahren, welches versucht die Originalvariablen einer großen Datenmenge durch eine kleinere Anzahl beschreibender Variablen zu ersetzen. Die Originalvariablen werden dazu orthogonal transformiert und es entsteht eine neue Menge unkorrelierter Variablen, die Hauptkomponenten. Zur geometrischen Veranschaulichung kann sich die Datenmenge als eine Punktwolke vorgestellt werden, in deren Schwerpunkt der Ursprung eines neuen Koordinatensystems liegt, dessen Hauptachsen entlang der größten Abweichungen ausgerichtet sind und die Hauptkomponenten darstellen. Die erste Hauptkomponente wird immer so konstruiert, dass sie für die größte Varianz der Datenmenge verantwortlich ist. Neben den Hauptkomponenten (Loadings), die die Beziehung zwischen den verschiedenen Proben angeben z.B. ein linearer Zusammenhang, werden in den sogenannten Scores diejenigen Datenpunkte angegeben, welche für das durch die Hauptkomponente beschriebene Verhalten verantwortlich sind. Das Ziel einer Hauptkomponentenanalyse ist es durch das Bestimmen von Komponenten mit dem größten/kleinsten Einfluss die Interpretation großer Datenmengen zu erleichtern.

Für jede Probe entstanden so drei Hauptkomponentenanalysen. Für die Auswertung wurden jeweils die Loadings der ersten Hauptkomponenten der drei Analysen gemittelt. Die Fehlerberechnung erfolgte durch die Standardabweichung der Loadings.

Tabelle 7: Ansatz der Testlösungen für die Testlösungen von Fibronektin und BSA

Probe	Fibronektin 100 µg/mL in PBS-Puffer	BSA 100 µg/mL in PBS-Puffer	PBS-Puffer
I	40 µL	0 µL	1960 µL
II	30 µL	10 µL	1960 µL
III	20 µL	20 µL	1960 µL
IV	10 µL	30 µL	1960 µL
V	0 µL	40 µL	1960 µL

Tabelle 8: Ansatz der Testlösungen für die Testlösungen von Fibronektin und Urin

Probe	Fibronektin 100 µg/mL in PBS-Puffer	Urin	Endkonzentration Fibronektin
I	80 µL	1920 µL	4,0 µg/mL
II	60 µL	1940 µL	3,0 µg/mL
III	40 µL	1960 µL	2,0 µg/mL
IV	20 µL	1980 µL	1,0 µg/mL

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine Sonderform der Lichtmikroskopie dar, bei der das emittierte Licht eines fluoreszierenden Stoffes mit Hilfe eines Mikroskops beobachtet wird. Die Anwendungsmöglichkeiten reichen von der Untersuchung ganzer Zellverbände, über die Visualisierung bestimmter Kompartimente und Organellen bis hin zur spezifischen Detektion einzelner Moleküle. Voraussetzung für dieses Messprinzip ist die Verwendung eines fluoreszierenden Farbstoffes [71].

2.2.3.1 Prinzip

Für die Fluoreszenzanregung wird ein Molekül durch die Adsorption von Licht vom niedrigsten Energiezustand S_0 in einen höherenergetischen Zustand S_1 oder S_2 angehoben. Der Rückgang in den Grundzustand, die Relaxation, kann entweder strahlungslos erfolgen, so dass die Energiedifferenz z.B. in Form von Wärme abgegeben wird, oder durch die Emission eines Photons. Diese Emission nennt man Fluoreszenz. Das Fluoreszenzspektrum ist gegenüber dem Anregungsspektrum zu geringeren Energien, dementsprechend zu größeren Wellenlängen (Rotverschiebung), verschoben. Diese Verschiebung wird auch als Stoke's Shift bezeichnet. Die Lebensdauer des angeregten Zustandes beträgt 10^{-9} - 10^{-7} Sekunden und liegt damit in der Größenordnung bzw. über den Zeiten für Diffusion, Rotation oder Konformationsänderungen biologischer Makromoleküle. Damit ist die Fluoreszenzmikroskopie für die Untersuchung solcher Prozesse attraktiv. In Abhängigkeit davon, ob die Fluoreszenz direkt von einem zu detektierenden Molekül oder von eingebauten bzw. angebundenen fluoreszierenden Molekülen stammt, wird zwischen intrinsischer und extrinsischer Fluoreszenz unterschieden.

In Abbildung 4 ist der schematische Aufbau eines Auflicht-Fluoreszenzmikroskops, auch Epifluoreszenzmikroskop genannt, dargestellt. Die fluoreszierenden Proben werden mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt. Als Lichtquelle dienen Quecksilberdampflampen oder Laser. Die benötigte Wellenlänge wird mittels optischer Filter isoliert und auf die Probe fokussiert. Das durch die Fluoreszenzaktivität emittierende Licht wird im Objektiv gesammelt und mit Hilfe dichroitischer Spiegel von der Anregungswellenlänge getrennt und auf den Detektor geleitet. Als Detektor kann eine Photokamera oder ein Photomultiplier verwendet werden.

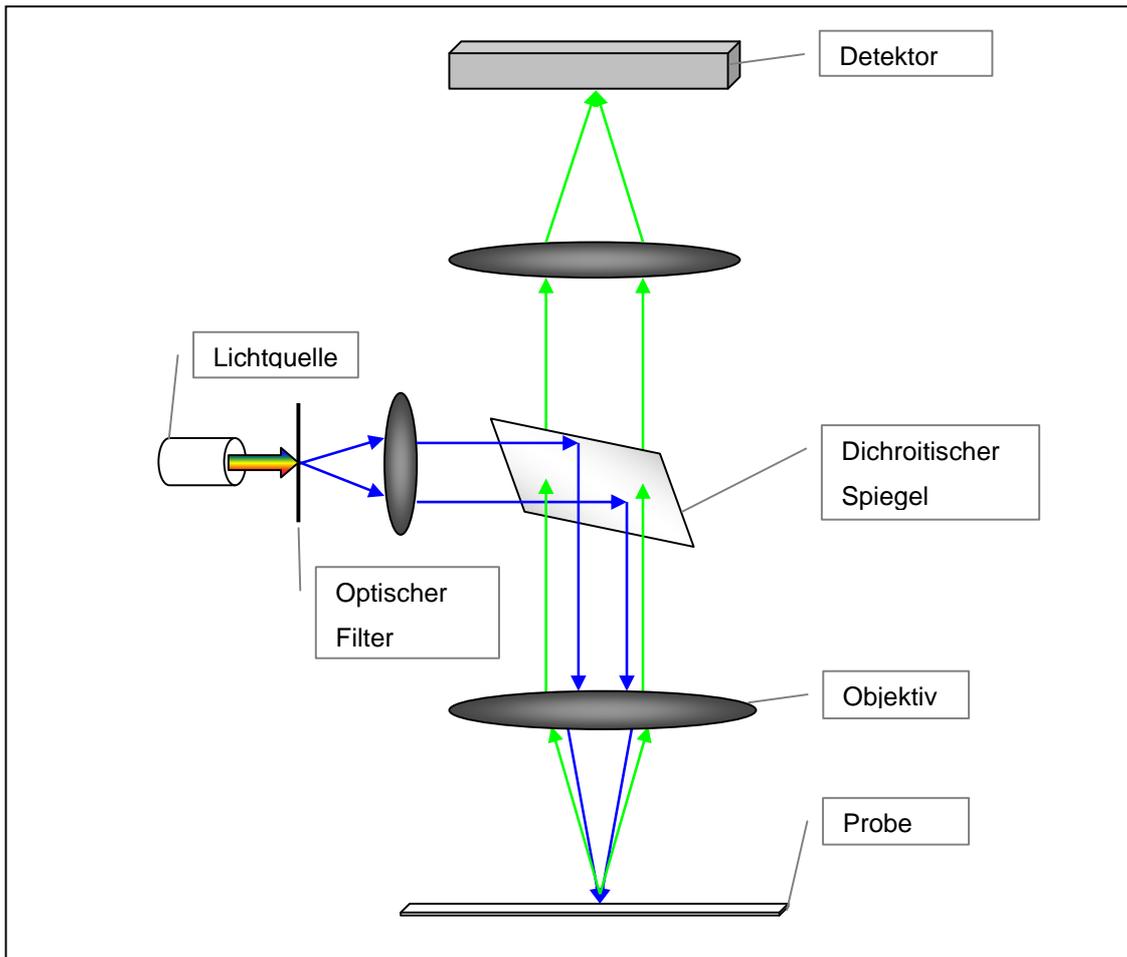


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Epifluoreszenzmikroskops mit dichroitischen Spiegel

Zur Detektion eines bestimmten Proteins auf einer Materialoberfläche können fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet werden. Für diesen zweistufigen Färbeprozess werden zwei Antikörper verwendet. Der primäre Antikörper bindet auf der ersten Stufe an das gewünschte Protein, welches sich auf der Probenoberfläche befindet. Der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper bindet auf der zweiten Stufe an den ersten Antikörper (Abbildung 5). Durch diese Vorgehensweise kann das System leicht auf andere Proteine übertragen werden, da nur der spezifische, primäre Antikörper ausgetauscht werden muss.

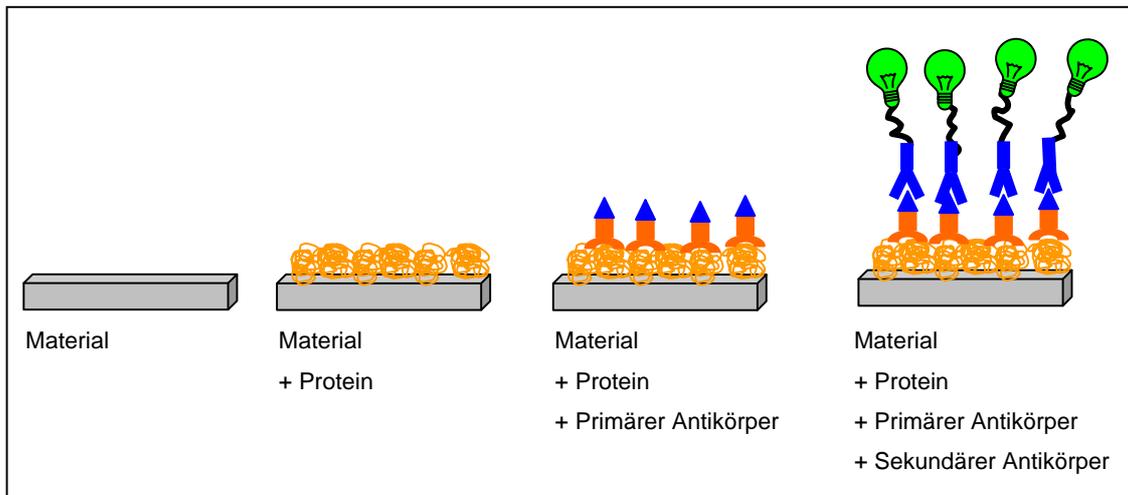


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer zweistufigen Antikörperfärbung mit Fluoreszenzmarkierung eines Proteins an seiner Oberfläche

2.2.3.2 Präparation und Messung

Die Inkubation von gereinigten Materialproben erfolgte für 24 Stunden in 2 mL Testlösung in einem Reaktionsgefäß (2 mL) (Tabellen 9 bis 11). Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit zweimal 1 mL PBS-Puffer zum Überlaufen gebracht um lose gebundene Proteine zu entfernen. Die Materialproben wurden danach in ein Reaktionsgefäß (500 μ L Gesamtvolumen) mit Glutaraldehydlösung (1 % Glutaraldehyd in PBS-Puffer) überführt und bei 5 $^{\circ}$ C für 30 Minuten inkubiert. Durch die chemische Quervernetzung wurden die Proteine so auf der Oberfläche fixiert. Nach erneutem Spülen mit zweimal 1 mL Blockingpuffer (PBS-Puffer mit 1 % Casein oder 3 % BSA) inkubierten die Proben in diesem Puffer für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dadurch konnte noch freie Materialoberfläche mit Casein oder BSA (*bovine serum albumin*) belegt und somit im Folgenden unspezifische Bindungen zwischen Antikörpern bzw. Detektionsprotein und Material verringert werden. Im Anschluss erfolgte die Behandlung der Proben entweder in einer Lösung mit primären Antikörpern oder mit fluoreszenzmarkierten Detektionsproteinen wie Concanavalin A (Tabelle 2). Lose anhaftende Antikörper bzw. Detektionsproteine wurden anschließend entfernt indem die Reaktionsgefäße mit zweimal 1 mL PBS-Puffer zum Überlaufen gebracht wurden. Für die Inkubation mit fluoreszierenden Detektionsproteinen konnte direkt nach diesem Waschschritt die Untersuchung der Probe unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Die mit primärem Antikörper behandelten Proben wurden dagegen mit einem fluoreszenzmarkierten, sekundären

Antikörper für 6 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 2). Nach einem weiteren Waschschrift mit zweimal 1 mL PBS-Puffer konnten sie unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Die Messungen wurden an Fluoreszenzmikroskopen Leica DMI 6000 und Leica DMI RBE durchgeführt. Auf zwei unabhängig voneinander präparierten Materialoberflächen wurden jeweils vier Aufnahmen mit einem Bildausschnitt von 1283 μm x 963 μm aufgenommen. Da unterschiedliche Belichtungszeiten verwendet wurden, erfolgte zur Vergleichbarkeit eine Normierung der Intensitäten auf eine Belichtungszeit von 1 Sekunde. Für jede Aufnahme wurde die mittlere Intensität über alle Pixel berechnet und der Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwertes aller Aufnahmen einer Probe gebildet. Diese Intensitäten mussten um die Eigenfluoreszenz und um den Anteil der unspezifischen Bindungsereignisse der Antikörper korrigiert werden. Für die Erfassung von unspezifischen Bindungsereignissen musste parallel zur Testlösung eine Negativprobe im Protokoll mitgeführt werden. Die dazu verwendete Testlösung durfte das zu detektierende Protein nicht enthalten, sollte die umgebende Testlösung jedoch bestmöglich widerspiegeln. Für die erste Korrektur um die Eigenfluoreszenz wurden die Intensitäten von unbehandelten Materialproben gemessen und sowohl von der Positiv- als auch von der Negativprobe subtrahiert. Die Positivproben wurden anschließend noch durch die Subtraktion der Intensitäten der Negativprobe korrigiert.

Tabelle 9: Detektion Glykoproteine nach der Adsorption aus Urin mittels Fluoreszenzmikroskopie

Materialoberflächen	Glas, SAN, TPU
Testlösungen	Urin
Negativprobe	BSA
Inkubationszeit [h]	24
Inkubationstemperatur [°C]	37
Blockingpuffer	PBS mit 3 % BSA
Detektionsprotein	Concanavalin A Alexa Fluor 488 conjugated

Tabelle 10: Detektion HSA nach der Adsorption aus Urin mittels Fluoreszenzmikroskopie

Materialoberflächen	Glas, SAN, TPU, Stahl, Polystyrol, PVC
Testlösungen	Urin
Negativprobe	Urin < 30 kDa
Inkubationszeit [h]	24
Inkubationstemperatur [°C]	37
Blockingpuffer	PBS mit 1 % Casein
Primärer Antikörper	Anti-HSA whole antiserum produced in rabbit Verdünnung 1:5000
Sekundärer Antikörper	Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 conjugated produced in goat Verdünnung 1:50

Tabelle 11: Detektion THP nach der Adsorption aus Urin mittels Fluoreszenzmikroskopie

Materialoberflächen	Glas, SAN, TPU, Stahl, Polystyrol, PVC
Testlösungen	Urin;
Negativprobe	Urin < 30 kDa
Inkubationszeit [h]	24
Inkubationstemperatur [°C]	37
Blockingpuffer	PBS mit 1 % Casein
Primärer Antikörper	Anti-THP monoclonal produced in mouse Verdünnung 1:3000
Sekundärer Antikörper	Anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 conjugated produced in goat Verdünnung 1:50

2.2.4 Quarzkristall-Mikrowaage

Eine Quarzkristall-Mikrowaage (*quartz crystal microbalance*), kurz QCM, kann mit Hilfe eines Schwingquarzes als Messsensor die Adsorptionskinetik von verschiedenen Molekülen und Partikeln detektieren und quantitativ bestimmen. Die Nachweisgrenze liegt bei $\sim 1 \text{ ng/cm}^2$. Die Grundlage für eine Quarzkristall-Mikrowaage ist der von den Brüdern Jaques und Pierre Curie 1880 entdeckte Piezoeffekt. Dieser beschreibt das Auftreten einer elektrischen Spannung durch die mechanische Verformung eines Festkörpers. Umgekehrt können piezofähige Festkörper ihre Form verändern, indem eine elektrische Spannung angelegt wird. Dies wird auch als inverser Piezoeffekt bezeichnet.

2.2.4.1 Prinzip

Der Messsensor einer QCM besteht aus einer dünnen Scheibe eines piezoaktiven Quarzkristalls, welcher mit Elektroden versehen ist. Aufgrund der Piezoelektrizität wird durch das Anlegen eines oszillierenden, elektrischen Feldes eine Schallwelle induziert, die sich über den Quarz fortsetzen kann und den Quarz zum Schwingen bringt. Die Schallwelle breitet sich senkrecht zur Kristalloberfläche aus und erfährt nur eine minimale Impedanz, insofern die Quarzdicke ein Vielfaches der halben Wellenlänge der Schallwelle beträgt [72;73]. Für diese Anwendung muss der Quarz hinsichtlich der Kristallachse in einer speziellen Orientierung geschnitten werden. Häufig wird der sogenannte AT-Schnitt verwendet, bei dem in einem Winkel von $35^\circ 10'$ bezüglich der z-Achse geschnitten wird. Der so entstehende Quarzkristall hat ein stabiles Schwingungsverhalten mit sehr geringen Frequenzschwankungen im Bereich der Raumtemperatur (Abbildung 6) [74]. Während der Messung wird der Schwingquarz bei seiner spezifischen Reso-

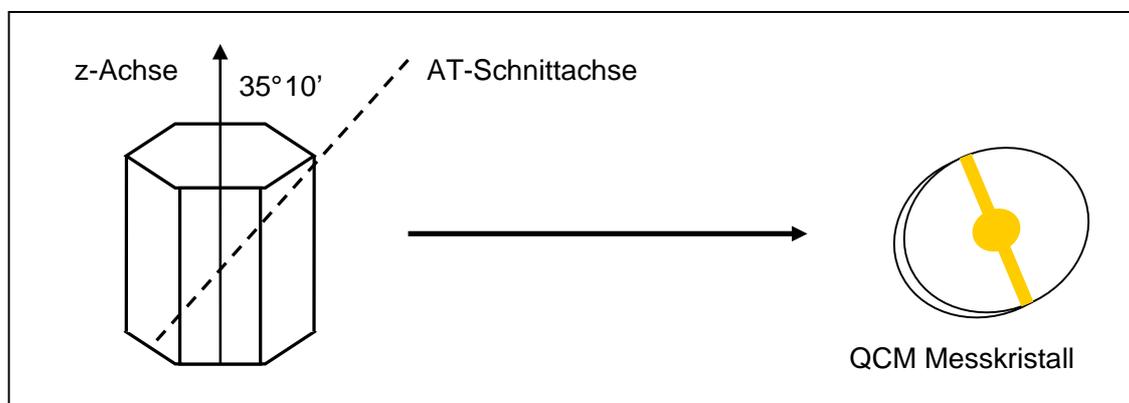


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Schnittführung für einen QCM-Messkristall

nanzfrequenz angeregt, die typischerweise zwischen 5-10 MHz liegt [75]. Adsorbiert nun eine dünne Schicht mit der Masse m auf dem Quarz, wird die Resonanzfrequenz f erniedrigt. Sauerbrey zeigte 1959 den proportionalen Zusammenhang zwischen dieser Veränderung der Schwingungsfrequenz und der adsorbierten Masse auf der Quarzoberfläche [76]. Neben der Frequenz und deren Änderung wird außerdem die Dissipation, der Schwingungsverlust, detektiert. Dadurch kann neben der Masse einer Schicht auch festgestellt werden, ob diese Schicht starrer oder viskoelastischer Natur ist. Während ein elastischer Film die Schwingung sehr schnell dämpft, führt ein starrer Film nur gering oder langsam zu einer Schwingungsdämpfung [77].

$$\Delta f = K \cdot \Delta m$$

Δf = Frequenzänderung

K = Stoffkonstante

Δm = Massenänderung

Formel 2.4: Zusammenhang zwischen Frequenz- und Massenänderung nach Sauerbrey [76]

2.2.4.2 Präparation und Messung

Zur Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen konnte durch eine Ergänzung mit der QCM eine Kalibrierung für die Proteine HSA (*Human Serum Albumin*) und THP (*Tamm-Horsfall-Glycoprotein*) erstellt werden. Dazu wurden Messkristalle mit einer SiO_2 -Oberfläche verwendet, welche vor der Messung im Plasmaätzer für 10 Minuten bei 40 Watt Leistung gereinigt wurden. Alle Messungen wurden mit dem Gerät Q-Sense E4 durchgeführt. Während der Messung adsorbierten verschiedene Konzentrationen an HSA und THP auf die Quarzoberfläche, die Konzentrationen der in PBS-Puffer gelösten Proteinlösungen lagen zwischen 5 $\mu\text{g/mL}$ und 1 mg/mL . Die Messungen erfolgten bei 37 °C und die Proteinschicht auf dem Messkristall wurde nach der Adsorption mittels einer Glutaraldehydlösung (1 % Glutaraldehyd in PBS-Puffer) fixiert. Nach einem finalen Spülschritt mit PBS-Puffer konnte die tatsächlich adsorbierte Masse mit Hilfe der Formel 2.4 in ng/cm^2 bestimmt werden. Diese so präparierten Messkristalle wurden anschließend mittels Immunofluoreszenz untersucht (2.2.3.2). Die am Ende der Fluoreszenzmikroskopie gemessenen Intensitäten konnten mit der adsorbierten Masse korreliert werden.

2.2.5 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*), kurz AFM, wurde 1986 von Binnig et al. erstmals beschrieben und gehört zur Reihe der Rastersondenmikroskope [78]. Durch das Abtasten mit einer mikrofein hergestellten Spitze können Informationen über Topographie und Elastizität einer Oberfläche gewonnen werden.

Eine weitere Anwendung dieses Mikroskops ist die Kraftspektroskopie, in der attraktive und repulsive Kräfte zwischen einer Oberfläche und einer Messspitze quantitativ detektiert werden können. Das Anwendungsgebiet der Kraftspektroskopie reicht über die Messung von Adhäsionskräften zwischen Substrat und Bakterien, über Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Verbindungen bis hin zu Einzelmoleküluntersuchungen [79-83]. Ein wichtiger Schritt hinsichtlich der quantitativen Kraftspektroskopie wurde durch die Verwendung von kleinen Materialkugeln mit definierten Querschnitten (2-20 μm) anstelle einer Spitze erzielt [84].

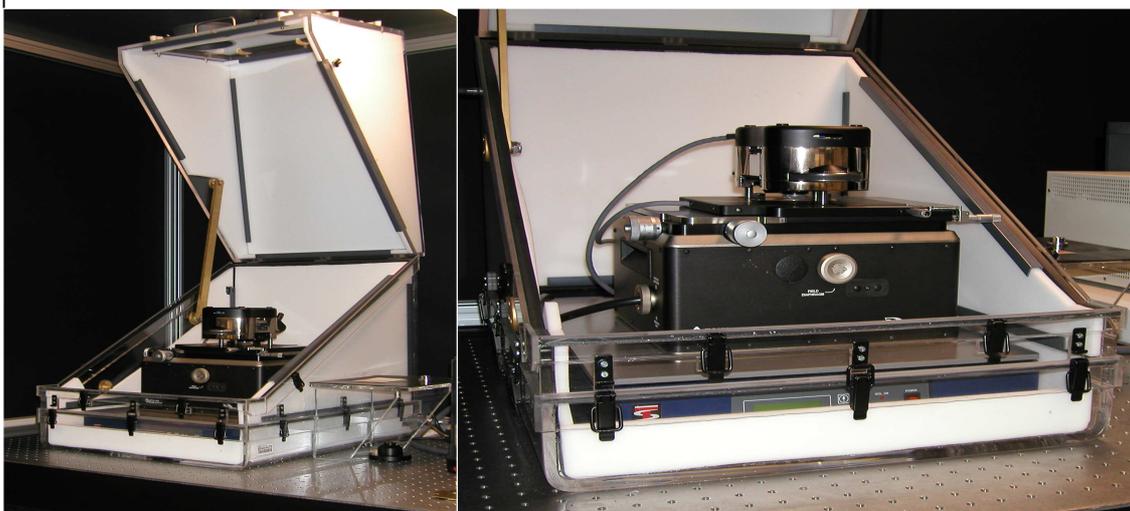
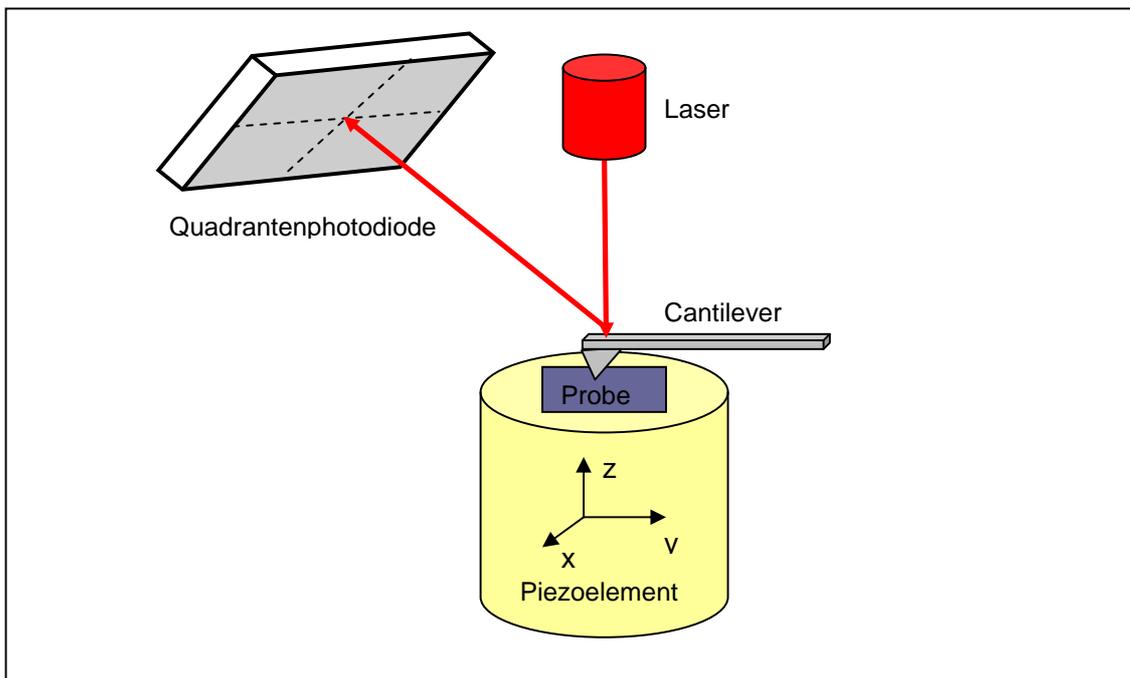
2.2.5.1 Prinzip

Zur Messung wird eine Spitze (Radius: 3 - 10 nm) verwendet, die sich am Ende eines Federbalkens, Cantilever genannt, befindet (Abbildung 7). Auf die Rückseite dieses Cantilevers wird ein Laserstrahl justiert, dessen Reflektion mit Hilfe eines Spiegels auf eine Quadrantenphotodiode gelenkt wird (Lichtzeigerprinzip). Wird die Spitze nun Zeile für Zeile über eine Probenoberfläche geführt, lenken Kräfte, die zwischen Spitze und Probe wirken, den Cantilever aus. Anhand der daraus resultierenden Auslenkung des Lasers auf der Quadranten-Photodiode können topographische Informationen über die Probe erfasst werden. Je nach Aufbau des Mikroskops wird entweder die Spitze oder die Probe mittels Piezokristallen in x-, y- und z-Richtung bewegt. Sowohl das Signal der Photodiode als auch die Positionen der Piezokristalle werden aufgezeichnet und zur Regelung verwendet. Auf diese Weise wird eine Probe Punkt für Punkt abgerastert und es entsteht ein Bild, dessen Auflösung maßgeblich durch die Spitzengröße und Spitzengeometrie beeinflusst wird.

Abbildungsmodi

Zur Abbildung von Probenoberflächen werden grundsätzlich zwei Betriebsarten unterschieden. Im *Contact Mode* wird die Spitze in direkten Kontakt mit der Oberfläche ge-

bracht, wobei während der Messung entweder die Kraft oder der Abstand zwischen Spitze und Oberfläche konstant gehalten wird. Im *Tapping Mode* hingegen wird der Cantilever nahe der Oberfläche mit einem zusätzlichen Piezoelement im Bereich seiner Resonanzfrequenz angeregt. Durch Wechselwirkungen zwischen der Spitze und der Oberfläche kommt es zu einer relativen Frequenzverschiebung, dem Phasenshift, und zur Änderung der Schwingungsamplitude. Dadurch können Material- und Höheninformationen gewonnen werden.



**Abbildung 7: Oben: Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops
Unten: Rasterkraftmikroskop MFP-3D Firma Asylum Research, Santa Barbara**

Kraftspektroskopie

In der Kraftspektroskopie wird der Cantilever der Probe angenähert, mit definierter Kraft auf die Probe gedrückt und wieder zurückgezogen. Es werden dabei der vertikale Weg des z-Piezos und die Verbiegung des Cantilevers detektiert. Die Auslenkung kann mit Hilfe der Federkonstante des Cantilevers in eine Kraft umgerechnet werden. Gegeneinander aufgetragen ergibt sich eine Kraft-Abstand-Kurve [85]. Während der Messung trifft der Laser auf eine Vierquadrantenphotodiode, welche eine bestimmte Sensitivität S_{Diode} besitzt, und induziert dort einen Strom, der in die Diodenspannung U_{Diode} umgewandelt wird. Die Auslenkung des Cantilever d kann dann als Produkt aus Sensitivität und Spannung der Photodiode ermittelt werden.

$$d = U_{\text{Diode}} \cdot S_{\text{Diode}}$$

d = Auslenkung

U_{Diode} = Spannung der Photodiode

S_{Diode} = Sensitivität der Photodiode

Formel 2.5: Berechnung der Auslenkung des Cantilevers

Zur Umrechnung der Auslenkung d in eine Kraft F muss diese mit der Federkonstante des Cantilevers multipliziert werden (Hookesches Gesetz). Da die Federkonstanten stark von den Herstellerangaben abweichen können, muss die Federkonstante noch einmal für jeden Cantilever bestimmt werden. Dies kann rechnerisch anhand der Geometrie des Cantilevers erfolgen, durch die Kopplung mit einem Eichcantilever oder wie im folgenden beschrieben aus dem thermischen Rauschverhalten des Cantilevers abgeleitet werden [86-88]. Dabei wird der Cantilever als ein harmonischer Oszillator mit einer Auslenkung Δd betrachtet.

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2} m \omega_0^2 q^2$$

p = Impuls

q = Auslenkung

m = oszillierende Masse

ω_0 = Resonanzfrequenz

Formel 2.6: Harmonischer Oszillator

Nach dem Gleichverteilungssatz gilt:

$$\left\langle \frac{1}{2} m \omega_0^2 q^2 \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T$$

k_B = Boltzmannkonstante

T = Temperatur

Formel 2.7: Äquivalenz durch die Anwendung des Gleichverteilungssatzes

Für die Resonanzfrequenz gilt:

$$\omega_0^2 = \frac{k}{m}$$

ω_0 = Resonanzfrequenz des Cantilevers

k = Federkonstante des Cantilevers

Formel 2.8: Berechnung der Resonanzfrequenz

Somit gilt für die Federkonstante des Cantilevers.

$$k = \frac{k_B T}{q^2}$$

Formel 2.9: Berechnung der Federkonstante des Cantilevers

Der Cantilever kann für sehr kleine Auslenkungen als harmonischer Oszillator mit genau einem Freiheitsgrad angesehen werden. Aus einem aufgenommenen, thermischen Spektrum kann somit, mittels eines Lorentz-Fits, q^2 aus der Fläche unter der Resonanzkurve ermittelt werden (Abbildung 8).

Zur Beurteilung der Qualität eines Cantilevers kann als Maß der dimensionslose Gütefaktor Q herangezogen werden (Formel 2.10).

$$Q = \frac{\nu_0}{\Delta \nu}$$

ν_0 = Frequenz

$\Delta \nu$ = Halbwertsbreite

Formel 2.10: Gütefaktor Q als Maß für die Dämpfung einer Schwingung

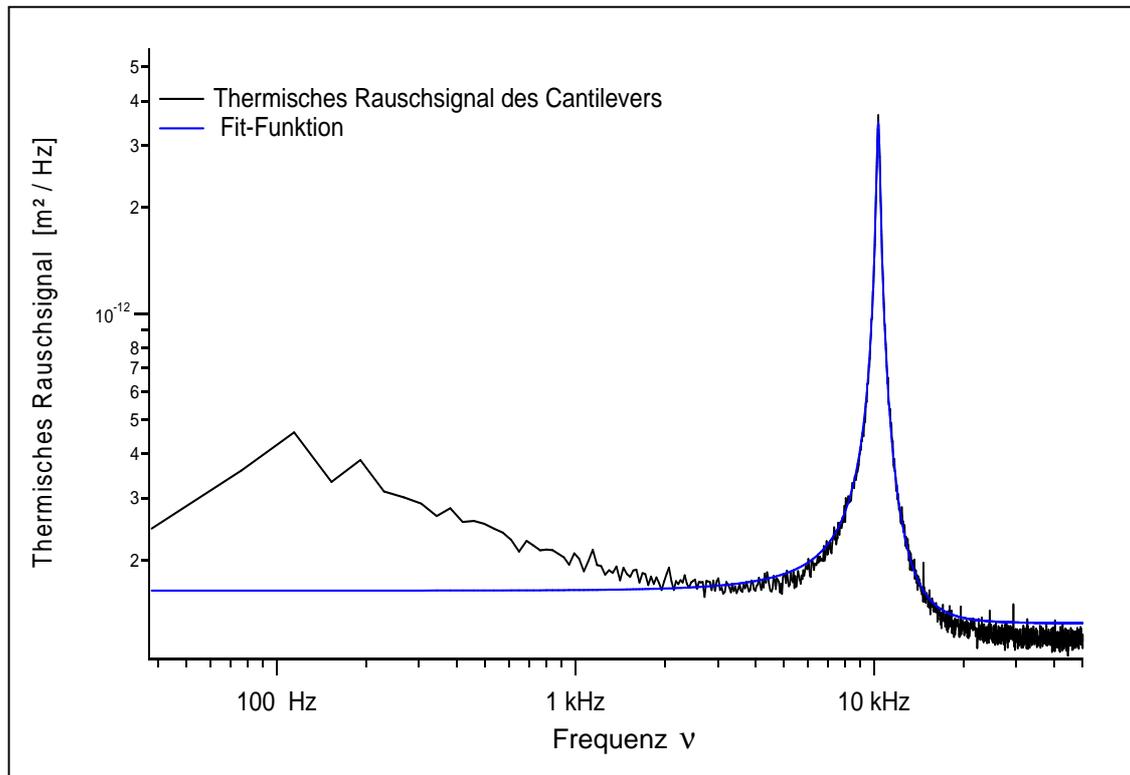


Abbildung 8: Spektrum des thermischen Rauschens eines Cantilevers

2.2.5.2 Immunogoldmarkierung - Präparation und Messung

Die AFM-Aufnahmen wurden mit einem Multimode IIIa (Digital Instruments) durchgeführt. Zur Detektion eines bestimmten Proteins auf einer Materialoberfläche mittels Immunogold inkubierten die gereinigten Materialien in verschiedene Testlösungen für unterschiedliche Zeitspannen bei 37 °C (Tabelle 12 / Tabelle 13). Anschließend wurden die Proben aus den Lösungen herausgenommen, einmal in PBS-Puffer getaucht, um lose anhaftende Moleküle zu entfernen und aufrecht stehenden bei Raumtemperatur getrocknet. Danach erfolgte für die anhaftenden Proteine eine chemische Fixierung mit Glutaraldehydlösung (1 % Glutaraldehyd in PBS-Puffer) bei 5 °C für 30 Minuten. Anschließend wurden die Proben beidseitig jeweils dreimal mit je 1 mL PBS-Puffer gespült und für 30 Minuten bei 5 °C in Blockingpuffer (1 % Casein in PBS-Puffer) inkubiert. Casein lagerte sich dabei an freie Materialoberflächen an und reduzierte dadurch unspezifische Bindungen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht in einem Reaktionsgefäß bei 5 °C. Lose anhaftende Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Spülen pro Seite entfernt und im Anschluss die Inkubation mit dem

goldkonjugierten, sekundären Antikörper für 6 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Im letzten Spülschritt wurde zur Vermeidung von Salzablagerungen Reinstwasser verwendet und die Proben aufrecht stehend getrocknet.

Tabelle 12: Detektion HSA nach der Adsorption aus Urin

Materialoberflächen	Glas, TPU
Testlösungen	Urin HSA, humane IgG, humanes Lysozym, humanes Transferrin (in PBS-Puffer je 50 µg/mL)
Negativprobe	humane IgG, humanes Lysozym, humanes Transferrin (in PBS-Puffer je 50 µg/mL)
Inkubationszeit [h]	24
Inkubationstemperatur [°C]	37
Blockingpuffer	PBS-Puffer mit 3 % BSA
Primärer Antikörper	Anti-HSA whole antiserum produced in rabbit Verdünnung 1:5000
Sekundärer Antikörper	Anti-rabbit IgG goldconjugated produced in goat Verdünnung 1:10

Tabelle 13: Detektion THP nach der Adsorption aus Urin

Materialoberflächen	Glas
Testlösung	Urin
Negativprobe	HSA, humane IgG, humanes Lysozym, humanes Transferrin (in PBS-Puffer je 50 µg/mL)
Inkubationszeit [h]	24
Inkubationstemperatur [°C]	37
Blockingpuffer	PBS-Puffer mit 3 % BSA
Primärer Antikörper	Anti-THP monoclonal produced in mouse Verdünnung 1:3000
Sekundärer Antikörper	Anti-mouse IgG goldconjugated produced in goat Verdünnung 1:10

2.2.5.3 Kraftspektroskopie - Präparation und Messung

Für die Untersuchung der Adhäsionskräfte zwischen verschiedenen Materialoberflächen und Bakterien wurde der in Abbildung 23 dargestellte Versuchsaufbau verwendet. Dabei wurde eine Materialkugel an einem Cantilever befestigt und die Wechselwirkungen zwischen dieser Materialoberfläche und auf Glas immobilisierten Bakterien gemessen.

Zur Kultivierung der Bakterien *Pseudomonas putida* wurden 50 mL Nährmedium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane (250 mL) durch mehrere Kolonien von einer Agarplatte beimpft (Tabelle 4). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30 °C und 190 rpm. Mit dieser Vorkultur wurden 50 mL frisches Nährmedium so beimpft, dass die $OD_{600} = 1$ betrug (Formel 2.11). Nach 3 Stunden konnten 2 mL Bakteriensuspension abzentrifugiert (2000 rpm, 3 Minuten), der Überstand verworfen und die Zellen in 2 mL PBS-Puffer gewaschen werden. Nach erneutem Zentrifugieren, Abgießen des Überstands und Resuspension in 2 mL PBS-Puffer wurde die Bakteriensuspension für die Immobilisierung verwendet.

Dazu waren zuvor gereinigte Glasobjektträger für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Polyethyleniminlösung (PEI, 0,5 % in Reinstwasser) inkubiert und das überflüssige PEI mit Reinstwasser abgespült worden. Nach dem Trocknen der Oberfläche unter einem Stickstoffstrom konnte die vorbereitete Bakteriensuspension mit der Oberfläche für 1 Stunde in Kontakt gebracht werden. Anschließend wurde die Oberfläche gründlich mit PBS-Puffer abgespült und die immobilisierten Bakterien kraftspektroskopisch untersucht. Die Durchführung der Messungen erfolgte an einem Rasterkraftmikroskop (MFP-3D, Asylum Research) im *Contact Mode* und in PBS-Puffer mit spitzenlosen Cantilevern (μ -Masch, Ultrasharp tiplless / no Al, Estonia).

Am Federbalken E mit einer Resonanzfrequenz zwischen 7-14 kHz und Federkonstanten um 30 pN/nm wurden Materialkugeln (Borosilikatglas oder Polystyrol) angeklebt (Zweikomponentenkleber Fa. UHU). Die modifizierten Cantilever mussten vor der Messung in einem Plasmaätzter gereinigt und die Sensibilität und die Federkonstante auf einem gereinigten Glasobjektträger bestimmt werden.

Zur Beschichtung mit Proteinen oder mit Urin inkubierten die wie zuvor beschrieben vorbereiteten Cantilever für 3 Stunden bei Raumtemperatur in den entsprechenden Lösungen. Für die Proteine HSA und THP wurden dazu 50 μ g/mL und für Hydrophobin 0,1 % in PBS-Puffer gelöst, der Urin wurde unverdünnt verwendet. Für die Aufnahme einer Kraft-Abstand-Kurve wurde bei einer Scanrate von 0,5 Hz, einer Distanzrampe von 2-5 μ m und einem Auslösegrenzwert zwischen 10 - 30 nN gemessen. Der Cantilever

blieb für 1 Sekunde im Kontakt mit den Bakterien bevor er zurückgezogen wurde. Für jeden präparierten Cantilever entstand eine Messreihe mit bis zu 10 verschiedenen Messstellen und jeweils 100 Kraft-Distanz-Kurven. Für diese Messkurven wurde die Differenz zwischen dem tiefsten Punkt der Kurve und der Nulllinie als maximale Adhäsion bestimmt. Lag dieser Wert innerhalb des Rauschniveaus der Messkurve, wurde die maximale Adhäsion als 0 definiert und für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Aus den Adhäsionskräften konnte für jede Messreihe ein Histogramm erstellt werden, wobei zur besseren Vergleichbarkeit die Adhäsionskraft gegen die relative Häufigkeit aufgetragen wurde. Als Vergleichswert wurden die mittlere Adhäsionskraft und der Standardfehler des Mittelwertes bestimmt.

Zur Untersuchung der Adhäsionskräfte zwischen Bakterien und antiadhäsiven Materialien, wurden Cantilever, die eine Polystyrolkugel trugen wie folgt behandelt. Polymerlösungen von PVP und PEO (20 mg/mL in Acetonitril) wurden zu 5 % mit einem Multivernetzer (100 mg/mL in Acetonitril) versetzt. 10 µL der Polymerlösungen wurden auf zuvor plasmagereinigte Cantilever pipettiert und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur verdampft. Die Vernetzung der zurückbleibenden Polymere erfolgte mittels UV-Behandlung (2 Minuten). Die so präparierten Oberflächen konnten direkt für kraftspektroskopische Messungen verwendet werden. Die Proteinbeschichtung mit einer HSA-Lösung (50 µg/mL in PBS-Puffer) erfolgte bei Raumtemperatur für Zeitspannen zwischen 3 und 24 Stunden.

$$OD_{\lambda} = \log \frac{I_0}{I}$$

OD = optische Dichte

λ = Wellenlänge

I_0 = Intensität einfallende Strahlung

I = Intensität austretende Strahlung

Formel 2.11: Berechnung der optischen Dichte einer Lösung

2.2.6 Präparation und Messung der statischen bakteriellen Adhäsion

Für die Untersuchung der bakteriellen Adhäsion mittels eines statischen Testaufbaus wurde *Pseudomonas putida* wie bereits beschrieben kultiviert (2.2.5.3). Abweichend dazu wurde die OD_{600} (Formel 2.11) für die Hauptkultur auf 0,1 eingestellt. Nach 3 Stunden konnten 500 μL Bakteriensuspension abzentrifugiert (2000 rpm, 3 Minuten), der Überstand verworfen und in 500 μL PBS-Puffer resuspendiert werden. Nach erneutem Abzentrifugieren und Resuspension in PBS-Puffer wurden 500 μL Bakteriensuspension in jede Vertiefung eines Probenhalters pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit den Materialoberflächen inkubiert. Anschließend wurden für eine Lebend-Tot-Färbung die Bakterien für 15 Minuten mit 1,5 μL Cyto9 und 1,5 μL Promidiumiodid behandelt. Während der grünfluoreszierende Farbstoff Cyto9 alle Bakterien anfärbt, kann der rotfluoreszierende Farbstoff Promidiumiodid nur durch die Zellmembran bereits toter Bakterien eindringen. Somit erscheinen lebende Bakterien grün und tote Bakterien rot. Jede Vertiefung wurde nach der Inkubation mit den Farbstoffen 5 x gespült, indem 400 μL Lösung entfernt und durch 400 μL PBS-Puffer ersetzt wurden. Nach dem Spülschritt entstanden mit dem Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 6000 Aufnahmen mit einem Bildausschnitt von 1283 μm x 963 μm (Abbildung 9). Mit Hilfe einer computergestützten Auswertesoftware wurde die Anzahl der anhaftenden Bakterien auf den Materialoberflächen bestimmt.

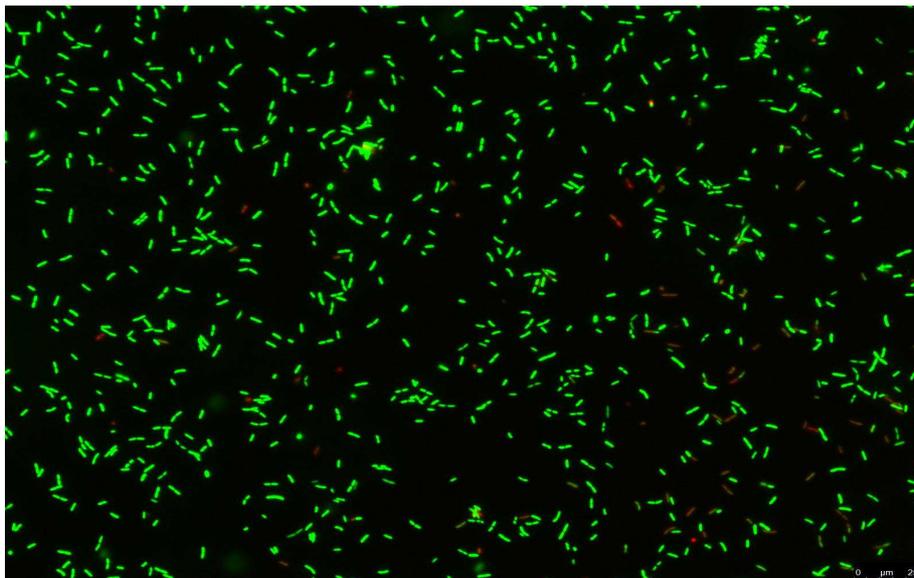


Abbildung 9: Fluoreszenzaufnahme anhaftender Bakterien *Pseudomonas putida* nach einer Lebend-Tot-Färbung

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung des Urinfilms

Die Zusammensetzung des Urinfilms auf einer Materialoberfläche kann eine entscheidende Rolle für die Adhäsion von verschiedenen Bakterien spielen [52;89]. Zur Charakterisierung wird deshalb sowohl eine chemische Elementanalyse durchgeführt, als auch die Proteinzusammensetzung auf der Oberfläche bestimmt. Für die Untersuchung des Urinfilms werden unbehandelte Proben der Materialoberflächen als Referenz mitgeführt. Durch Veränderungen zwischen unbehandeltem und urinbeschichtetem Material können Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Urinbeschichtung gezogen werden. Urin ist ein sehr heterogenes Gemisch aus anorganischen Salzen, Harnstoff, organischen Bestandteilen, darunter mehr als 1500 Proteine und 200 Peptide, und organischen Ammoniumsalzen [38;90]. All diese Komponenten können auf einer urinbeschichteten Oberfläche vorhanden sein. Durch diese Heterogenität des Urins sowie die geringen Konzentrationen einzelner Komponenten werden hohe Anforderungen an die eingesetzten Methoden gestellt.

3.1.1 Elementanalyse des Urinfilms auf verschiedenen Materialoberflächen

Zur Beurteilung der chemischen Zusammensetzung des Urinfilms auf verschiedenen Materialoberflächen wurden die Proben mittels XPS charakterisiert (2.2.1). Diese Untersuchung kann neben der Identifizierung chemischer Elemente der Materialoberfläche einen Hinweis auf vorhandene Stoffgruppen geben und erlaubt eine Abschätzung der Schichtdicke des Urinfilms. Dazu wurden unbehandelte und urinbeschichtete Materialoberflächen untersucht und die Veränderungen in den Anteilen der chemischen Elemente verfolgt. Insbesondere wurden die Ergebnisse der Urinfilme hinsichtlich substratabhängiger Unterschiede in deren Zusammensetzungen ausgewertet.

Die Konzentrationen der Hauptelemente Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff sind für die unbehandelten Materialoberflächen sehr unterschiedlich (Abbildung 10). Der Kohlenstoffanteil der Polymere TPU (thermoplastisches Polyurethan), SAN (Styrolacetonitril), Polystyrol und PVC (Polyvinylchlorid) liegt zwischen 71 At-% und 94 At-% und ist damit im Vergleich zu den nicht-polymeren Materialien Stahl (54 At-%) und Glas (12 At-%) deutlich höher. Im Unterschied dazu ist der Sauerstoffanteil in Glas und Stahl mit 58 At-% und 36 At-% am höchsten. Die Sauerstoffwerte der Polymere liegen je nach

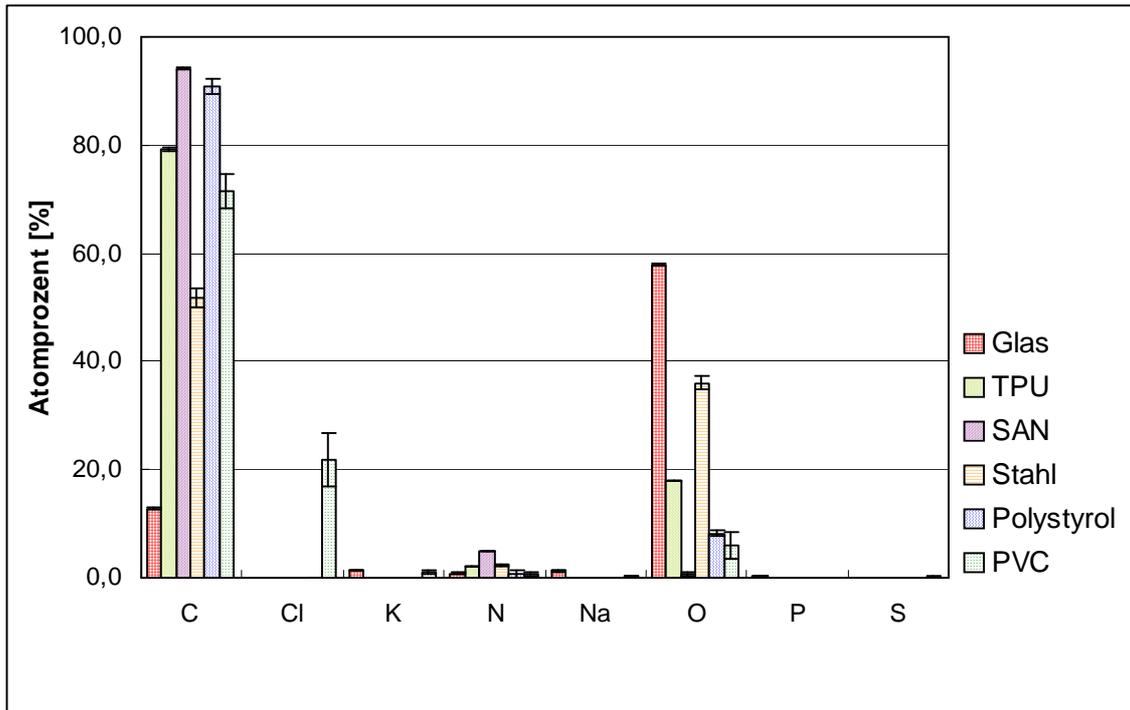


Abbildung 10: Chemische Elementanalyse mittels XPS für unbehandelte Materialoberflächen: Die XPS-Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Stellen der gereinigten Materialien für eine Analysefläche von ca. 500 μm^2 durchgeführt. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung dieser drei Messstellen wieder und beschreiben damit die laterale Heterogenität der Probe.

Struktur zwischen 0,8 At-% und 15 At-%. Die Stickstoffkonzentrationen betragen für alle Materialien außer SAN weniger als 2,4 At-%. SAN dagegen hat einen Stickstoffanteil von 5,1 At-%, was auf die Polymerstruktur zurückgeführt werden kann. Der Stickstoffanteil ist für die unbehandelten Materialien im Vergleich zu Kohlenstoff und Sauerstoff sehr niedrig. Am Beispiel von PVC zeigt sich die Materialspezifität der Elementanalyse. Aufgrund der Polymerstruktur wird ausschließlich auf diesem unbehandelten Material das Element Chlor mit 22 At-% nachgewiesen. Ebenfalls materialtypisch ist der Anteil von 21 At-% Silizium in Glas und 7 At-% Eisen in Stahl. Da diese Elemente nicht in allen Materialien detektiert wurden, sind sie nicht im Diagramm dargestellt. Für die spätere Beurteilung der Homogenität und der Schichtdicke der Urinbeschichtung ist ihre Betrachtung jedoch wichtig. Das gereinigte Glas weist Spuren von Kalium, Natrium, Phosphor und Schwefel auf. Dies könnten Verunreinigungen aus dem Herstellungsprozess sein.

Für die urinbeschichteten Materialien sind neben den Elementen Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff die Elemente Kalium, Natrium, Chlor, Phosphor und Schwefel auf allen

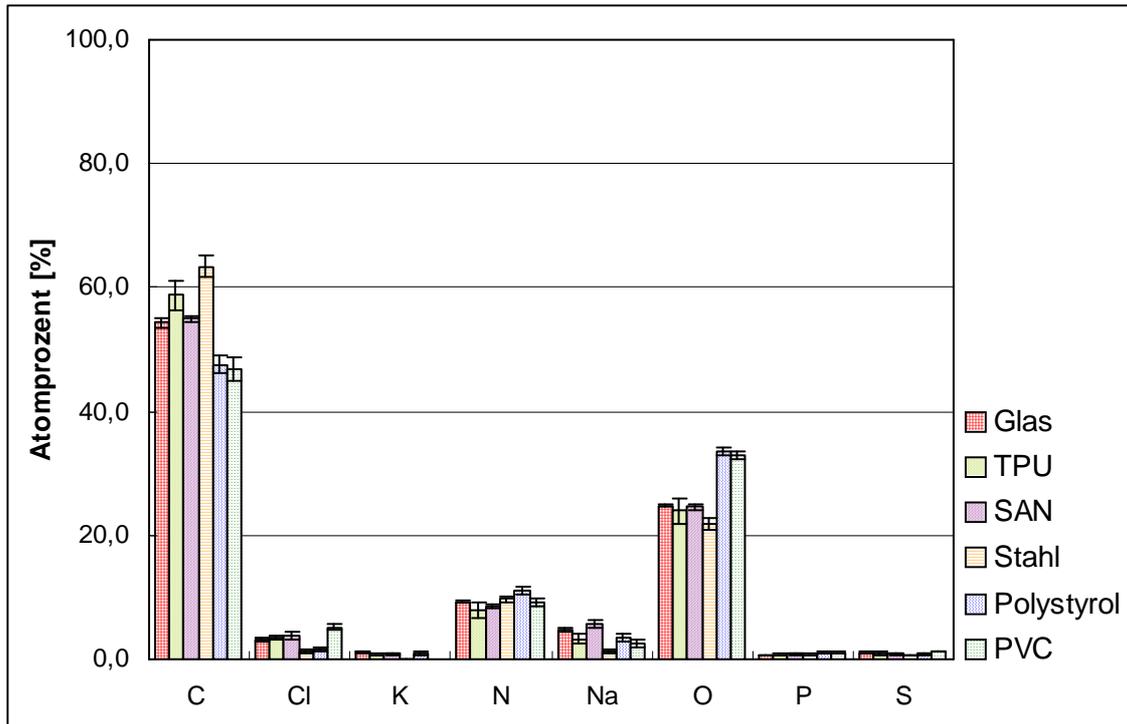


Abbildung 11: Chemische Elementanalyse mittels XPS für urinbeschichtete Materialoberflächen: Die gereinigten Materialien wurden für 24 Stunden in Urin bei 37 °C inkubiert. Die XPS-Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Stellen für eine Analysefläche von ca. 500 µm² durchgeführt. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung dieser drei Messstellen wider und beschreiben damit die laterale Heterogenität der Probe.

Oberflächen detektiert worden (Abbildung 11). Während für die unbehandelten Materialien die Konzentrationen an Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff sehr verschieden waren, kann nun eine Angleichung der Anteile für die einzelnen Elemente auf den verschiedenen Oberflächen beobachtet werden. Schwankten die Kohlenstoffanteile für die unbehandelten Materialien noch zwischen 12 At-% und 94 At-%, liegen sie nun im Bereich zwischen 47 At-% und 63 At-%. Die Sauerstoffkonzentrationen liegen für unbehandelte Oberflächen zwischen 22 At-% und 34 At-% und damit im Vergleich zum vorherigen Bereich von 1 At-% bis 58 At-% enger beieinander. Die Stickstoffkonzentrationen sind für alle Materialien angestiegen und liegen zwischen 8 und 14 At-%. Dies lässt auf die Anwesenheit von stickstoffhaltigen Stoffen aus dem Urin, wie Harnstoff oder Proteine, schließen. Auch die anorganischen Elemente Kalium, Natrium, Chlor, Phosphor und Schwefel stammen möglicherweise von Salzen aus dem Urin.

Die Konzentrationen der oben erwähnten materialspezifischen Elemente wie Chlor für PVC, Silizium für Glas und Eisen für Stahl haben sich deutlich verringert. Der Chloranteil

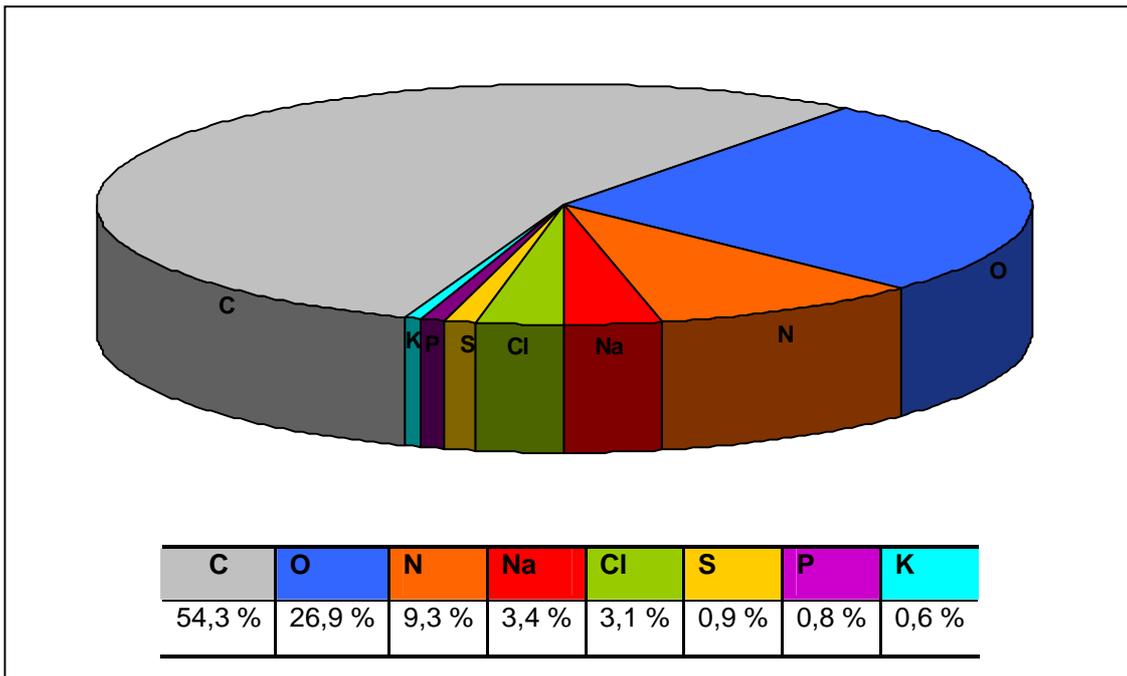


Abbildung 12: Durchschnittliche chemische Zusammensetzung eines Urinfilms mittels XPS: Für die urinbeschichteten Materialien Glas, TPU, SAN, Stahl, Polystyrol und PVC wurden die Prozente der einzelnen Elemente gemittelt.

auf PVC verringerte sich von 22 At-% auf 5 At-% und ist nun ähnlich den Chloranteilen auf den anderen urinbeschichteten Oberflächen. Der Anteil von Silizium reduzierte sich von 21 At-% auf 1 At-%, der Eisenanteil der Stahloberfläche von 7 At-% auf < 1 At-%.

Die Zusammensetzung hinsichtlich der chemischen Elemente der urinbeschichteten Oberflächen ist für alle Materialien ähnlich. Durch die Berechnung der Mittelwerte der einzelnen Elementkonzentrationen ergibt sich die durchschnittliche Zusammensetzung für einen Urinfilm (Abbildung 12). Die drei Hauptbestandteile Kohlenstoff (54,3 %), Sauerstoff (26,9 %) und Stickstoff (9,3 %) machen zusammen über 90 % des Urinfilms aus. Die Elemente Natrium, Chlor, Schwefel, Phosphor und Kalium sind nur in geringer Konzentration vorhanden. Im Vergleich dieser Ergebnisse mit der direkten Untersuchung von Urin als Referenz können große Übereinstimmungen zur durchschnittlichen Zusammensetzung eines Urinfilms beobachtet werden. Für reinen Urin liegt der Kohlenstoffanteil bei 51,0 %, der Sauerstoffanteil bei 27,6 % und der Stickstoffanteil bei 13,6 %.

Die Übereinstimmungen mit den Referenzmessungen von HSA und Harnstoff sind weniger stark. Die Kohlenstoffanteile für HSA bzw. Harnstoff liegen bei 65,5 % bzw. 29,0 %, die Sauerstoffanteile bei 16,8 % bzw. 23,3 % und die Stickstoffanteile bei 16,5 % bzw. 47,7 %.

Diskussion

Die Anwesenheit von zuvor nicht detektierten Elementen wie Kalium, Natrium, Chlor, Phosphor und Schwefel ist ein Hinweis darauf, dass der Urinfilm für die chemische Zusammensetzung der beschichteten Oberflächen verantwortlich ist. In der Literatur sind ähnliche Ergebnisse dokumentiert. Reid et al. detektierten auf Urinkathetern nach einer Implantation signifikante Veränderungen für Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Natrium, Chlor, Kalzium und Phosphor im Vergleich zu den nichtimplantierten Kontrolloberflächen. Die Elemente Stickstoff, Kalzium und Phosphor wurden dabei auf den Kontrolloberflächen nicht detektiert und deshalb als kennzeichnend für den Urinfilm betrachtet. [61]. Die Folgerung, dass sich die Urinfilme auf unterschiedlichen Materialien nicht grundsätzlich voneinander unterscheiden wurde auch von Tieszer et al. gezogen, nachdem Urinfilme auf verschiedenen Urinkathetern mittels XPS untersucht wurden [91]. Unterschiede in der Zusammensetzung des Urinfilms wurden in der Literatur zwischen Morgenurin und Nachmittagsurin oder durch die Verwendung des Urins von verschiedenen Patienten beobachtet [62;91]. In dieser Arbeit wurde durch die Verwendung von Sammelurinproben der Einfluss dieser Aspekte ausgeschlossen um eine allgemeine Charakterisierung des Urinfilms zu ermöglichen.

Die Reduzierung der Prozente von materialspezifischen, chemischen Elementen und das Angleichen der Niveaus für die Hauptbestandteile Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff weisen auf einen geschlossenen Urinfilm mit einer Schichtdicke > 10 nm hin. Diese Annahme wird durch die Tatsache begründet, dass nur die erzeugten Photoelektronen aus den oberen 10 nm der Probe austreten und zur Messung beitragen können. Die Schwankungen der Elementanteile zwischen den verschiedenen Materialien werden dabei nicht auf eine unvollständige Bedeckung, sondern auf die Heterogenität des Urinfilms zurückgeführt. Denn bei näherer Betrachtung der Veränderungen durch den Urinfilm wird deutlich, dass kein Zusammenhang zwischen den Anteilen der chemischen Elemente von unbehandelten Materialien und urinbeschichteten Materialien besteht. Insbesondere stehen niedrige Anteile eines Elements auf der unbehandelten Oberfläche nicht im Zusammenhang mit niedrigen Anteilen dieses Elements auf der urinbeschichteten Oberfläche. Diese Ergebnisse entsprechen damit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen hinsichtlich einer Schichtdicke von > 10 nm und einer kompletten Bedeckung der Materialoberfläche durch einen Urinfilm [54;62;63].

Dufrêne et al. entwickelten ein Modell, mit dessen Hilfe aus Ergebnissen von XPS-Untersuchungen Gewichtsprozente für vier bestimmte Stoffgruppen auf der Oberfläche

errechnet werden können [92;93]. In dieser Studie wurden Vermutungen hinsichtlich auf einer Oberfläche vorhandener Stoffgruppen, sowie deren chemische Zusammensetzung und Bindungsumgebung angestellt. Durch das Aufstellen und Lösen zweier unabhängiger mathematischer Gleichungssysteme konnten dann die prozentualen Anteile der Stoffgruppen berechnet werden. Bei der Anwendung dieses Modells auf die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse für Urinfilm wurden verschiedene Vermutungen bezüglich der vorhandenen Stoffgruppen verwendet. Neben den von Dufrêne gewählten Stoffgruppen, wurden eigene Vermutungen wie HSA, Harnstoff und Kreatinin geprüft. Es konnten jedoch keine zwei unabhängigen Gleichungssysteme aufgestellt werden, deren Lösungen realistisch für die Zusammensetzung des Urinfilms ergaben. Dies führt weiter zu der Annahme, dass ein Urinfilm aus mehr als vier Hauptstoffgruppen besteht und deshalb das Modell nicht anwendbar ist.

Im Vergleich der durchschnittlichen Zusammensetzung des Urinfilms mit reinem Urin, HSA oder Harnstoff wird deutlich, dass es eine große Übereinstimmung in den Anteilen der Hauptbestandteile Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff gibt. Die Hypothese einer durchgängigen Materialbedeckung durch den adsorbierten Urinfilm wird damit erneut gestärkt. Der Vergleich der Elementanteile für Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff im Urinfilm mit den Referenzen HSA und Harnstoff zeigt eine geringere Übereinstimmung. Der Kohlenstoffanteil von 54,3 % im Urinfilm liegt zwischen den Werten von 65,5 % für HSA und 29,0 % für Harnstoff. Für Stickstoff liegt der Wert des Urinfilms unter den Anteilen in den Referenzen, der Sauerstoffanteil ist dagegen im Urinfilm höher als in HSA oder Harnstoff. Dies führt zu der Annahme, dass im Urinfilm weder HSA noch Harnstoff in einem besonders hohen Anteil im Vergleich zu Urin vorhanden sind.

3.1.2 Analyse zweikomponentiger Proteinfilme und des Urinfilms mittels TOF-SIMS und der Hauptkomponentenanalyse

Die Identifizierung einzelner Proteine in einem Urinfilm ist sehr wichtig, da Bakterien manche Proteine als spezifische Bindungsstelle erkennen und nutzen können, um an Oberflächen anzuhaften [89;94]. Die Massenspektrometrie TOF-SIMS ist in Kombination mit einer Hauptkomponentenanalyse der erhobenen Daten eine sehr empfindliche Methode zur Analyse von Proteinen direkt auf einer Oberfläche.

Zur Etablierung der Methode wurden in einem ersten Ansatz ein Proteingemisch von BSA und humanem Fibronectin in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen auf einer Oberfläche adsorbiert und untersucht (Tabelle 7). Mit BSA und Fibronectin wurden hinsichtlich des Ursprung und des Molekulargewichts (67 kDa und 220 kDa) zwei sehr unterschiedliche Proteine gewählt. Sie sollten dadurch gut voneinander unterscheidbar sein. Für jedes entstandene Messspektrum wurde eine Nominalpeakliste der Massenfragmente erstellt. Die Intensitäten ganzzahliger Massenfragmente wurden dazu inner-

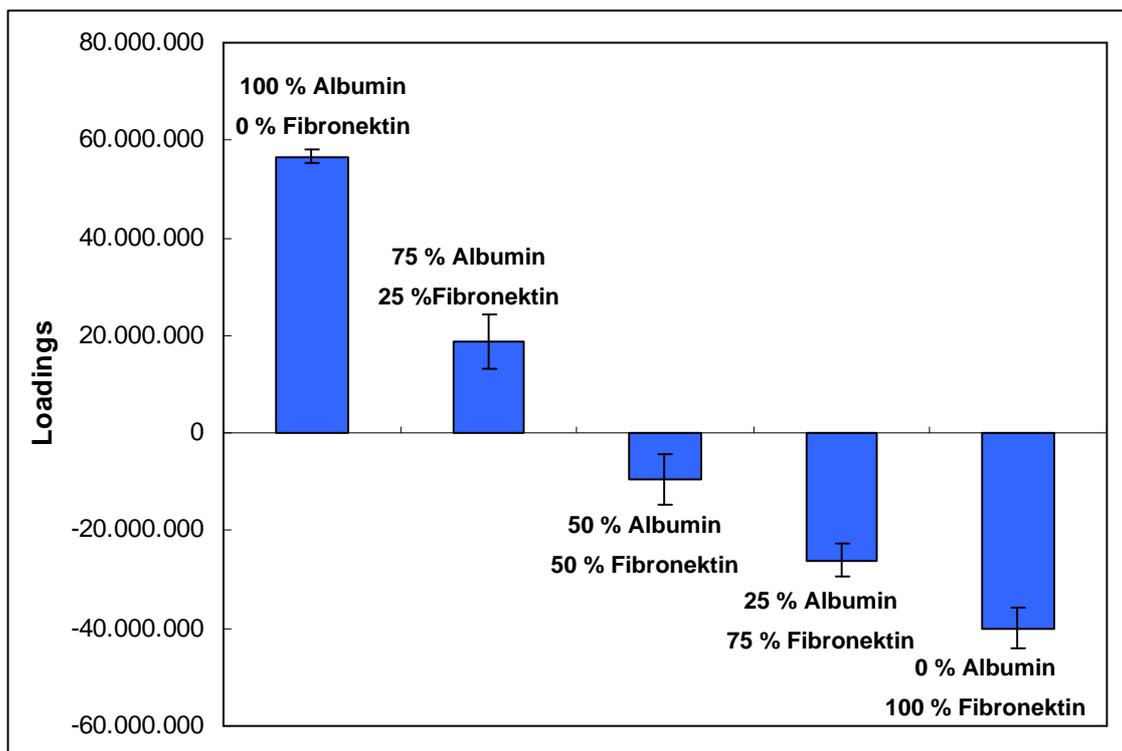


Abbildung 13: Loadings einer Hauptkomponentenanalyse für Proteingemische aus BSA und Fibronectin: Die Glasoberflächen wurden für 24 h bei 37 °C in den Proteinlösungen inkubiert. Es wurden neun Messstellen untersucht, die erstellten Peaklisten für jeweils drei Messstellen gemittelt und damit eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung der Loadings der drei Hauptkomponentenanalysen wider.

halb der Grenzen $\pm 0,45$ u aufaddiert. Aus dieser Liste wurden die von Suzuki et al. als proteinrelevant identifizierten Massenfragmente ausgewählt und eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt (2.2.2.2) [70]. Die Hauptkomponente (Loadings) gibt dabei die Beziehung oder Veränderung zwischen den verschiedenen Proben an. Die Loadings der ersten Hauptkomponente zeigen einen linearen Verlauf (Abbildung 13). Dies entspricht den unterschiedlichen Zusammensetzungen der Testlösungen. Es existiert demnach eine Gruppe von proteinrelevanten Massenfragmenten, die im Zusammenhang zu den linearen Veränderungen zwischen den einzelnen Proben steht. Diese Arbeit zeigt die Möglichkeit zwei verschiedene Proteine auf einer Oberfläche in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen mittels TOF-SIMS und einer Hauptkomponentenanalyse voneinander zu unterscheiden. Die Anwendungsmöglichkeit dieser Methode auf einen heterogenen Urinfilmm wurde getestet. Dazu wurde untersucht, inwieweit das Protein Fibronectin in der heterogenen Umgebung des Urinfilms detektiert werden kann (Tabelle 8). Dazu wurde Fibronectin in steigender Konzentration einer Urinprobe zugesetzt und das Gemisch auf Glas adsorbiert. Im Gegensatz zu der Analyse des zweikomponentigen

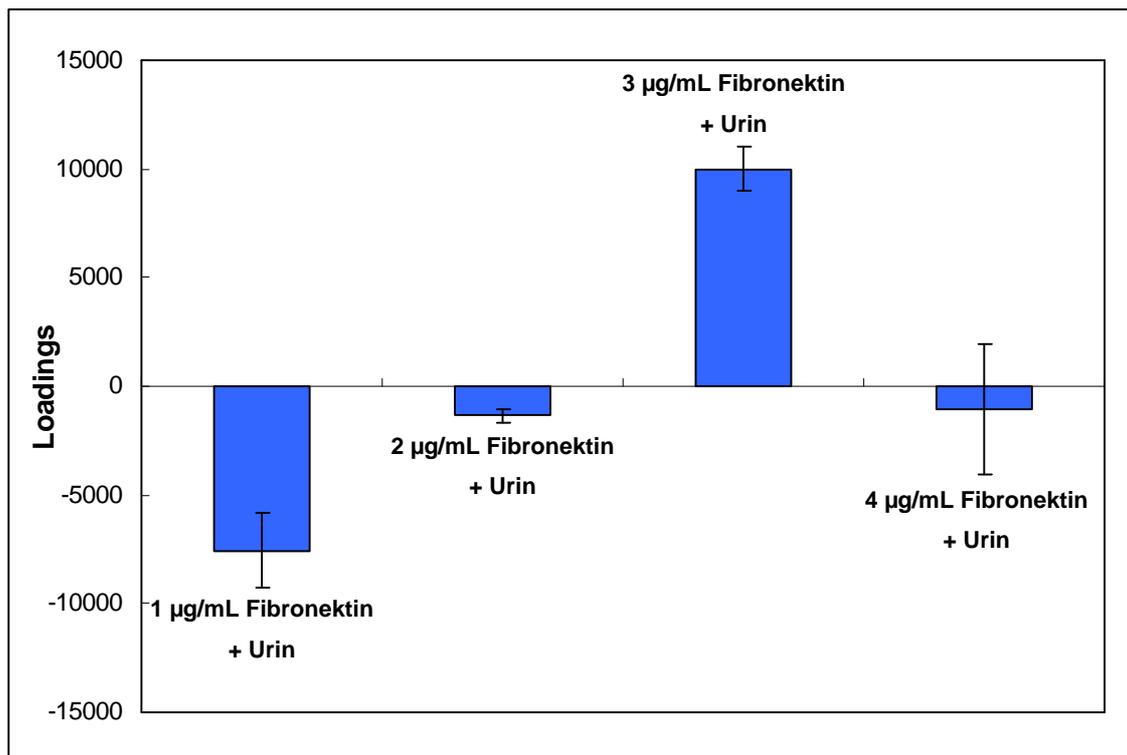


Abbildung 14: Loadings einer Hauptkomponentenanalyse für Testlösungen aus Urin und Fibronectin: Die Glasoberflächen wurden für 24 h bei 37 °C in den Urin-Proteinlösungen inkubiert. Es wurden neun Messstellen untersucht, die erstellten Peaklisten für jeweils drei Messstellen gemittelt und damit eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung der Loadings der drei Hauptkomponentenanalysen wider.

Proteingemischs konnte hier das zugemischte Protein Fibronectin nicht vom Urinfilmen unterschieden werden (Abbildung 14). Die Loadings zeigen kein Verhalten, was in irgendeiner Weise auf die steigende Konzentration von Fibronectin im Gemisch hinweist. Auch die zweite und dritte Hauptkomponenten (nicht dargestellt) zeigen keine Hinweise.

Diskussion

Die Untersuchung des Urinfilms mittels TOF-SIMS und die Auswertung der Daten mit einer Hauptkomponentenanalyse wurde, so wie in dieser Arbeit beschrieben, erstmals durchgeführt. Compère et al. setzten TOF-SIMS zur Untersuchung von marinen Conditioningfilmen ein [24]. Die Auswertung erfolgte dabei jedoch nicht mittels einer Hauptkomponentenanalyse, sondern es wurden die positiven Massenfragmente NH_4^+ , $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}^+$, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}^+$, $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$, $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}^+$ und $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}^+$ sowie die negativen Massenfragmente NH^- , CN^- , CNH^- , CNO^- und CNOH^- als Indikatoren für die Anwesenheit von Proteinen verwendet [24;95;96]. Eine Identifizierung einzelner Proteine in einem heterogenen Gemisch war mit dieser Methode nicht möglich.

Durch die Verwendung einer Hauptkomponentenanalyse konnten in vorherigen Studien Plasmaproteine eindeutig voneinander unterschieden werden. Dazu adsorbierten die Proteine aus einkomponentigen Lösungen und wurden mittels TOF-SIMS untersucht. Durch einen Vergleich mit den zuvor aufgenommenen Spektren der Plasmaproteine konnten TOF-SIMS-Untersuchungen von Blutplasma und Blutserum mit einer Hauptkomponentenanalyse qualitativ beurteilt werden. Eine Aussage bezüglich der exakten Proteinzusammensetzung von Blutplasma oder Blutserum konnte jedoch nicht getroffen werden [97;98]. Bernsmann et al. untersuchten die auf Dentalmaterial adsorbierten Proteine BSA, humane Amylase und Lysozym. Sie konnten diese Proteine mit der Unterstützung einer Hauptkomponentenanalyse eindeutig voneinander unterscheiden [99]. In den genannten Untersuchungen wurden die Proteine aus ein- oder zweikomponentigen Lösungen auf einer Substratoberfläche adsorbiert und durch die Unterstützung einer Hauptkomponentenanalyse voneinander unterschieden. Die Unterscheidung von Proteinen in einer heterogenen Körperflüssigkeit, wie beispielsweise Blutplasma konnte nicht gezeigt werden. Die Massenfragmente eines einzelnen Proteins unterscheiden sich demnach nicht ausreichend stark von den Massenfragmenten anderer Proteine und Inhaltsstoffe solch einer biologischen Probe um als Hauptkomponenten analysiert werden zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels TOF-SIMS und einer anschließenden Hauptkomponentenanalyse zwei Proteine, welche gleichzeitig auf eine Oberfläche adsorbieren, voneinander unterschieden werden. Die lineare Änderung der Zusammensetzung der Proteinlösung wurde anhand der Loadings sichtbar. Die Detektion eines zugesetzten Proteins im Urinfilm war mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Die Charakterisierung heterogener Gemische wie beispielsweise Urin, Blutplasma oder Blutserum hinsichtlich ihrer exakten Proteinzusammensetzung ist mit dem heutigen Stand der Entwicklung sehr schwierig. Diese Ergebnisse weisen außerdem erneut auf die Komplexität der Zusammensetzung eines Urinfilms hin und bestätigen damit die vorhergehenden Beobachtungen in den XPS-Untersuchungen.

3.1.3 Proteindetektion mittels AFM-unterstützter Immunogoldmarkierung

Die Rasterkraftmikroskopie liefert auf einer Größenskala zwischen 100 μm bis hin zu molekularer Auflösung Informationen hinsichtlich Topographie und Elastizität einer Oberfläche. Sie ist in der Lage einzelne Biomoleküle sowohl an Luft als auch in Flüssigkeit hochaufgelöst abzubilden. Die Unterscheidung verschiedener Biomoleküle wie beispielsweise Proteine anhand von AFM-Aufnahmen ist jedoch nur bedingt möglich. Um eine Detektion zu ermöglichen wurden Proteine mit einer zweistufigen Antikörperfärbung behandelt. Dabei bindet ein primärer Antikörper auf der ersten Stufe an das gewünschte Protein, welches sich auf der Probenoberfläche befindet. Der sekundäre Antikörper bindet auf der zweiten Stufe an den ersten Antikörper und ist außerdem mit einem Goldpartikel ($\text{\O}10\text{ nm}$) konjugiert. Mittels AFM kann dieses Goldkonjugat abgebildet werden und es wird dadurch eine spezifische Proteindetektion auf der Oberfläche möglich (2.2.5.2.). Durch die Verwendung von zwei Antikörpern kann das System leicht auf verschiedene Proteine übertragen werden, da nur der primäre Antikörper ausgetauscht werden muss. Zudem kann es zu einer Signalverstärkung kommen, indem an einen primären Antikörper mehrere sekundäre Antikörper anbinden. Diese Art der Detektion von Proteinen mittels Immunogold wird häufig für die Elektronenmikroskopie eingesetzt [100]. Die Methode findet jedoch auch in Verbindung mit dem AFM zahlreiche Anwendungsbereiche wie zum Beispiel die Unterscheidung zwischen zwei Arten des marinen Schwamms *Microciona prolifera* [101]. Für die Beurteilung einer Antikörperfärbung ist es sehr wichtig die Selektivität der Antikörper zu überprüfen. Als Beispiel ist im Folgenden die Überprüfung der Selektivität des verwendeten Antikörpers gegen HSA dargestellt. Nach der Adsorption eines Proteingemischs aus Lysozym, Transferrin, humanen Antikörpern und HSA auf eine Glasoberfläche wird das Immunogoldprotokoll angewendet (Tabelle 12). Nach der Durchführung ist die Oberfläche dicht belegt mit kleinen Partikeln, die Goldkonjugate des zweiten Antikörpers (Abbildung 15 B). Im Höhenprofil wird dies noch mal bestätigt, die Höhenunterschiede liegen bei 10 nm. Auf einer zweiten Oberfläche wird das Proteingemisch ohne HSA adsorbiert und das Protokoll durchgeführt. Es sind nach der Behandlung nur vereinzelt Goldkonjugate zu erkennen. Die Anbindung des ersten Antikörpers an ein fremdes Antigen ist also sehr selten, was auf eine hohe Selektivität des primären Antikörpers zurückzuführen ist (Abbildung 15 C). Als Referenz wird eine AFM-Aufnahme eines adsorbierten Proteinfilms aus den vier oben genannten Proteinen ohne Immunogold verwendet (Abbildung 15 A).

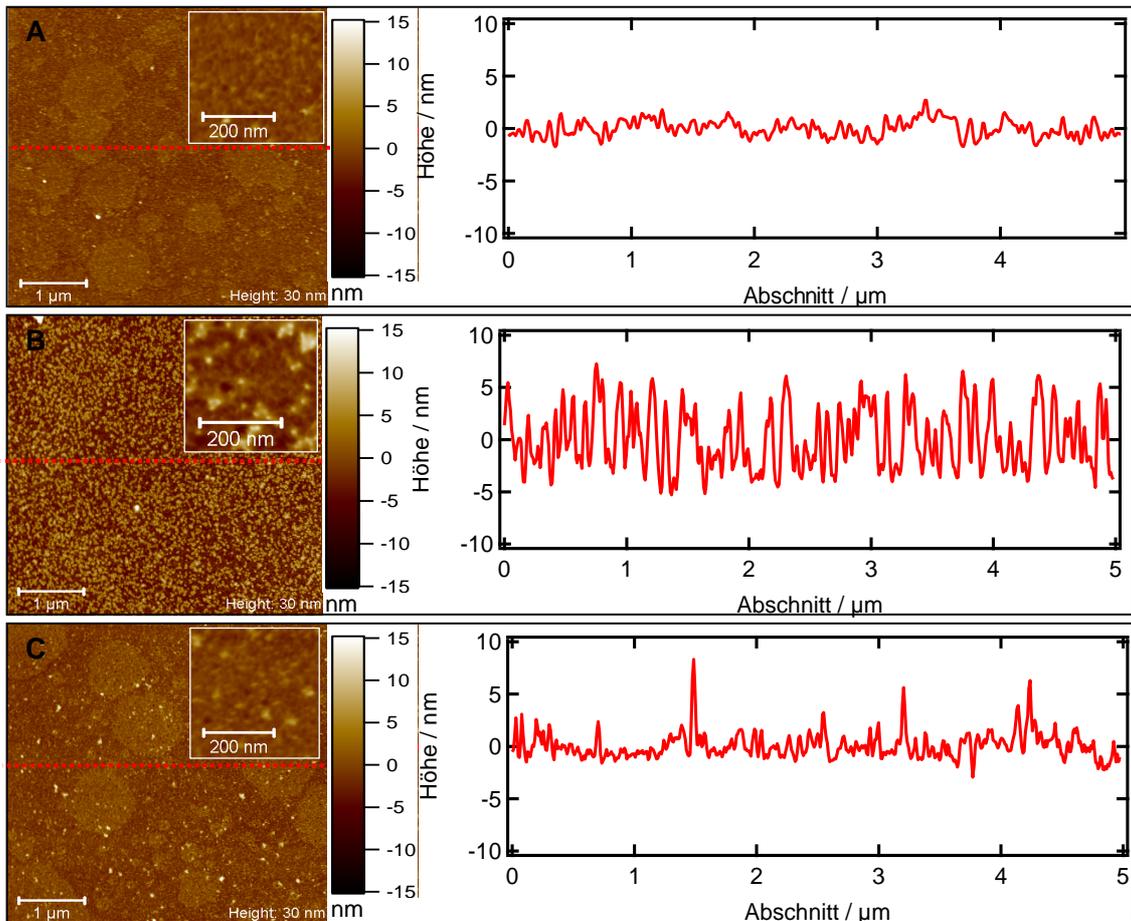


Abbildung 15: AFM-Aufnahmen und Höhenprofile zur Überprüfung der Selektivität der Immunogoldmarkierung von HSA. Inkubation der Proteinlösung mit der Glasoberfläche zwei Stunden bei Raumtemperatur. Immunogold: 1. Anti-HSA (Rabbit) 2. Anti-Rabbit (Goldkonjugat10 nm)
 A: Adsorbierter Proteinfilm aus Transferrin, Lysozym, IgG und HSA ohne Immunogold
 B: Adsorbierter Proteinfilm aus Transferrin, Lysozym, IgG und HSA mit Immunogold
 C: Adsorbierter Proteinfilm aus Transferrin, Lysozym, IgG mit Immunogold

Die Topographie ist sehr flach, die Höhenunterschiede betragen 3-5 nm. Der Anteil an unspezifischen Bindungsereignissen ist für jedes Protokoll einer Antikörperfärbung unterschiedlich und muss für die Auswertung solcher Messergebnisse berücksichtigt werden. Zudem muss der Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung groß genug sein, um eine Aussage hinsichtlich der Anwesenheit eines Antigens treffen zu können [102]. Die Verdünnung in welcher ein Antikörper verwendet wird, beeinflusst das Verhältnis zwischen spezifischer und unspezifischer Bindungsereignisse zusätzlich. Deshalb wurden für die verwendeten primären Antikörper Voruntersuchungen durchgeführt, um die optimale Verdünnung zu wählen. Der Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung ist für die verwendeten Protokolle ausreichend.

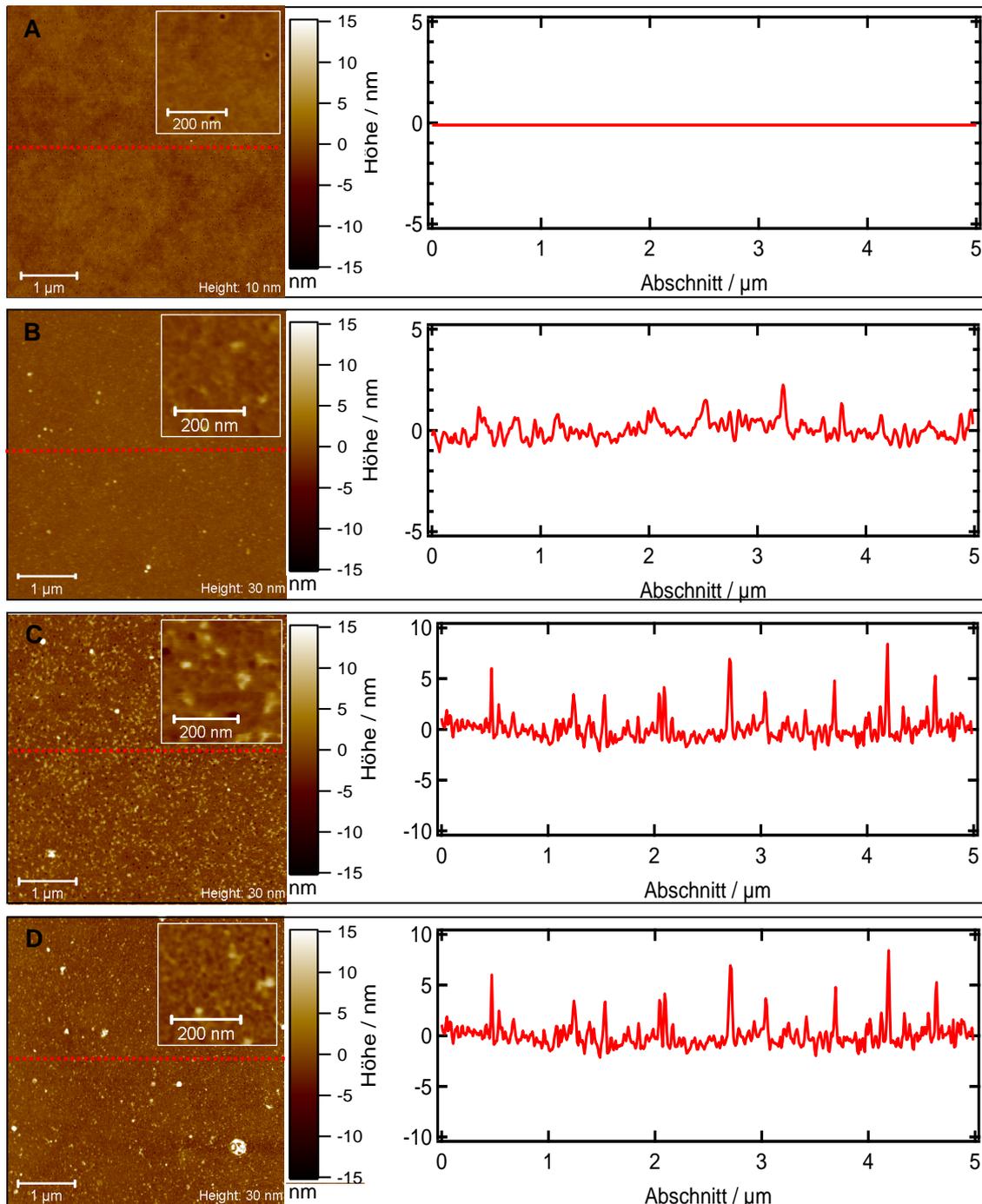


Abbildung 16: AFM-Aufnahmen und Höhenprofile der Immunogoldmarkierungen von HSA und THP im Urinfil Inkubation der Glasoberflächen in Urin für 24 Stunden bei Raumtemperatur
 Immunogold HSA: 1. Anti-HSA (Rabbit) 2. Anti-Rabbit (Goldkonjugat 10 nm)
 Immunogold THP: 1. Anti-THP (Mouse) 2. Anti-Mouse (Goldkonjugat 10 nm)
 A: unbehandeltes, gereinigtes Glas
 B: Glas mit adsorbiertem Urinfil
 C: HSA-Detektion im Urinfil mittels Immunogoldfärbung
 D: THP-Detektion im Urinfil mittels Immunogoldfärbung

Aufgrund dessen wurde Immunogold zur Detektion der beiden Hauptproteine im Urin, HSA und THP, in einem Urinfilm verwendet. Dabei wird der Unterschied zwischen dem unmarkierten Urinfilm und den immunogoldmarkierten Oberflächen im Höhenprofil deutlich (Abbildung 16 B bis D).

Die Goldkonjugate von 10 nm sind sowohl für die HSA-Detektion, als auch für die THP-Detektion sichtbar. Gleichzeitig sind für die HSA-Detektion mehr Goldkonjugate auf der Oberfläche zu erkennen. Die Goldbedeckung liegt für HSA bei 15 % und für THP bei 8 %. Es konnten für beide Proteine keine strukturellen Besonderheiten wie Inselbildungen oder eine charakteristische Anordnung detektiert werden.

Die qualitative Bewertung der AFM-Aufnahmen ist eindeutig, die Goldkonjugate sind klar zu erkennen. Eine quantitative Auswertung hinsichtlich der Konzentration der vorhandenen Proteine ist schwierig. Denn die beiden Immunogoldprotokolle für HSA und THP werden mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt, wobei jeder dieser Antikörper eine andere Bindungswahrscheinlichkeit für sein Antigen besitzt. Die Folge ist, dass eine höhere Bedeckung mit Goldkonjugaten für ein Protein wie beispielsweise für HSA auf Glas im Vergleich zu THP auf Glas, nicht automatisch mit einer höheren Proteinkonzentration auf der Oberfläche gleichgesetzt werden kann. Um das Verhältnis von HSA und THP zueinander auf einer Oberfläche bestimmen zu können, müssen die jeweiligen Affinitäten der Antikörper bestimmt werden. Dies wird standardmäßig mit Proteinlösungen durchgeführt. Die Anbindung der Antikörper kann jedoch für ein adsorbiertes Protein auf einer Oberfläche anders sein. Denn durch die Adsorption können Proteine ihre Konformation ändern und es können dadurch Bindungsstellen zugänglich oder blockiert werden. Somit kann eine Affinitätsbestimmung in Lösung nicht auf Testsysteme mit adsorbierten Proteinen übertragen werden. Eine Affinitätsprüfung der Antikörper für adsorbierte Proteine wurde in 3.1.4 in Verbindung mit Immunofluoreszenz durchgeführt. Ohne diese vorherige Bestimmung der Affinitäten können lediglich gleiche Proteine auf unterschiedlichen Materialien miteinander verglichen werden. Dabei spielt die Rauheit der Materialien eine wichtige Rolle (Abbildung 17). Zur Beurteilung dieses Einflusses wurde die Immunogoldmarkierung von HSA in einem Urinfilm auf TPU angewendet. Dabei ist die Bewertung der Goldbelegung schwierig, da die Goldkonjugate aufgrund der Rauheit der Materialoberfläche nicht mehr eindeutig auszumachen sind. Dies wird vor allem im Höhenprofil deutlich. Für flache Oberflächen wurde die Goldbelegung quantifiziert, indem im Höhenbild ein Grenzwert gewählt wurde, so dass alle Pixel über dieser Grenze durch die Goldkonjugate bedingt waren. Dadurch konnte anhand der Anzahl der

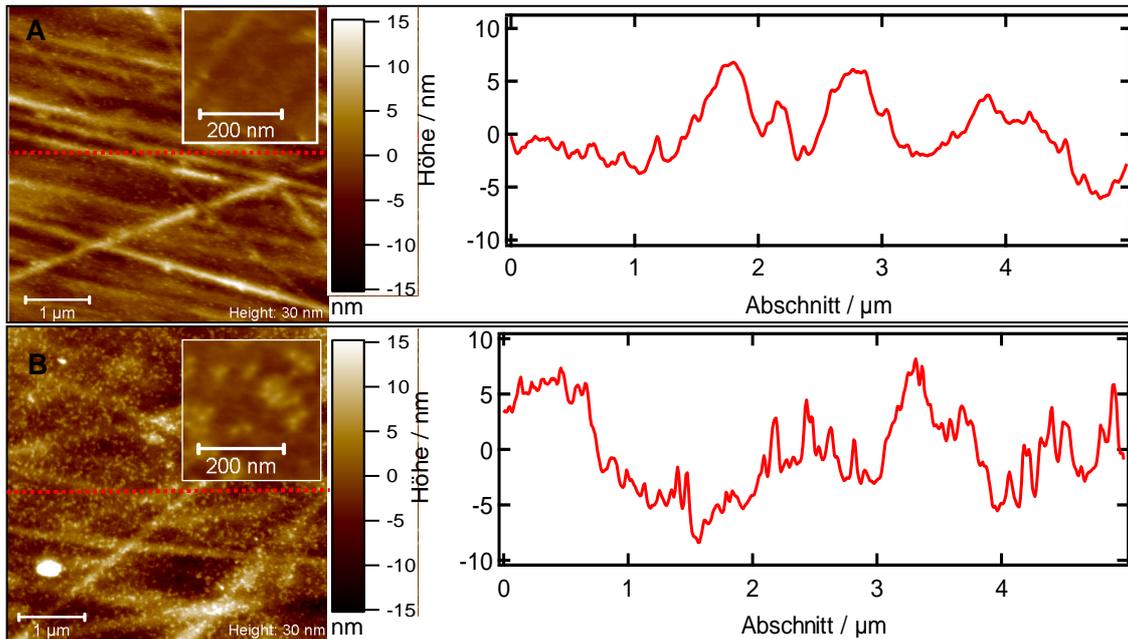


Abbildung 17 AFM-Aufnahmen und Höhenprofile der Immunogoldmarkierungen von HSA im Urinfilmm. Der Urinfilmm wurde durch die Inkubation der TPU-Oberflächen in Urin für 24 Stunden bei Raumtemperatur präpariert.

A: unbehandeltes, gereinigtes TPU

B: HSA-Detektion im Urinfilmm mittels Immunogoldfärbung

Pixel über diesem Schwellenwert eine prozentuale Goldbedeckung der Oberfläche bestimmt werden. Die Verwendung eines solchen Schwellenwertes wird durch die hohe Rauheit der TPU-Oberfläche unmöglich. Die Anwendung der AFM-unterstützten Immunogoldmarkierung wird dadurch auf die Verwendung von flachen Materialoberflächen als Substrat beschränkt.

Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass es mit Hilfe der AFM-unterstützten Immunogoldmarkierung möglich ist, einzelne Proteine in einem Urinfilmm auf Glas zu detektieren. Für die Untersuchungen wurden die beiden häufigsten im Urin vorkommenden Proteine HSA und THP ausgewählt, sie tragen zusammen mit 66 % zum Gesamtproteininhalt im Urin bei. Die untersuchten Glasoberflächen für die Detektion von HSA im Urinfilmm waren zu ~15 % mit Goldpartikeln belegt (Abbildung 16). Für die HSA-Detektion in einem Proteinfilm auf Glas wurden ~50 % Goldbelegung gemessen (Abbildung 15 B). Eine Erklärung für die geringere Belegungsdichte im Urinfilmm ist eine geringere Proteinkonzentration von HSA und THP auf der Oberfläche. Dies könnte durch einen Proteinanteil von ~0,1 % bezogen auf die Gesamttrockenmasse im Urin bedingt sein. Für die

vierkomponentige Proteinlösung lag der Anteil an HSA bei ~0,5% bezogen auf die Gesamttrockenmasse. Die geringe Goldbelegung für die Detektion der beiden höchstkonzentrierten Proteine im Urin führen zu dem Schluss, dass die Detektion geringer konzentrierter Proteine aus Urin wenig vielversprechend ist.

Der eigentliche Vorteil einer indirekten Antikörperfärbung liegt darin, dass es aufgrund der Anbindung mehrerer sekundärer Antikörper an einen primären Antikörper zu einer Signalverstärkung kommt. Für goldkonjugierte Antikörper kann dieser Vorteil nicht optimal genutzt werden. Wie auch in der Literatur beschrieben behindern sich die Goldkonjugate der sekundären Antikörper gegenseitig bei einer Anbindung an den selben primären Antikörper [103].

Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Immunogoldmarkierung können die Proteine HSA und THP in einem Urinfilm detektiert werden. Ein Vergleich der Proteinkonzentrationen auf verschiedenen Materialoberflächen ist jedoch aufgrund verschiedener Affinitäten der Antikörper und bedingt durch die Rauheit der untersuchten Substrate nicht möglich.

3.1.4 Quantitative Proteindetektion auf Oberflächen durch die Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und der Quarzkristall-Mikrowaage

Zur Detektion zuvor ausgewählter Proteine auf Materialoberflächen können fluoreszenzkonjugierte Detektionsproteine wie Concanavalin A oder eine zweistufige Antikörperfärbung mit einem fluoreszenzkonjugierten, sekundären Antikörper angewendet werden. Die Unabhängigkeit der Methode von der Oberflächenrauheit, sowie eine größere Analysefläche bringen einen entscheidenden Vorteil gegenüber der AFM-unterstützten Immungoldmarkierung. Mit Hilfe der Quarzkristall-Mikrowaage wurden zudem die Affinitäten der Antikörper für adsorbierte Proteine ermittelt. Dadurch konnten die Konzentrationen der Proteine quantitativ auf den Materialoberflächen bestimmt und miteinander verglichen werden.

Zur Fluoreszenzdetektion von HSA und THP wurden für jedes Protein und Testmaterial zwei unabhängige Proben präpariert und an vier verschiedenen Stellen die Fluoreszenzintensität aufgenommen. Es wurde außerdem die Eigenfluoreszenz jedes Materials und die unspezifische Bindung durch das Mitführen einer Negativprobe ermittelt (2.2.3.2). Durch Subtraktion dieser Intensitäten von den Werten der urinbeschichteten Materialproben wurden die Messergebnisse korrigiert (Tabelle 14). Die Rauheit einer Materialoberfläche beeinflussen die Fluoreszenzaufnahmen nicht (Abbildung 18). Für die Charakterisierung des Urinfilms ist die quantitative Proteinzusammensetzung auf einer Materialoberfläche von besonderem Interesse. Mittels QCM war es möglich die tatsächlich adsorbierte Masse eines Proteins pro Fläche zu bestimmen und durch die anschließende Fluoreszenzfärbung konnte ein Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Fluoreszenzintensität hergestellt werden (2.2.4.2). So wurden Kalibriergeraden für die Proteine HSA und THP erstellt (Abbildung 19). Für beide Proteine konnte ein lineares Verhalten zwischen adsorbierter Masse und der Fluoreszenzintensität festgestellt

Tabelle 14: Fluoreszenzintensitäten für HSA und THP nach einer zweistufigen Antikörperfärbung Intensitäten normiert auf 1 Sekunde Belichtungszeit und korrigiert um die Eigenfluoreszenz und die Intensität der unspezifischen Bindung

	Glas	TPU	SAN	Stahl	PS	PVC
HSA						
Fluoreszenzintensität	3885,6	1156,3	663,5	2695,5	1280,3	1365,0
Standardfehler	104,5	413,7	296,1	155,3	123,6	50,9
THP						
Fluoreszenzintensität	712,4	3488,3	1349,3	4313,3	2092,7	16583,2
Standardfehler	88,1	479,3	241,7	448,8	126,7	223,5

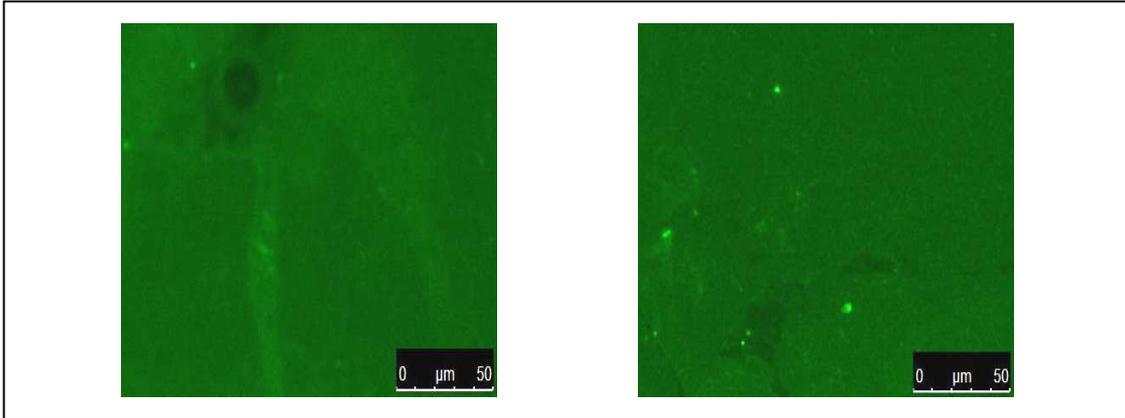


Abbildung 18: Bildausschnitt der Fluoreszenzaufnahmen der HSA-Detektion mittels Immunofluoreszenz im Urinfil Inkubation der Oberflächen in Urin für 24 Stunden bei 37 °C
 A: Urinbeschichtetes thermoplastisches Polyurethan mit fluoreszenzgefärbtem HSA
 B: Urinbeschichtetes Glas mit fluoreszenzgefärbtem HSA.

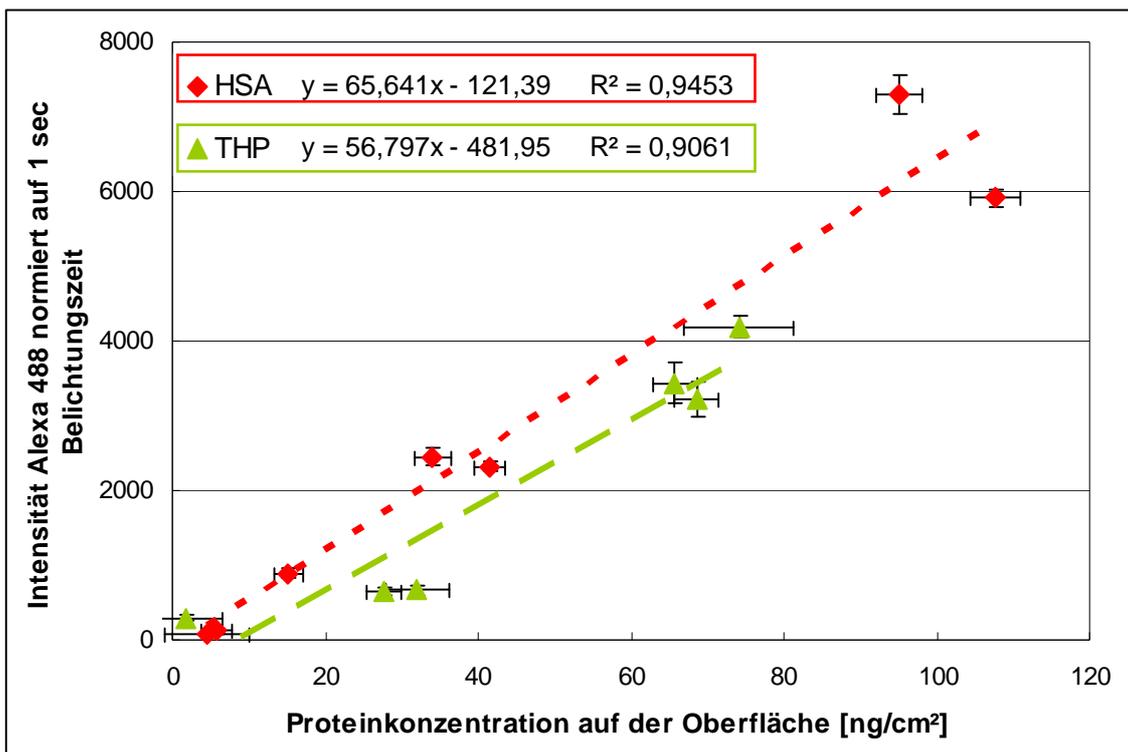


Abbildung 19: Kalibriergeraden für die zweistufigen Antikörperfärbungen von HSA und THP mit Immunofluoreszenz. HSA und THP wurden aus verschiedenen konzentrierten Proteinlösungen auf QCM-Messquarze adsorbiert und die tatsächlich adsorbierte Proteinmenge bestimmt. Die Messquarze wurden fluoreszenzmarkiert. Für jeden Messquarz wurde an 4 Stellen die Intensität bestimmt, auf 1 Sekunde Belichtungszeit normiert und hinsichtlich Eigenfluoreszenz und unspezifischer Bindungen korrigiert. Die Fehlerbalken in Y-Richtung spiegeln den Standardfehler vom Mittelwert der Intensitäten wieder, die Fehlerbalken in X-Richtung spiegeln die Schwankungen während der QCM-Messung wider.

werden. Mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,9453$ für HSA und $R^2=0,9061$ für THP sind beide Kalibriergeraden ausreichend genau, um für die Berechnung der Proteinkonzentrationen auf den Materialoberflächen verwendet werden zu können. Somit konnten nun die Fluoreszenzaufnahmen der verschiedenen Materialoberflächen mit Hilfe der in Abbildung 19 angegebenen Formeln quantitativ ausgewertet werden.

Das Verhältnis von HSA und THP zueinander ist in den Urinfilmen auf verschiedenen Materialoberflächen unterschiedlich (Abbildung 20). Auf fünf von insgesamt sechs untersuchten Materialoberflächen ist das speziell im Urin vorkommende THP in einer höheren Konzentration adsorbiert als das Plasmaprotein HSA. Die THP-Konzentrationen liegen dabei zwischen 21,5 - 300,5 ng/cm². PVC weist mit 300,5 ng/cm² die mit Abstand höchste Konzentration für THP auf. Für die Materialien TPU, SAN, Stahl und Polystyrol adsorbierte ca. das 2 – 3 fache an THP im Vergleich zu HSA, für PVC war es sogar das 13fache. Die HSA-Konzentrationen betragen für die verschiedenen Materialien zwischen

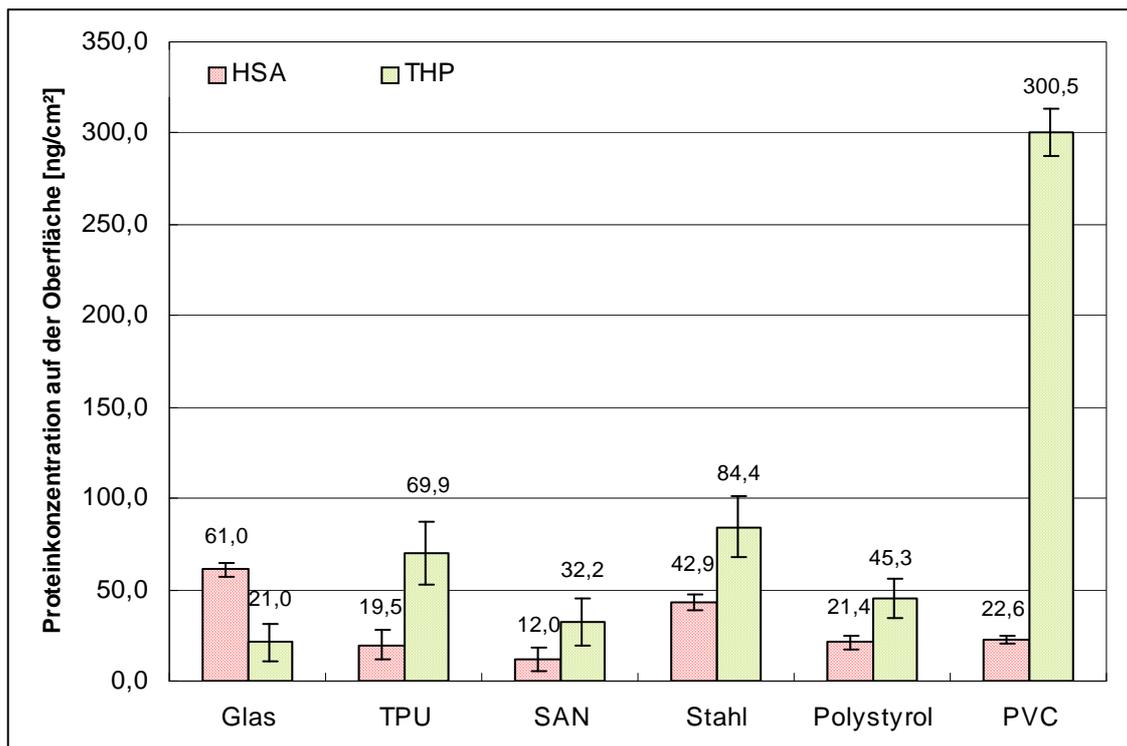


Abbildung 20: Proteinkonzentrationen von HSA und THP auf verschiedenen Materialoberflächen detektiert mit Immunofluoreszenz und QCM-Kalibrierung. Inkubation der Materialoberflächen in Urin für 24 Stunden bei 37 °C. Für je des Material und jedes Protein wurden zwei unabhängige Proben präpariert und vier Fluoreszenzbilder aufgenommen. Durch eine Kalibrierung mit Hilfe von QCM-Messungen konnten die Intensitäten in Proteinkonzentrationen [ng/cm²] umgerechnet werden. Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler vom Mittelwert dieser 8 Messungen wider und damit die laterale Heterogenität der Probe.

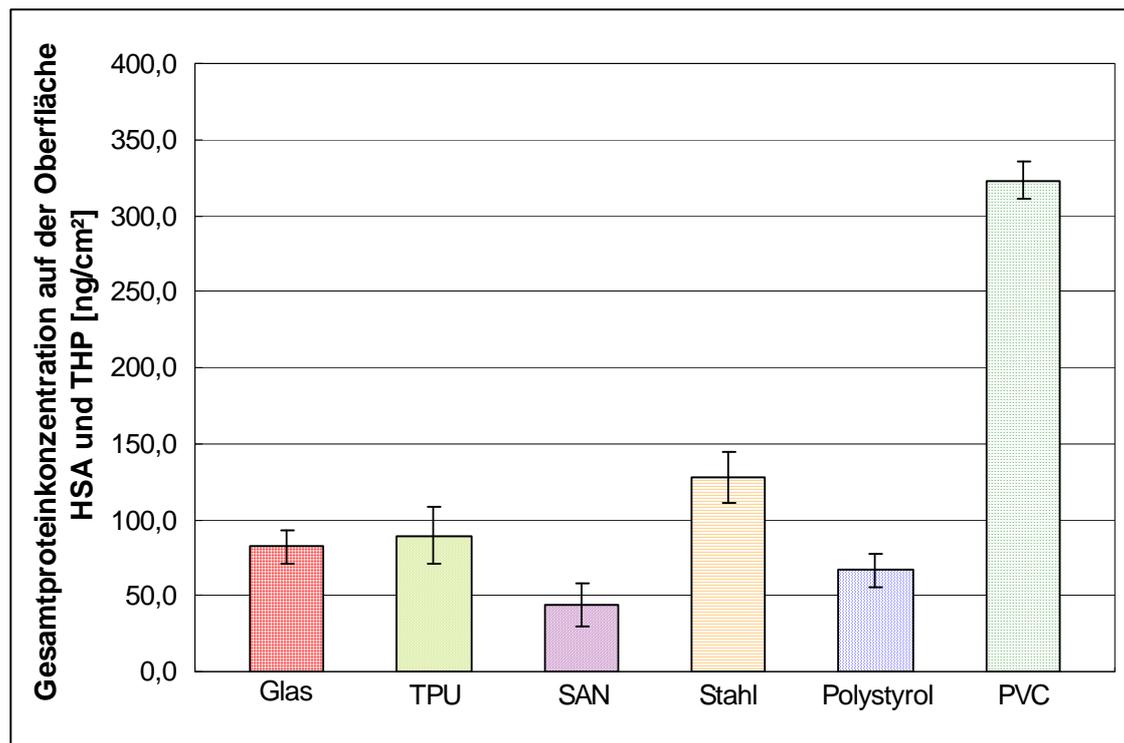


Abbildung 21: Gesamtproteinkonzentrationen auf verschiedenen Materialoberflächen in [ng/cm²] geschätzt als Summe der Konzentrationen an HSA und THP. Inkubation der Materialoberflächen in Urin für 24 Stunden bei 37 °C. Für jedes Material und jedes Protein wurden zwei unabhängige Proben präpariert, vier Fluoreszenzbilder aufgenommen und der Standardfehler vom Mittelwert dieser 8 Messungen bestimmt. Durch eine Kalibrierung mit Hilfe von QCM-Messungen konnten die Intensitäten in Proteinkonzentrationen [ng/cm²] umgerechnet werden. Die Proteinkonzentrationen von HSA und THP wurden addiert. Die Fehlerbalken kommen durch die Wurzel der addierten Quadrate der Standardfehler zustande.

12,0 – 61,0 ng/cm². Für Glas ist das Proteinverhältnis umgekehrt mit einer 3fach höheren HSA-Konzentration im Vergleich zu THP. Die vier untersuchten Polymere TPU, SAN, Polystyrol und PVC weisen die geringsten HSA-Konzentrationen auf.

HSA und THP sind die beiden häufigsten Proteine im Urin. So lässt sich durch die Addition der Proteinkonzentrationen die Gesamtproteinmenge im Urinfilm ungefähr abschätzen (Abbildung 21). Mit ca. 44 ng/cm² ist SAN das proteinresistenteste Material, gefolgt von Polystyrol mit 66 ng/cm², Glas und TPU mit 82 bzw. 89 ng/cm² und Stahl mit 127 ng/cm². Durch die hohe THP-Adsorption hat PVC mit 323 ng/cm² auch die höchste Gesamtproteinkonzentration. Zur Detektion von Glykoproteinen in den Urinfilmen auf Glas, TPU und SAN wurde das Detektionsprotein Concanavalin A angewendet (Abbildung 22). Die Vorgehensweise entspricht der oben beschriebenen Präparation für die zweistufige Antikörperfärbung. Auch mit dieser Detektionsmethode werden Unterschiede der Glykoproteinkonzentration auf unterschiedlichen Materialien gemessen.

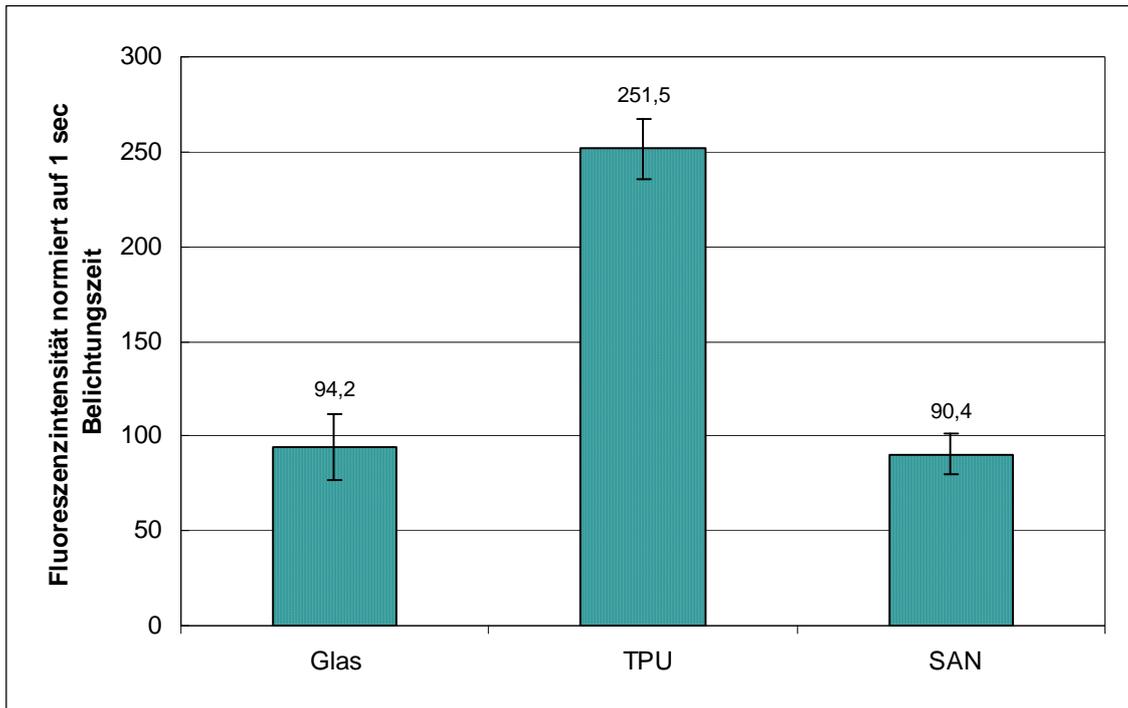


Abbildung 22: Detektion von Glykoproteinen im Urinfilmm auf unterschiedlichen Materialien mittels Concanavalin A

Diskussion

Die Anwesenheit von HSA und THP im Urinfilmm wurde schon früher untersucht. Santin et al. konnten in einer Untersuchung von Ablagerungen auf Urinkathetern ebenfalls HSA und THP detektieren [30]. Kontrovers dazu konnten Hawthorn und Reid 1990 kein THP im Urinfilmm auf verschiedenen Polymeren, darunter auch Polystyrol, detektieren [64]. Die Anwesenheit von THP auf den Materialoberflächen, insbesondere auf dem Kathetermaterial PVC ist sehr interessant. Denn es wurde gezeigt, dass THP sehr spezifisch an eine Gattung von *Escherichia coli* bindet, welche mit Fimbrien umgeben ist. Diese Gattung ist häufig an katheterassoziierten Harnwegsinfektionen beteiligt [89;104;105].

Mobely et al. postulierten deshalb bereits 1987, dass diese *E. coli* Gattung, vermittelt durch die Bindung von THP, an die Materialoberfläche von Urinkathetern anbinden kann [94]. Hawthorn und Reid zeigten, dass außer *E. coli* noch weitere uropathogene Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* und *Staphylococcus epidermidis* mit THP eine Bindung eingehen können [64]. Doch durch die Bindung zwischen Bakterien und THP kann nicht nur deren Adhäsion an Kathetermaterial forciert, sondern im Gegensatz dazu die Adhäsion von Bakterien an das Gewebe im Harntrakt vermieden werden [105]. Die hohe THP-Konzentration auf dem Kathetermaterial PVC kann daher zu

einer Vermittlung der bakteriellen Adhäsion auf der Katheteroberfläche führen. Für keines der sechs untersuchten Materialien gab es eine auffallend hohe oder niedrige HSA-Konzentration. Albumin kann die bakterielle Adhäsion jedoch ebenfalls verringern. Es zeigt dabei sowohl durch die Adsorption an das Material als auch durch direkte Bindung an die Bakterienoberfläche eine Wirkung. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher noch nicht geklärt [106;107].

Im Gegensatz zu den mittels Immunofluoreszenz gemessenen Unterschieden in der Proteinzusammensetzung des Urinfilms, wurden mittels XPS-Untersuchungen keine materialabhängigen Unterschiede festgestellt. So wird in dieser Arbeit klar, dass einerseits die Zusammensetzung bezogen auf die chemischen Elemente eines Urinfilms material-unabhängig ist. Andererseits zeigen die Betrachtung der Proteinzusammensetzung im Detail Unterschiede im Urinfilm auf den verschiedenen Materialien. Da sich verschiedene Proteine hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung nur wenig voneinander unterscheiden, sind diese beiden Ergebnisse keinesfalls kontrovers. Es wird dadurch deutlich, dass zur Charakterisierung eines komplexen bioorganischen Films wie der Urinfilm der Einsatz mehrerer, unterschiedlicher Methoden notwendig ist.

Die Ergebnisse der AFM-unterstützten Immunogoldmarkierung stimmen in der Tendenz mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz überein. Die Goldbedeckung für HSA in einem Urinfilm auf Glas lag bei 15 % und damit höher als für THP mit 8 %. Mit der quantitativen Proteinbestimmung wurde ebenfalls mehr HSA 61 ng/cm² als THP 21 ng/cm² in einem auf Glas adsorbierten Urinfilm detektiert. Die Immunofluoreszenz hat gegenüber der AFM-unterstützten Immunogoldmarkierung entscheidende Vorteile. Die Konjugation mit einem Fluoreszenzfarbstoff führt nicht zu einer gegenseitigen sterischen Behinderung der Antikörper, da das Konjugat im Vergleich zu einem 10 nm-Goldpartikel sehr viel kleiner ist. So kann der entscheidende Vorteil der indirekten Antikörperfärbung, die Signalverstärkung durch das Anbinden mehrerer sekundärer Antikörper an einen primären Antikörper, genutzt werden. Die Fluoreszenzmikroskopie ist zudem weitestgehend unabhängig von der Beschaffenheit der Materialoberfläche. Rauheiten, wie sie für Polymeroberflächen vorkommen, beeinträchtigen die Fluoreszenzdetektion nicht und damit ist diese Methode für die Charakterisierung und für den Vergleich verschiedener Materialien sehr gut geeignet. Zudem gestaltet sich die Bewertung der Färbung im Falle der Fluoreszenz verhältnismäßig einfach, da der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten über alle Pixel gebildet werden kann. Für die AFM-unterstützte Immunogoldmarkierung muss dagegen ein Hörschwellenwert festgelegt werden, um die prozentuale Belegung der

Oberfläche mit Goldkonjugaten zu berechnen. Die Messqualität der AFM-Aufnahmen spielt dabei eine entscheidende Rolle. Die Größe eines Goldkonjugates in einer AFM-Aufnahme ist von der Qualität der Messspitze abhängig. Ist die Spitze beispielsweise durch anhaftende Proteine verunreinigt und nimmt dadurch in ihrem Spitzenradius zu, werden vorhandene Goldkonjugate größer abgebildet. Dieser Messartefakt ist entscheidend, da die Größenzunahme der Goldkonjugate zu höheren, prozentualen Goldbedeckungen führt und damit das Messergebnis verfälscht wird. Die Verunreinigung der AFM-Spitze ist in der Praxis für Messungen auf einem heterogenen, proteinhaltigen Urinfilmen nahezu unvermeidbar.

Die Fluoreszenzintensitäten wurden für einen Bildausschnitt von $1283 \mu\text{m} \times 963 \mu\text{m}$ aufgenommen und haben damit eine fast 50000fach größere Analysefläche im Vergleich zum Bildausschnitt von $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ der AFM-Aufnahmen. Dadurch hat die laterale Heterogenität einer Probe einen kleineren Einfluss auf das Ergebnis.

Eine absolute Quantifizierung der adsorbierten Proteinkonzentrationen ist für keine der beiden antikörpergestützten Methoden ohne eine Bestimmung der Affinitäten der verwendeten Antikörper möglich. Der Grund liegt wie bereits beschrieben in der Verwendung unterschiedlicher Antikörper. Im Fall der zweistufigen Antikörperfärbung ist sowohl die Bindungswahrscheinlichkeit des primären, als auch des sekundären Antikörpers von Bedeutung. Die Bindungswahrscheinlichkeiten von Antikörpern können sehr unterschiedlich sein und sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Eine Rolle können die Art der chemischen Fixierung, die Spezifität und die Verdünnung der Antikörper und die Konformation des Antigens spielen, um nur einige Faktoren zu nennen [108].

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Kalibrierung durch den Einsatz einer Quarzkristall-Mikrowaage mittels dieser die tatsächlich adsorbierte Menge eines Proteins auf einem Messkristall mit einer SiO_2 -Oberfläche bestimmt wurde. Durch die anschließende Fluoreszenzfärbung dieses adsorbierten Proteinfilms konnte eine Korrelation zwischen Proteinkonzentration auf der Oberfläche und der Fluoreszenzintensität erstellt werden. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die Kalibriergerade für die HSA-Detektion einen kleineren x-Achsenabschnitt im Vergleich zur Kalibriergerade von THP aufzeigt. Dies ist ein Hinweis auf eine geringere Nachweisgrenze für HSA. Eine Erklärung könnte die Verwendung unterschiedlicher Antikörperserien sein. Für HSA wurde als primärer Antikörper ein polyklonales Antikörperserum verwendet, die Detektion von THP erfolgte mittels eines monoklonalen, primären Antikörpers. Während der Antikörper für HSA an verschiedene Epitope des HSA-Moleküls anbinden kann, erkennt der THP-Antikörper

lediglich ein Epitop des Proteinmoleküls. Ist diese Stelle nicht zugänglich, zum Beispiel durch die Adsorption des Proteins an eine Oberfläche oder eine Konformationsänderung, kann keine Bindung zwischen Antikörper und Antigen stattfinden. Dies könnte zu einer geringeren Sensitivität der Immunofluoreszenz für THP im Vergleich zu HSA führen.

Ein weiterer Aspekt ist, dass sich die Konformation von HSA und THP durch die Adsorption auf hydrophoben oder hydrophilen Oberflächen unterschiedlich verändert und dadurch nicht die gleiche Anzahl an Bindungsepitopen auf diesen verschiedenen Oberflächen für die Antikörperfärbung zugänglich sind. Da die QCM-Kalibrierung auf der hydrophilen Oberfläche SiO₂ durchgeführt wurde, könnte die Quantifizierung für hydrophobe Oberflächen nicht korrekt anwendbar sein. Durch die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers ist dieser Einfluss für die HSA-Kalibration eher gering einzuschätzen. Ein Hinweis darauf, dass eine Konformationsänderung von THP während der Adsorption auf hydrophoben oder hydrophilen Oberflächen keine entscheidende Rolle spielt, liefern die Ergebnisse der Detektion der Glykoproteine mittels Concanavalin A. Da THP das höchstkonzentrierte Glykoprotein im Urin ist, können die Ergebnisse der Antikörperfärbung von THP mit den Ergebnissen der Concanavalin A Detektion verglichen werden. Dabei kann beobachtet werden, dass das Verhältnis zwischen THP auf Glas (hydrophile Oberfläche) und THP auf TPU (hydrophobe Oberfläche) für die beiden Färbeprotokolle ähnlich ist. Die Faktoren betragen 0,31 für die Antikörperfärbung und 0,37 für die Concanavalin A Detektion (Abbildung 20 / Abbildung 22). Das Detektionsprotein Concanavalin A bindet dabei jedoch an vollkommen anderen Stellen von THP im Vergleich zu dem verwendeten primären Antikörper im Färbeprotokoll. Würde THP auf verschiedenen Oberflächen sehr unterschiedliche Konformationsänderungen erfahren und sich dadurch die Anzahl der Bindungsstellen für den THP-Antikörper maßgeblich verändern, müsste sich die Anzahl der Bindungsstellen für Concanavalin A ungefähr im gleichen Maß verändern, um den ähnlichen Faktor zwischen Glas und TPU zu erklären. Dies ist jedoch nicht zu erwarten. Demzufolge ist der Einfluss der Hydrophobizität der Oberflächen eher gering einzuschätzen und die QCM-Kalibrierung sowohl für hydrophobe als auch für hydrophile Materialien anwendbar. Eine bisher nicht erwähnte Eigenschaft aller antikörperbasierender Färbemethoden ist die Tatsache, dass selbstverständlich nur diejenigen Proteine und ihre Konzentration detektiert werden können, welche zuvor auch ausgewählt wurden. Für unbekannte Systeme, deren Proteinzusammensetzung nicht bekannt ist oder für die es keine Anhaltspunkte für Proteine von besonderer Bedeutung gibt, ist der Einsatz dieser Methode eventuell schwierig.

3.2 Einfluss verschiedener Materialien und bioorganischer Schichten auf die bakterielle Adhäsion

Die initiale Adhäsion von Bakterien an Materialoberflächen stellt einen wichtigen Schritt in der Biofilmbildung dar und kann die Entstehung von Infektionen begünstigen. Die kolloidale Kraftspektroskopie bietet die Möglichkeit Adhäsionskräfte zwischen Material und Bakterien quantitativ zu bestimmen. Dadurch können Einflüsse wie Materialeigenschaften oder organische Materialbeschichtungen auf die bakterielle Adhäsion getestet werden. Im Zusammenhang mit katheterassoziierten Harnwegsinfektionen ist die Beschichtung der Materialien mit einem Urinfilm hinsichtlich der Wechselwirkungen mit Bakterien besonders interessant.

3.2.1 Kolloidale kraftspektroskopische Untersuchung zwischen Bakterien und unbehandelten oder beschichteten Materialoberflächen

Die Kraftspektroskopie ist eine analytische Methode mit deren Hilfe Adhäsionskräfte zwischen einer Oberfläche und einer Cantileverspitze detektiert werden können. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Cantilever mit einer Glas- oder Polystyrolkugel modifiziert

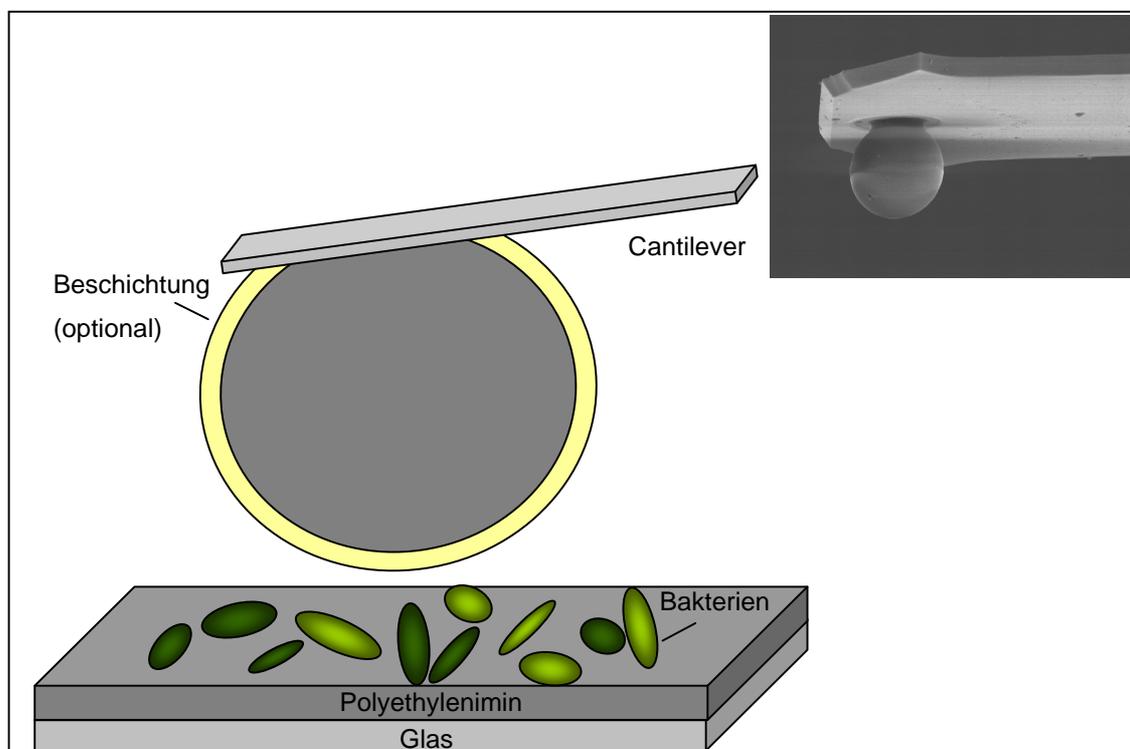


Abbildung 23: Messsystem für kolloidale kraftspektroskopischen Messungen an Bakterien

und die Wechselwirkungen zwischen der Kugeloberfläche und immobilisierten Bakterien *Pseudomonas putida* gemessen (2.2.5.3) (Abbildung 23). Dieser Bakterienstamm gehört zur gleichen Gattung wie der unter anderem an Harnwegsinfektionen beteiligte Stamm *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas putida* ähnelt dem Stamm *Pseudomonas aeruginosa*, ist jedoch kein potentieller Krankheitserreger für Menschen. Dies erleichtert den alltäglichen Umgang im Labor aufgrund der niedrigeren Einstufung von *Pseudomonas putida* bezüglich der biologischen Risikogruppe. Die Oberflächen der befestigten Materialkugeln konnten mit verschiedenen Proteinen oder mit einem Urinfilmm beschichtet und für die Adhäsionsmessungen verwendet werden. Für jeden präparierten Cantilever entstand eine Messreihe mit bis zu 10 verschiedenen Messstellen und jeweils 100 Kraft-Distanz-Kurven (Abbildung 24). Für jedes Material wurden mindestens zwei Cantilever präpariert. Die Differenz zwischen dem tiefsten Punkt einer Messkurve und der Nulllinie wurde als maximale Adhäsionskraft bestimmt. Lag diese innerhalb des Rauschniveaus ($\sim 0,06$ nN) der Messkurve, wurde die maximale Adhäsionskraft gleich 0 gesetzt und für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Die Verteilungen der Adhäsionskräfte für jedes Experiment wurden in einem Histogramm dargestellt, um die Qualität der Messung zu beurteilen. Als Beispiel sind die Ergebnisse der Adhäsionskräfte zwischen immobilisierten Bakterien und unbehandelte bzw. urinbeschichtete Glas- und Polystyrolkugel

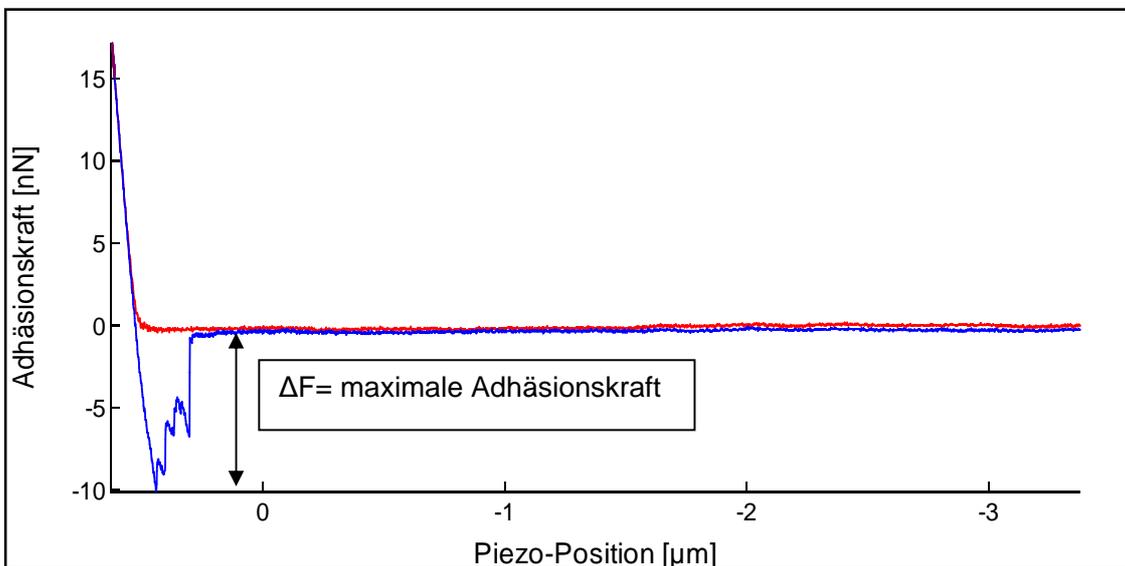


Abbildung 24: Kraftspektroskopische Messkurve zwischen immobilisierten Bakterien *Pseudomonas putida* und einer Polystyrolkugel. (Rot: Annäherungskurve Blau: Rückzugskurve) Die Immobilisierung der Bakterien erfolgte mittels PEI auf einer Glasoberfläche. Ein Cantilever mit einer Polystyrolkugel wurde mit ~ 15 nN auf die Bakterien gedrückt, für 1 Sekunde gehalten und wieder zurückgezogen. Die maximale Adhäsion wurde aus der Differenz zwischen dem tiefsten Punkt der Rückzugskurve und dem Nullniveau berechnet.

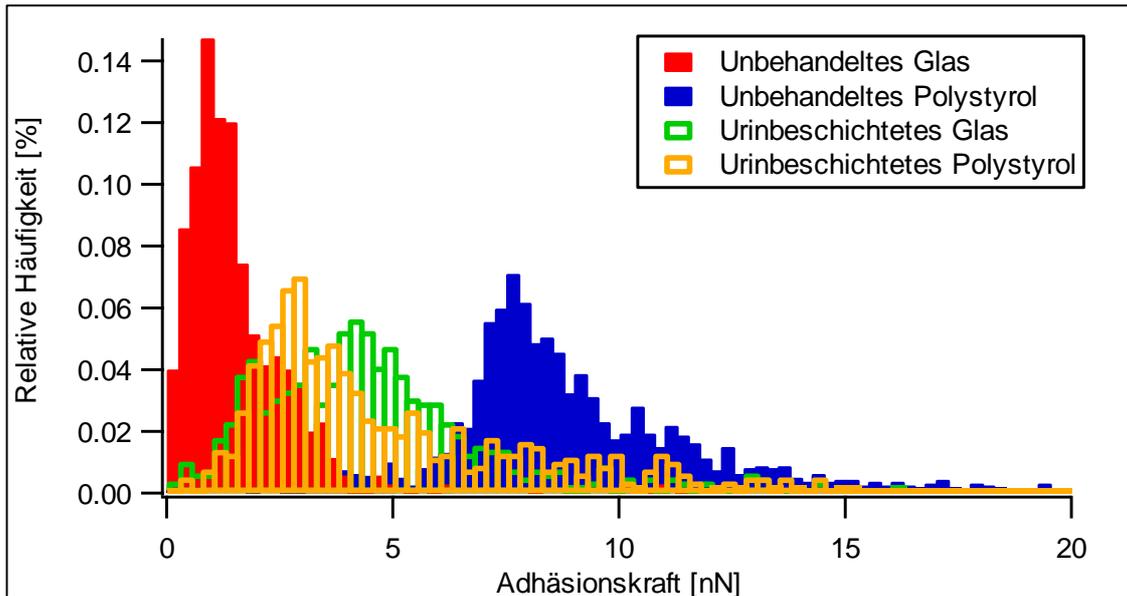


Abbildung 25: Histogramm der Adhäsionskräfte zwischen immobilisierten Bakterien *Pseudomonas putida* und den unbehandelten bzw. urinbeschichteten Materialoberflächen Glas und Polystyrol. Durchführung von mindestens zwei unabhängigen Messreihen mit bis zu 10 verschiedene Positionen und je 100 Messkurven. Berechnung der maximalen Adhäsionskraft und Darstellung der Verteilungen mit einer Bandbreite von 0,25 nN.

dargestellt (Abbildung 25). Die Adhäsionskräfte zwischen den Bakterien und den jeweils unbehandelten Materialien unterscheiden sich stark voneinander. Die Verteilungen für Glas und Polystyrol sind klar voneinander getrennt, zeigen nahezu keine Überlappungen und unterschiedliche Adhäsionsmaxima. Die Verteilungen der Adhäsionskräfte zwischen urinbeschichteten Materialkugeln und immobilisierten Bakterien liegen zwischen den Verteilungen der unbehandelten Materialien. Sie überschneiden sich und die Maxima liegen dicht zusammen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde für jede Messreihe der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes der Adhäsionskräfte berechnet (Abbildung 26). Die Adhäsionskraft zwischen den Bakterien und unbehandeltem Glas beträgt 1,1 nN und liegt damit fast um das 9fache unter der Adhäsionskraft von 9,1 nN zwischen unbehandeltem Polystyrol und Bakterien. Dieser Unterschied zwischen den Materialien verschwindet durch die Beschichtungen mit HSA, THP oder Urin. Die Adhäsionskräfte zwischen den beschichteten Materialoberflächen und den Bakterien liegen dann zwischen 3,8 nN und 5,0 nN und damit zwischen den Werten für die unbehandelten Materialien. Dies weist darauf hin, dass die Adhäsionskräfte durch diese Beschichtungen und nicht mehr durch die Materialien beeinflusst werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Beschichtungen auf unterschiedlichen Materialien sind mit 0,5 nN für HSA, 0,7 nN für THP und < 0,1 nN für Urin sehr gering in Anbetracht der Breite der

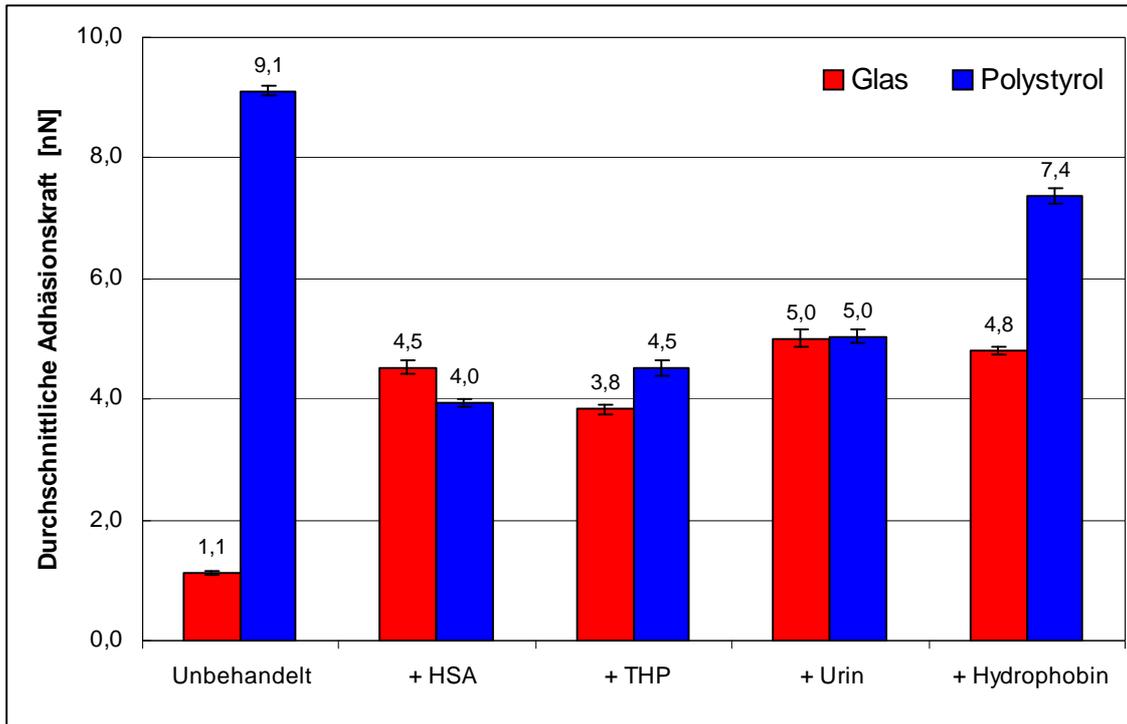


Abbildung 26: Durchschnittliche Adhäsionskräfte zwischen immobilisierten Bakterien *Pseudomonas putida* und den unbehandelten bzw. beschichteten Materialoberflächen Glas und Polystyrol. Durchführung von mindestens zwei unabhängigen Messreihen mit bis zu 10 verschiedenen Positionen und je 100 Messkurven. Berechnung der maximalen Adhäsionskraft und Bildung des Mittelwertes. Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler des Mittelwertes der Adhäsionskräfte eines Experiments wider.

Verteilung, welche mehrere nN beträgt. Eine Ausnahme stellen Hydrophobin-beschichtete Oberflächen dar. Hydrophobin beschreibt eine Gruppe von amphiphilen Proteinen, die in filamentbildenden Pilzen vorkommen [109]. Der Einfluss von Hydrophobin auf die bakterielle Adhäsion wurde bisher nicht quantitativ untersucht. Die aktuellen Ergebnisse zeigen, dass zwar deutliche Änderungen der Adhäsionskräfte von Bakterien gegenüber den unbehandelten Materialien detektiert werden, für Glas steigt die Adhäsionskraft von 1,1 nN auf 4,8 nN, für Polystyrol sinkt die Adhäsionskraft von 9,1 nN auf 7,4 nN. Es besteht jedoch nach wie vor ein deutlicher Unterschied von 2,6 nN zwischen den Hydrophobin-beschichteten Materialoberflächen von Glas und Polystyrol.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Adhäsionskräfte zwischen Bakterien und Materialien sehr unterschiedlich sein können und die Materialoberflächen durch verschiedene Beschichtungen beeinflusst werden. Für die Adhäsionsmessungen mit Hilfe der Kraftspektroskopie zwischen Bakterien und Materialien werden in der Lite-

ratur zwei grundlegende Testsysteme beschrieben [110]. Dabei sind die Bakterien entweder auf der Cantileverspitze oder auf einem flachen Substrat immobilisiert. Letzteres System wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Um möglichst anwendungsbezogene Messergebnisse zu erhalten ist die Verwendung von lebenden Bakterien während der Untersuchung von Bedeutung. Die Art der Immobilisierung spielt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Sie kann sowohl auf die Vitalität der Bakterien, als auch auf die Ergebnisse der kraftspektroskopischen Messungen einen Einfluss haben [111-113]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Bakterien *Pseudomonas putida* durch elektrostatische Wechselwirkungen mit einer Polyethyleniminschicht auf einer Glasoberfläche immobilisiert. Mit Hilfe einer Lebend-Tot-Färbung wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop festgestellt, dass die Bakterien zwischen 2 bis 4 Stunden auf der Oberfläche überleben. Diese Zeitspanne ist für die durchgeführten kraftspektroskopischen Untersuchungen ausreichend. Burks et al. beobachteten für eine Immobilisierung von Bakterien mit Dihydroxy-L-Phenylalanin eine ähnliche Überlebensdauer [112]. Grundsätzlich sollte beachtet werden, dass eine Immobilisierung durch die Adsorption von Bakterien auf einer positiv geladenen Oberflächen zu strukturellen Veränderungen der bakteriellen Zellwand führen kann [114].

Die Verwendung von Glutaraldehyd zur Immobilisierung wird kontrovers diskutiert. Neben der abtötenden Wirkung konnten einige Arbeitsgruppen eine Zunahme der Steifigkeit der Bakterien und eine Veränderung der Adhäsionskräfte insbesondere gegenüber Glas beobachten [111;112]. Razatos dagegen konnte keinen Einfluss auf die Adhäsion durch die Verwendung von Glutaraldehyd zur Immobilisierung feststellen [113]. Diese Hypothese stützt sich auf Messungen des Kontaktwinkels und des Zetapotentials glutaraldehydbehandelter Bakterien. Aufgrund dieser Diskussion wurde Glutaraldehyd in dieser Arbeit nicht zur Immobilisierung der Bakterien verwendet.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass die Adhäsionskraft zwischen Glas und Bakterien mit durchschnittlich 1,1 nN deutlich geringer ist im Vergleich zur Adhäsionskraft zwischen Polystyrol und Bakterien mit 9,1 nN.

Diese Beobachtung entspricht der Tatsache, dass Bakterien, welche meistens eine hydrophobe Membran besitzen, stärker an hydrophoben Oberflächen anhaften [32]. Dies wird als „hydrophober Effekt“ oder auch als hydrophobe Wechselwirkungen bezeichnet. Durch die Anwesenheit von unpolaren Stoffen in Wasser werden Wasserstoffbrücken aufgebrochen und die Bewegungsfreiheit der Wassermoleküle in direkter Umgebung eines unpolaren Stoffes ist eingeschränkt. Durch eine Minimierung der Oberflä-

che unpolare Stoffe kann das System die größte thermodynamische Stabilität erreichen. Im Fall der bakteriellen Adhäsion ist es so, dass die hydrophobe Membran eines Bakteriums und eine hydrophobe Oberfläche ihre Gesamtoberfläche durch einen Zusammenschluss minimieren können. Dieser hydrophobe Effekt wird sehr oft als „unspezifische“ Bindung bezeichnet, um diesen von stereospezifischen Wechselwirkungen des Schlüssel-Schloss-Prinzip unterscheiden zu können [32]. Es muss an dieser Stelle jedoch berücksichtigt werden, dass der Einfluss spezifischer Wechselwirkungen auf den hydrophoben Effekt noch nicht vollständig untersucht und verstanden ist [115].

Die spezifischen Bindungen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip können als selektive Bindungen zwischen bakteriellen Adhesinen (spezifische Komponenten auf der Bakterienoberfläche) und Substratrezeptoren (spezifische Komponente auf der Materialoberfläche) definiert werden. Sie sind zudem weniger von der Umgebung wie z.B. Elektrolytlösung, pH oder Temperatur abhängig [115]. Nach einem ersten Kontakt zwischen Bakterium und Oberfläche wird durch diese spezifischen Bindungen eine festere Anhaftung vermittelt. Die extrazelluläre Matrix und eventuell vorhandene Pili von Bakterien, insbesondere die in beiden Strukturen enthaltenen Polysaccharide und Proteine, spielen für die Knüpfung spezifischer Bindungen eine entscheidende Rolle [115].

Für die oben beschriebenen Messungen wurden die Adhäsionskräfte zwischen den unbehandelten Materialien Glas bzw. Polystyrol und Bakterien detektiert. Da auf diesen Materialien keine Proteine oder Polysaccharide auf der Oberfläche adsorbiert waren, ist der Unterschied in den Adhäsionskräften größtenteils auf den hydrophoben Effekt, also auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen.

Nach der Adsorption der Proteine HSA, THP oder nach der Adsorption eines Urinfilms waren die Adhäsionskräfte für beide Materialproben jeweils sehr ähnlich. Da sich nun Proteine und im Fall von Urin auch andere bioorganische Stoffe auf der Oberfläche befinden, könnten diese als Adhesine von Bakterien genutzt werden. Dadurch könnten spezifischen Bindungen für die gemessenen Adhäsionskräfte eine Rolle spielen. Um zu überprüfen, inwiefern diese Annahme plausibel ist, wurde die Anzahl der an diesen kraftspektroskopisch gemessenen Adhäsionskräften beteiligten bakteriellen Bindungsstellen abgeschätzt. In Anlehnung an Busscher et al. wurden folgende Annahmen getroffen [116]. Für den in dieser Arbeit verwendeten Messaufbau kann eine Kontaktfläche zwischen Materialkugel und bakterienbelegter PEI-Schicht von ca. $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ abgeschätzt werden. Damit sind zwischen 3 und 5 Bakterien an einer Messung beteiligt. Mit einer durchschnittlichen Adhäsionskraft von $0,095\ \text{nN}$ für eine einzelne spezifische

Bindung zwischen Bakterium und Proteinfilm und einem Mittelwerte der Adhäsionskräfte der beschichteten Oberflächen von 4,5 nN ergibt sich eine Beteiligung von insgesamt ca. 50 Bindungsstellen, pro Bakterium also zwischen 10 und 20 Bindungsstellen [116]. Die beteiligte Oberfläche eines Bakteriums der Gattung *Pseudomonas putida* beträgt ca. 1,5 μm^2 . Mit der Annahme, dass eine Bindungsstelle für HSA aufgrund der Größe des Proteins eine Fläche von ca. 25 nm^2 besitzt und der zusätzlichen Annahme, dass die Bakterienoberfläche dicht mit Bindungsstellen belegt ist, sind schätzungsweise 600 Bindungsstellen pro Bakterium vorhanden [117;118]. Es wären damit 2-3 % dieser Bindungsstellen an einer Adhäsionsmessung beteiligt. Die Kontaktzeit zwischen Kugeloberfläche und Bakterien spielt in dieser Abschätzung eine wichtige Rolle. Es ist zudem zu beachten, dass die Oberfläche höchstwahrscheinlich nicht komplett mit einer Art von Bindungsstelle belegt ist.

Eine wichtige Fragestellung in dieser Arbeit war, inwieweit Materialeigenschaften die bakterielle Adhäsion in Anwesenheit eines Urinfilms beeinflussen können. Durch die kraftspektroskopischen Messungen wird klar, dass materialspezifische Einflüsse auf die bakterielle Adhäsion durch die Beschichtung mit Protein oder auch mit Urin verschwinden. In Anbetracht der Breite der Verteilung der Adhäsionskräfte sind zwischen den Materialien für die gleiche Beschichtung keine Unterschiede der Adhäsionskräfte zu sehen. Dies trifft zum einen für den Urinfilm, aber auch für die Proteinfilme aus HSA und THP zu. Die Hydrophobinbeschichtungen weisen dagegen verschiedene Adhäsionskräfte auf Glas und Polystyrol auf. Dies kann möglicherweise auf die strukturelle Besonderheit des Hydrophobins zurückgeführt werden, denn Hydrophobin besteht aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Proteinanteil [119]. Dadurch wäre es denkbar, dass sich Hydrophobin sehr unterschiedlich auf den verschiedenen Materialoberflächen anhaftet und jeweils unterschiedliche Proteinregionen für die kraftspektroskopischen Messungen zugänglich sind. Eine andere Erklärung für die unterschiedlichen Adhäsionskräfte auf Glas und Polystyrol könnte eine unvollständige Bedeckung der Kugeloberfläche sein. Dadurch wären unbeschichtete Materialstellen an den kraftspektroskopischen Messungen beteiligt, welche einen Einfluss auf die Adhäsionskraft hätten.

Die Gleichheit der urinbeschichteten Materialien ist besonders in Verbindung mit den Erkenntnissen aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen interessant. Darin wurden für die Materialien Glas und Polystyrol Unterschiede in der Proteinzusammensetzung des Urinfilms detektiert. Da für die Urinfilme auf Glas und Polystyrol kein unterschiedliches Adhäsionsverhalten gegenüber den Bakterien beobachtet wurde, kann der

Schluss gezogen werden, dass die Proteinzusammensetzung des Urinfilms keine entscheidende Rolle für die bakterielle Adhäsion von *Pseudomonas putida* spielt.

Für die Tatsache, dass sich die Adhäsionskräfte für die verschiedenen beschichteten Materialien nicht unterscheiden, kann es zwei mögliche Erklärungen geben. Zum einen wäre dies ein Hinweis darauf, dass vor allem unspezifische Bindungskräfte an der Adhäsion beteiligt sind. Durch die Adsorption von Proteinen, unabhängig davon welches Protein, oder Urin werden die Oberflächen in ihrer Hydrophobizität verändert. Diese wird für Polystyrol reduziert, für Glas erhöht, so dass durch die vollständige Bedeckung der Oberfläche für beide Materialien ein ähnliches Niveau erreicht wird. Die Erniedrigung der Hydrophobizität einer Materialoberfläche durch Proteinadsorption und eine damit verbundene Reduzierung der bakteriellen Adhäsion wurde von Reynolds und Wong beschrieben [120].

Zum anderen bleibt zu beachten, dass sich spezifische Bindungsereignisse hinsichtlich der Adhäsionskraft nur geringfügig voneinander unterscheiden [116]. Daher könnte für die gemessene maximale Adhäsionskraft nicht entscheidend sein, ob eine spezifische Bindung zwischen THP und Bakterium oder HSA und Bakterium geknüpft wird, sondern wie viele Bindungen insgesamt geknüpft werden. Da die Gesamtproteinkonzentration auf Glas mit $82 \pm 10 \text{ ng/cm}^2$ und auf Polystyrol mit $67 \pm 11 \text{ ng/cm}^2$ ähnlich sind, könnten für beide Materialien ähnlich viele spezifische Bindungen geknüpft worden sein. Die Beteiligung von spezifischen Bindungsereignissen an der gemessenen Adhäsionskraft ist daher nicht ausgeschlossen. Vielleicht hätte eine Verlängerung der Kontaktzeit zwischen Material und Bakterien zu mehr spezifischen Bindungen geführt. In der Literatur wird für eine Verlängerung der Kontaktzeit eine Zunahme der maximalen Adhäsion beobachtet [82;121].

In welchem Maß spezifische oder unspezifische Bindungsereignisse die gemessenen Adhäsionskräfte beeinflussen, kann anhand der vorliegenden Daten nicht getroffen werden. Klar wird jedoch, dass die Bindungseigenschaften einer Materialoberfläche stark von der Anwesenheit eines bioorganischen Films aus Proteinen oder Urin beeinflusst wird.

3.2.2 Statische Untersuchung der bakteriellen Adhäsion und Vergleich mit kraftspektroskopischen Untersuchungen

Zur Beurteilung der bakteriellen Adhäsion können auch statische Tests mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Dazu werden Materialien mit einer Bakterienkultur in Kontakt gebracht, nach einer definierten Zeitspanne abgespült und die anhaftenden Bakterien mit einer Lebend-Tot-Färbung fluoreszierend angefärbt (2.2.6). Die Oberflächen können anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht und die Anzahl der Bakterien auf der Oberfläche bestimmt werden. Diese Vorgehensweise ist weit verbreitet um die Wirkung von antimikrobiellen Oberflächen zu untersuchen. Die erzielten Ergebnisse der Kraftspektroskopie aus 3.2.1 können mit den Ergebnissen dieses mikrobiologischen Tests verglichen werden. Dabei soll beurteilt werden,

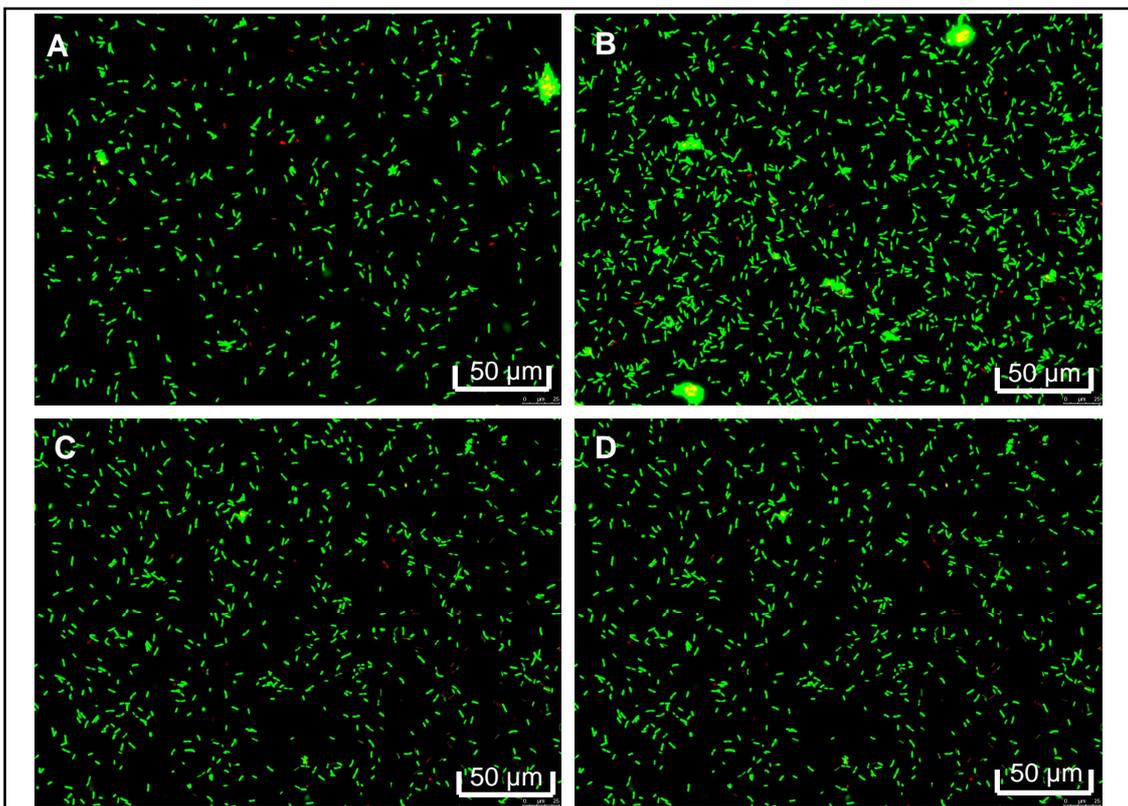


Abbildung 27: Fluoreszenzaufnahmen anhaftender Bakterien *Pseudomonas putida* auf verschiedenen unbehandelten und HSA-beschichteten Materialien. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden in einer Bakteriensuspension. Nach einer Lebend-Tot-Färbung wurden für jede Probe 8 Fluoreszenzbilder aufgenommen und ausgezählt.

- A: unbehandeltes Glas
- B: unbehandeltes Polystyrol
- C: HSA-beschichtetes Glas
- D: HSA-beschichtetes Polystyrol

inwieweit Erkenntnisse aus kraftspektroskopischen Messungen auf die tatsächlichen bakteriellen Adhäsionsvorgänge übertragbar sind. Dazu wurden unbehandelte und HSA-beschichtete Glas- und Polystyroloberflächen für zwei Stunden mit Bakterien bei Raumtemperatur inkubiert und die bakterielle Adhäsion anschließend anhand der Anzahl der anhaftenden Bakterien mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es zeigt sich, dass fast ausschließlich lebende Bakterien (grün) auf der Oberfläche zu finden sind, tote Bakterien (rot) sind, wie erwartet, nur vereinzelt vorhanden (Abbildung 27). Zur Detektion werden alle anhaftenden Bakterien computergestützt ausgezählt (Abbildung 28). Dazu wurden jeweils acht Fluoreszenzbilder auf jeder Oberfläche aufgenommen, ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Mit ~500 Bakterien auf unbehandeltem Glas und ~1300 Bakterien auf unbehandeltem Polystyrol besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Materialien. Mit einer HSA-Beschichtung haften auf Glas ~900 Bakterien und auf Polystyrol ~700 Bakterien. Die Bakterienanzahl auf den HSA-beschichteten Materialien liegt zwischen den Werten für unbehandeltes Glas und Polystyrol.

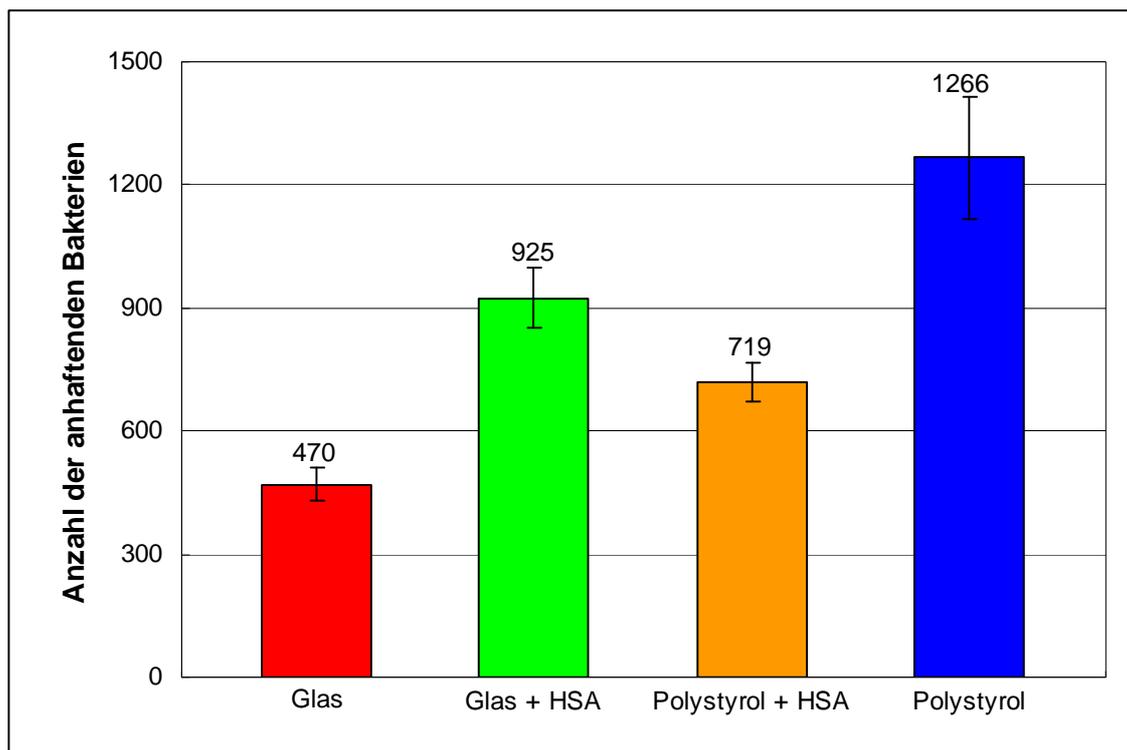


Abbildung 28: Ergebnisse des statischen Adhäsionstest für die unbehandelten und HSA-beschichteten Materialien Glas und Polystyrol. Für jede Oberflächen wurden zwei unabhängige Proben präpariert und jeweils vier Fluoreszenzbilder aufgenommen. Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler vom Mittelwert der anhaftenden Bakterien auf einer Oberfläche wider.

Es wird deutlich, dass die Ergebnisse der kraftspektroskopischen Messungen in der Tendenz mit den Ergebnissen des statischen Adhäsionstest übereinstimmen. Die Unterschiede zwischen den unbehandelten und beschichteten Materialoberflächen sind jedoch für den statischen Testansatz geringer. So haftet in diesem ungefähr das Dreifache an Bakterien an Polystyrol im Vergleich zu Glas. In den kraftspektroskopischen Messungen dagegen zeigt Polystyrol eine ca. 9fach höhere Adhäsionskraft. Die Kraftspektroskopie stellt damit die empfindlichere Methode dar, sie besitzt den größeren dynamischen Bereich.

Auch in anderen Studien zeigten kraftspektroskopische Messungen der bakteriellen Adhäsion und Adhäsionstest in einer Flusszelle tendenziell die gleichen Ergebnisse [122]. Aufgrund der Übertragbarkeit von kraftspektroskopischen Messungen auf tatsächliche Adhäsionsvorgänge, ist eine Nutzung der Methode zur Beurteilung der Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Materialoberflächen möglich. Neben einer höheren Empfindlichkeit gegenüber den statischen mikroskopischen Tests erlaubt die Kraftspektroskopie gleichzeitig quantitative Aussagen bezüglich der Adhäsionskraft.

3.2.3 Kraftspektroskopische Untersuchungen zwischen Bakterien und antiadhäsiven Materialoberflächen

Eine Strategie zur Vermeidung der bakteriellen Adhäsion ist der Einsatz von antiadhäsiven Oberflächen. Diese Oberflächen zeichnen sich dadurch aus, dass keine oder nur vereinzelt Bakterien anhaften. Durch eine Charakterisierung solcher Materialoberflächen mit Hilfe der Kraftspektroskopie können die antiadhäsiven Eigenschaften quantitative beurteilt und miteinander verglichen werden.

Als Materialoberflächen wurden die Materialien PEO und PVP gewählt, diese zeigten in vorausgehenden Untersuchungen sehr gute antiadhäsive Eigenschaften bezüglich der Adhäsion von Proteinen und Bakterien [122-125]. Zur Messung wurden an einem Cantilever befestigte Polystyrolkugel mit diesen Materialien beschichtet und direkt für kraftspektroskopische Messungen auf Bakterien verwendet (2.2.5.3). Neben der Adhäsionskraft ist der Anteil an Messungen ohne Bindungsereignis eine wichtige Kenngröße. Dabei liegt die gemessene maximale Adhäsionskraft im Rauschniveau der Messkurve. Beim Vergleich der maximalen Adhäsionskräfte wird der antiadhäsive Charakter von PEO und PVP deutlich (Abbildung 29). Mit 0,3 nN für PEO und 0,6 nN für PVP sind die maximalen Adhäsionskräfte im Vergleich zu Glas mit 1,1 nN und Polystyrol mit 9,1 nN deutlich geringer. Im Vergleich mit Polystyrol sind die Adhäsionskräfte der antiadhäsiven Materialien um das 30fache für PEO und um das 15fache für PVP niedriger. Für das antiadhäsive Material PEO kommt es in 61 % der Messungen nicht zu einem Bindungsereignis (Abbildung 30). PVP und Glas zeigen mit 31 % und 25 % einen ähnlichen Anteil von Messungen ohne messbare Adhäsion. Polystyrol geht in jeder Messung eine Bindung mit der Bakterienoberfläche ein, der Anteil der Messungen ohne Bindungsereignis ist 0 %. Damit ergibt sich auch hier die gleiche Reihenfolge, wie zuvor für die Bestimmung der durchschnittlichen Adhäsionskräfte. Die kraftspektroskopischen Messungen spiegeln die antiadhäsiven Eigenschaften der Materialien PEO und PVP in einem hohen Anteil an Messungen ohne Bindungsereignis (Abbildung 30) und geringer Adhäsionskräfte für die Bindungen wider (Abbildung 29). Im Unterschied dazu zeigten die Referenzmaterialien Glas und Polystyrol mit 25 % und 0 % geringere Anteile an Messungen ohne Bindungsereignis. Um die Stabilität der präparierten antiadhäsiven Materialbeschichtungen zu überprüfen, wurden diese für unterschiedliche Zeitspannen in einer HSA-Lösung inkubiert und anschließend für kraftspektroskopische Messungen auf Bak-

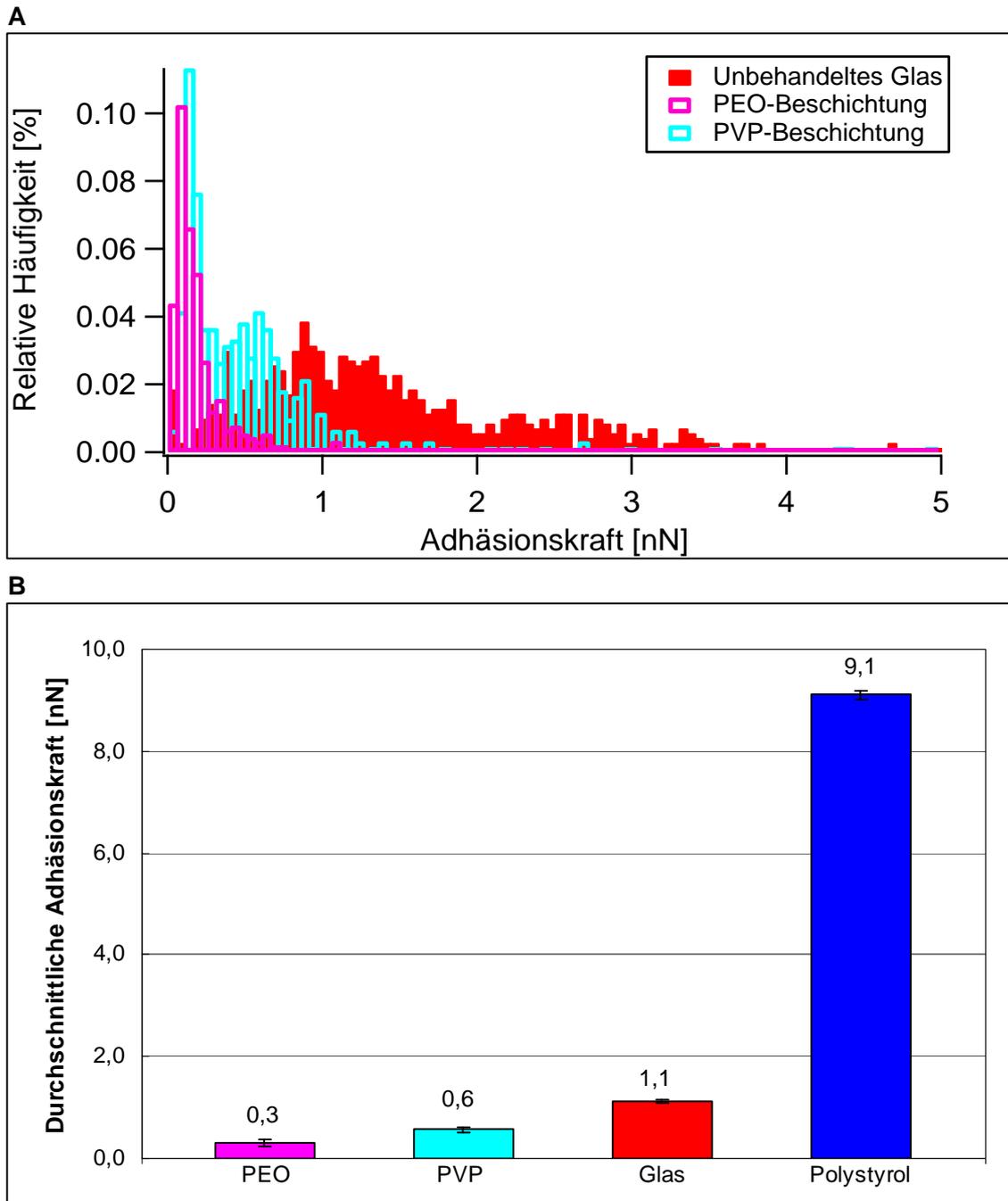


Abbildung 29: Adhäsionskräfte zwischen immobilisierten Bakterien *Pseudomonas putida* und den antiadhäsive Materialien PEO und PVP sowie den Referenzmaterialien Glas und Polystyrol. Durchführung von mindestens zwei unabhängigen Messreihen mit bis zu 10 verschiedene Positionen und je 100 Messkurven.

A: Berechnung der maximalen Adhäsionskraft und Darstellung der Verteilungen mit einer Bandbreite von 0,05 nN im Histogramm

B: Berechnung der maximale Adhäsionskraft und Bildung des Mittelwertes. Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler des Mittelwertes der Adhäsionskräfte eines Experiments wider.

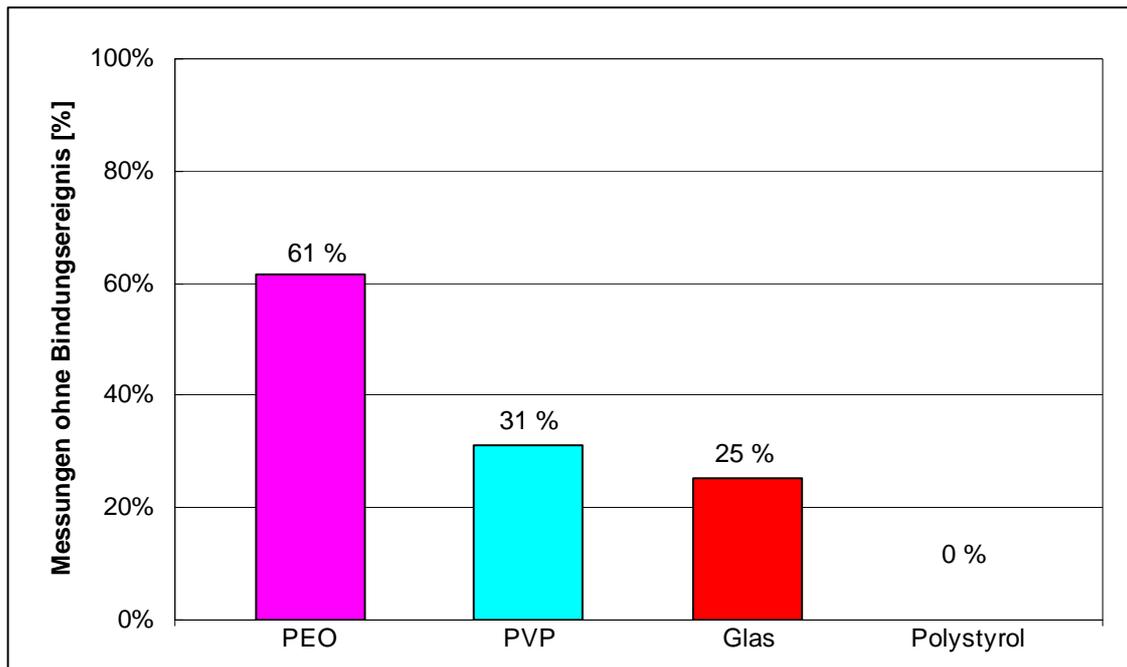


Abbildung 30: Prozentualer Anteil an Messungen ohne Bindungsereignis zwischen immobilisierten Bakterien *Pseudomonas putida* und verschiedenen Materialoberflächen. Auszählung aller Messungen mit der maximalen Adhäsionskraft im Rauschniveau der Messkurve.

terien verwendet. Nach einer dreistündigen Inkubation in einer HSA-Lösung ergeben sich keine grundlegenden Veränderungen im Adhäsionsverhalten der beiden Materialien im Vergleich zu Messungen ohne eine Inkubation in HSA-Lösung (Abbildung 31). Eine große Änderung ist nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden zu erkennen. Die Adhäsionskräfte für PEO und PVP steigen auf 3,1 nN bzw. 2,7 nN. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden steigen die Werte noch mal auf 3,7 nN für PEO und 3,6 nN für PVP an. Die antiadhäsiven Eigenschaften der Materialschichten nehmen durch die Inkubation in einer HSA-Lösung für 15 Stunden ab, bis die Adhäsionskräfte nach 24 Stunden denen eines HSA-beschichteten Referenzmaterials Glas mit 4,5 nN und Polystyrol mit 4,0 nN entsprechen. Ob dabei die Materialschichten PEO und PVP durch HSA belegt wurde oder ob sich die Materialschichten vom Substrat Polystyrol lösen und dieses Substrat dann mit einer HSA-Schicht belegt wird, kann anhand dieser Messungen nicht beurteilt werden.

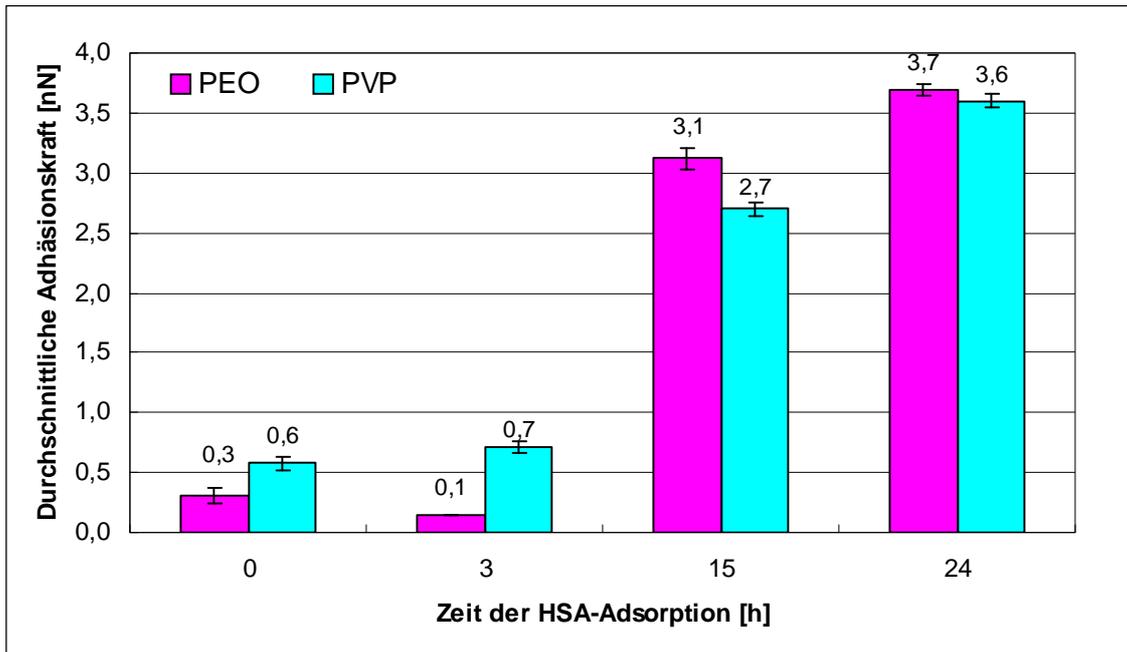


Abbildung 31: Durchschnittliche Adhäsionskräfte zwischen Bakterien *Pseudomonas putida* und PEO bzw. PVP nach verschiedenen Inkubationszeiten in einer HSA-Lösung. Präparation der Oberflächen auf einer Polystyrolkugel eines modifizierten Cantilevers und anschließende Inkubation in einer HSA-Lösung (50 µg/mL in PBS-Puffer) bei Raumtemperatur für die angegebene Zeit. Für jede Messreihe wurden an bis zu 4 verschiedenen Positionen 100 Messkurven aufgenommen, die maximale Adhäsionskraft berechnet und gemittelt. Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler des Mittelwertes der Adhäsionskräfte eines Experiments wider.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Kraftspektroskopie antiadhäsive Oberflächen charakterisiert werden können. Die Betrachtung des prozentualen Anteils an Messkurven ohne Bindungsereignis sollte für die Beurteilung zusätzlich zu den Adhäsionskräften herangezogen werden. Für diese Anwendung ist der größere dynamische Bereich der Kraftspektroskopie gegenüber den statischen Adhäsionstests mit Bakterien von Bedeutung. In einem statischen, mikroskopischen Test ist die Scherkraft des Abspülens nach der Inkubation mit Bakterien entscheidend. Haften Bakterien mit einer Adhäsionskraft an eine Oberfläche an, welche geringer ist als die Scherkraft des Abspülens, werden sie entfernt. Sie können nicht als anhaftende Bakterien für das untersuchte Material detektiert werden. Eventuelle Unterschiede zwischen Materialien mit geringen Adhäsionskräften gegenüber Bakterien können im statischen Test nicht mehr detektiert werden. Zur Charakterisierung und Beurteilung von antiadhäsiven Oberflächen ist die Kraftspektroskopie daher besonders gut geeignet.

4 Zusammenfassung

Die Zusammensetzung eines adsorbierten Urinfilms auf einer Oberfläche kann im Zusammenhang mit der bakteriellen Adhäsion und der Biofilmbildung eine entscheidende Rolle spielen. Proteine im Urinfilmbereich können die Anhaftung von Bakterien vermitteln, da sie direkt als Anknüpfungspunkte verwendet werden können. Aufgrund der Komplexität des Urins und aufgrund der niedrigen Konzentration einiger enthaltener Stoffgruppen, stellt die Charakterisierung eines solchen Urinfilms hohe Ansprüche an die eingesetzten Methoden. Die Gesamtbeschaffenheit eines Urinfilms kann daher nur durch den Einsatz und die Kombination verschiedener biophysikalischer Messmethoden erfasst werden.

Zur Beurteilung der Zusammensetzung hinsichtlich der chemischen Elemente wurden sowohl an unbehandelten als auch an urinbeschichteten Materialien XPS-Untersuchungen durchgeführt. Durch die Betrachtung von verschiedenen Materialien wurde deren Einfluss auf die Zusammensetzung des Urinfilms erfasst. Die Ergebnisse zeigen, dass die Materialoberflächen von einem > 10 nm dicken Urinfilmbereich bedeckt sind, dessen Zusammensetzung hinsichtlich der chemischen Elemente auf den verschiedenen Materialien gleich ist. Über 90 % des Urinfilms bestehen dabei aus Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff, anorganische Inhaltsstoffe stellen nur einen geringen Anteil dar. Diese Zusammensetzung stimmt grundlegend mit den XPS-Untersuchungen von Urin als Referenzprobe überein. Aufgrund der Komplexität des Urinfilms konnten keine Anteile für Stoffgruppen anhand der Ergebnisse dieser XPS-Untersuchungen berechnet werden.

Die Untersuchung der Proteinzusammensetzung des Urinfilms ist im Hinblick auf die bakterielle Adhäsion besonders interessant. Sowohl die Anwendung der massenspektroskopischen Methode TOF-SIMS in Kombination mit der Hauptkomponentenanalyse, als auch eine AFM-unterstützte Immunogoldmarkierung einzelner Proteine waren jedoch nicht erfolgreich. Grund dafür war die Komplexität und die geringe Konzentration der einzelnen Komponenten im Urinfilmbereich.

Die Kombination aus Immunofluoreszenz und einer Kalibrierung mit QCM ermöglichte die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration im Urinfilmbereich direkt auf verschiedenen Materialoberflächen. Es zeigen sich dabei unterschiedliche Konzentrationen der beiden Hauptproteine des Urins, Serumalbumin (HSA) und Tamm-Horsfall-Glykoprotein (THP). Dabei ist im Vergleich meist das urineigene THP in einer höheren Konzentration auf den Materialoberflächen vorhanden.

Zur quantitativen Bestimmung der Adhäsionskräfte zwischen Bakterien und Materialoberflächen wurde die kolloidale Kraftspektroskopie eingesetzt. In diesen Untersuchungen zeigten sich für Glas und Polystyrol wie erwartet große Unterschiede in den maximalen Adhäsionskräften auf Bakterien. Durch die Beschichtung der Materialoberflächen mit HSA, THP oder Urin gingen diese materialspezifischen Unterschiede verloren, die maximale Adhäsionskraft war für alle drei Beschichtungen gleich. Der Urinfilm mit einer Schichtdicke von > 10 nm maskiert die materialspezifischen Eigenschaften und minimiert so den Einfluss des Materials auf die bakterielle Adhäsion.

Die Ergebnisse eines statischen Adhäsionstests für Bakterien auf verschiedenen Materialien wurden mit den Ergebnissen der kraftspektroskopischen Untersuchungen verglichen. Die Resultate entsprechen sich dabei in ihrer Tendenz und führen zu dem Schluss, dass die kraftspektroskopischen Untersuchungsergebnisse auf tatsächliche Adsorptionsvorgänge zwischen Materialien und Bakterien übertragen werden können. Es wird zudem deutlich, dass im Vergleich mit dem statischen Adhäsionstest die kolloidale Kraftspektroskopie die empfindlichere Methode ist und schon geringe Unterschiede in der Adhäsionskraft detektiert werden können. Daher eignet sie sich sehr gut zur Charakterisierung von antiadhäsiven Oberflächen. In Untersuchungen mit PEO und PVP konnten zum einen die antiadhäsiven Eigenschaften der beiden Materialien im Bezug zu Glas und Polystyrol quantitativ bestimmt und zum anderen ein Unterschied zwischen diesen beiden Materialien beobachtet werden. Die Kraftspektroskopie birgt großes Potential für die Unterstützung der Entwicklung von antiadhäsiven Oberflächen.

Die besonderen Herausforderungen dieser Arbeit lagen insbesondere in der Komplexität des Themengebiets. Von der Zusammensetzung der Urinprobe über die Auswahl relevanter Materialoberflächen bis hin zur biologischen Heterogenität von Biofilmen gab es unzählige Parameter, die beachtet werden mussten. Die Wahl von geeigneten Testparametern ist einerseits unbedingt notwendig um reproduzierbare Experimente durchführen zu können. Andererseits kann genau diese Auswahl die Möglichkeiten allgemeingültige Schlussfolgerungen zu ziehen erheblich einschränken. Die Vereinfachung von komplexen Systemen birgt das Risiko, dass die erzielten Resultate streng an die gewählten Bedingungen geknüpft sind.

Für die Charakterisierung des Urinfilms war es besonders wichtig, die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen in einen Gesamtzusammenhang einzuordnen. Wie bei einem Puzzle konnte nur so nach und nach ein Gesamtbild entstehen. Um das entstandene Bild noch zu vervollständigen, könnten zukünftige Untersuchungen einen Schwer-

punkt auf die anorganischen Bestandteile des Urinfilms legen. Auch eine weiterführende Analytik über die Proteine hinaus könnte eine sinnvolle Fortführung der Charakterisierung sein. Sehr interessant hinsichtlich der Entwicklung von neuen Materialien wäre auch ein Testaufbau, in dem funktionalisierte Oberflächen den Körperflüssigkeiten Urin oder auch Blut ausgesetzt werden. Der Einfluss der sich ausbildenden Filme auf die Wirksamkeit solcher Oberflächen könnte damit geklärt werden.

Der Zusammenhang zwischen den charakterisierten Eigenschaften des Urinfilms und der bakteriellen Adhäsion sowie im nächsten Schritt der Einfluss auf die Biofilmbildung ist eine große Herausforderung, die sicherlich noch nicht vollständig gemeistert ist. Eine allgemeingültige Antwort kann es in diesem Zusammenhang nicht geben, da je nach Art der verwendeten Bakterien Unterschiede in ihrem Verhalten zu erwarten sind. In diesem Zusammenhang wäre die Verwendung eines relevanten Krankheitserregers wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* oder *Proteus mirabilis* ein verbesserungsfähiger Aspekt. Aufgrund der Sicherheitsbestimmungen konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht umgesetzt werden. Für zukünftige Forschungsprojekte die sich mit adsorbierten, bioorganischen Filmen auf Oberflächen und deren Einfluss auf die bakterielle Adhäsion beschäftigen, könnte die von den Bakterien produzierte extrazelluläre Matrix sehr interessant sein. Denn es ist sehr wahrscheinlich, dass auch diese von Bakterien eigens gebildeten Biomoleküle die Materialoberflächen belegen und als Adhesine dienen. Eine Untersuchung des Einflusses dieser Matrix auf die bakterielle Adhäsion erscheint daher vielversprechend.

5 Literatur

- [1] J.W.Costerton, K.J.Cheng, G.G.Geeseey, T.I.Ladd, J.C.Nickel, M.Dasgupta, and T.J.Marrie, Bacterial Biofilms in Nature and Disease, Annual Review of Microbiology 41 (1987) 435-464.
- [2] J.W.Costerton, P.S.Stewart, and E.P.Greenberg, Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, Science 284 (1999) 1318-1322.
- [3] Bott, T. R. and Grant, D. M. Biofilms in flowing systems, 2001.
- [4] R.M.Donlan, Biofilms: Microbial life on surfaces, Emerging Infectious Diseases 8 (2002) 881-890.
- [5] W.M.Dunne, Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?, Clinical Microbiology Reviews 15 (2002) 155-+.
- [6] H.C.Flemming, Reverse osmosis membrane biofouling, Experimental Thermal and Fluid Science 14 (1997) 382-391.
- [7] H.C.Flemming, Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures, Applied Microbiology and Biotechnology 59 (2002) 629-640.
- [8] S.M.Jacobsen, D.J.Stickler, H.L.T.Mobley, and M.E.Shirtliff, Complicated catheter-associated urinary tract infections due to Escherichia coli and Proteus mirabilis, Clinical Microbiology Reviews 21 (2008) 26-+.
- [9] P.Klemm, R.M.Vejborg, and V.Hancock, Prevention of bacterial adhesion, Applied Microbiology and Biotechnology 88 (2010) 451-459.
- [10] A.G.Gristina, Biomaterial-Centered Infection - Microbial Adhesion Versus Tissue Integration, Science 237 (1987) 1588-1595.
- [11] R.P.Schneider, B.R.Chadwick, R.Pembrey, J.Jankowski, and I.Acworth, Retention of the Gram-Negative Bacterium Sw8 on Surfaces Under Conditions Relevant to the Subsurface Environment - Effects of Conditioning Films and Substratum Nature, Fems Microbiology Ecology 14 (1994) 243-254.
- [12] H.J.Busscher, R.Bos, and H.C.vanderMei, Initial Microbial Adhesion Is A Determinant for the Strength of Biofilm Adhesion, Fems Microbiology Letters 128 (1995) 229-234.
- [13] H.J.Busscher and H.C.vanderMei, Use of Flow Chamber Devices and Image-Analysis Methods to Study Microbial Adhesion, Adhesion of Microbial Pathogens 253 (1995) 455-477.
- [14] D.J.Bradshaw, P.D.Marsh, G.K.Watson, and C.Allison, Effect of conditioning films on oral microbial biofilm development, Biofouling 11 (1997) 217-226.

- [15] T.R.Neu and K.C.Marshall, Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces, *J Biomater Appl* 5 (1990) 107-133.
- [16] J.C.Nickel, I.Ruseska, J.B.Wright, and J.W.Costerton, Tobramycin Resistance of Pseudomonas-Aeruginosa Cells Growing As A Biofilm on Urinary Catheter Material, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27 (1985) 619-624.
- [17] J.W.Leung, Y.L.Liu, T.Desta, E.Libby, J.F.Inciardi, and K.Lam, Is there a synergistic effect between mixed bacterial infection in biofilm formation on biliary stents?, *Gastrointestinal Endoscopy* 48 (1998) 250-257.
- [18] D.G.Davies, A.M.Chakrabarty, and G.G.Geeseey, Exopolysaccharide Production in Biofilms - Substratum Activation of Alginate Gene-Expression by Pseudomonas-Aeruginosa, *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993) 1181-1186.
- [19] I.W.Sutherland, Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework, *Microbiology-Uk* 147 (2001) 3-9.
- [20] V.Leriche, P.Sibille, and B.Carpentier, Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms, *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 1851-1856.
- [21] B.Carpentier and O.Cerf, Biofilms and Their Consequences, with Particular Reference to Hygiene in the Food-Industry, *Journal of Applied Bacteriology* 75 (1993) 499-511.
- [22] D.Debeer, P.Stoodley, and Z.Lewandowski, Liquid Flow in Heterogeneous Biofilms, *Biotechnology and Bioengineering* 44 (1994) 636-641.
- [23] R.E.Baier, Organic Films on Natural Waters - Their Retrieval, Identification, and Modes of Elimination, *Journal of Geophysical Research* 77 (1972) 5062-&.
- [24] C.Compere, M.N.Bellon-Fontaine, P.Bertrand, D.Costa, P.Marcus, C.Poleunis, C.M.Pradier, B.Rondot, and M.G.Walls, Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater, *Biofouling* 17 (2001) 129-145.
- [25] G.I.Loeb and R.A.Neihof, Marine Conditioning Films, *Advances in Chemistry Series* (1975) 319-335.
- [26] M.Holmberg, K.B.Stibius, N.B.Larsen, and X.L.Hou, Competitive protein adsorption to polymer surfaces from human serum, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 19 (2008) 2179-2185.
- [27] S.Y.Jung, S.M.Lim, F.Albertorio, G.Kim, M.C.Gurau, R.D.Yang, M.A.Holden, and P.S.Cremer, The Vroman effect: A molecular level description of fibrinogen displacement, *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003) 12782-12786.
- [28] A.W.S.Elves and R.C.L.Feneley, Long-term urethral catheterization and the urine - Biomaterial interface, *British Journal of Urology* 80 (1997) 1-5.

- [29] E.Ostuni, R.G.Chapman, R.E.Holmlin, S.Takayama, and G.M.Whitesides, A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein, *Langmuir* 17 (2001) 5605-5620.
- [30] M.Santin, A.Motta, S.P.Denyer, and M.Cannas, Effect of the urine conditioning film on ureteral stent encrustation and characterization of its protein composition, *Biomaterials* 20 (1999) 1245-1251.
- [31] R.Mueller, K.A.Hiller, G.Schmalz, and S.s.r.r.d.Ruhl, Chemiluminescence-based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces, *Analytical Biochemistry* 359 (2006) 194-202.
- [32] Mittelman Marc W., *Adhesion to Biomaterials, Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, Wiley, 1996, pp. 89-127.
- [33] G.Reid and H.J.Busscher, Importance of Surface-Properties in Bacterial Adhesion to Biomaterials, with Particular Reference to the Urinary-Tract, *International Biodeterioration & Biodegradation* 30 (1992) 105-122.
- [34] I.Alhashimi and M.J.Levine, Characterization of Invivo Salivary-Derived Enamel Pellicle, *Archives of Oral Biology* 34 (1989) 289-295.
- [35] P.Gastmeier, G.Kampf, N.Wischnewski, T.Hauer, G.Schulgen, M.Schumacher, F.Daschner, and H.Rueden, Prevalence of nosocomial infections in representative German hospitals, *Journal of Hospital Infection* 38 (1998) 37-49.
- [36] P.Gastmeier and C.Geffers, Nosocomial infections in Germany: what are the numbers, based on the estimates for 2006?, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 133 (2008) 1111-1115.
- [37] D.J.Stickler, Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters, *Nature Clinical Practice Urology* 5 (2008) 598-608.
- [38] G.L.Hortin and D.Sviridov, Diagnostic potential for urinary proteomics, *Pharmacogenomics* 8 (2007) 237-255.
- [39] Harn, Roche Lexikon Medizin, Urban & Fischer Verlag, 1998, pp. 698-699.
- [40] D.Pennica, W.J.Kohr, W.J.Kuang, D.Glaister, B.B.Aggarwal, E.Y.Chen, and D.V.Goeddel, Identification of Human Uromodulin As the Tamm-Horsfall Urinary Glycoprotein, *Science* 236 (1987) 83-88.
- [41] I.Tamm and F.L.Horsfall, Characterization and Separation of An Inhibitor of Viral Hemagglutination Present in Urine, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 74 (1950) 108-114.
- [42] F.Serafini-Cessi, N.Malagolini, and D.Cavallone, Tamm-Horsfall glycoprotein: Biology and clinical relevance, *American Journal of Kidney Diseases* 42 (2003) 658-676.

- [43] R.J.McLean, D.J.Stickler, and J.Nickel, Biofilm mediated calculus formation in the urinary tract, *Cells and Materials* 6 (1996) 165-174.
- [44] N.S.Morris, D.J.Stickler, and R.J.C.Mclean, The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters, *World Journal of Urology* 17 (1999) 345-350.
- [45] A.J.Cox and D.W.L.Hukins, Morphology of Mineral-Deposits on Encrusted Urinary Catheters Investigated by Scanning Electron-Microscopy, *Journal of Urology* 142 (1989) 1347-1350.
- [46] H.Hedelin, A.Eddeland, L.Larsson, S.Pettersson, and S.Ohman, The Composition of Catheter Encrustations, Including the Effects of Allopurinol Treatment, *British Journal of Urology* 56 (1984) 250-254.
- [47] D.W.L.Hukins, D.S.Hickey, and A.P.Kennedy, Catheter Encrustation by Struvite, *British Journal of Urology* 55 (1983) 304-305.
- [48] P.F.Keane, M.C.Bonner, S.R.Johnston, A.Zafar, and S.P.Gorman, Characterization of Biofilm and Encrustation on Ureteral Stents In-Vivo, *British Journal of Urology* 73 (1994) 687-691.
- [49] D.Stickler, L.Ganderton, J.King, J.Nettleton, and C.Winters, Proteus-Mirabilis Biofilms and the Encrustation of Urethral Catheters, *Urological Research* 21 (1993) 407-411.
- [50] P.K.Grover, V.R.Marshall, and R.L.Ryall, Tamm-Horsfall Mucoprotein Reduces Promotion of Calcium-Oxalate Crystal Aggregation Induced by Urate in Human Urine In-Vitro, *Clinical Science* 87 (1994) 137-142.
- [51] B.K.Canales, L.Higgins, T.Markowski, L.Anderson, Q.A.Li, and M.Monga, Presence of Five Conditioning Film Proteins Are Highly Associated with Early Stent Encrustation, *Journal of Endourology* 23 (2009) 1437-1442.
- [52] G.Reid, D.Lam, Z.Policova, and A.W.Neumann, Adhesion of 2 Uropathogens to Silicone and Lubricious Catheters - Influence of Ph, Urea and Creatinine, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 4 (1993) 17-22.
- [53] K.G.Kristinsson, Adherence of Staphylococci to Intravascular Catheters, *Journal of Medical Microbiology* 28 (1989) 249-257.
- [54] G.Reid, C.Tieszer, R.Foerch, H.J.Busscher, A.E.Khoury, and H.C.vanderMei, The Binding of Urinary Components and Uropathogens to A Silicone Latex Urethral Catheter, *Cells and Materials* 2 (1992) 253-260.
- [55] N.Bernbom, Y.Y.Ng, R.L.Jorgensen, A.Arpanaei, R.L.Meyer, P.Kingshott, R.M.Vejborg, P.Klemm, and L.Gram, Adhesion of food-borne bacteria to stainless steel is reduced by food conditioning films, *Journal of Applied Microbiology* 106 (2009) 1268-1279.

- [56] H.Liedberg and T.Lundeberg, Silver Coating of Urinary Catheters Prevents Adherence and Growth of *Pseudomonas-Aeruginosa*, *Urological Research* 17 (1989) 357-358.
- [57] M.R.Ruggieri, P.M.Hanno, and R.M.Levin, Reduction of Bacterial Adherence to Catheter Surface with Heparin, *Journal of Urology* 138 (1987) 423-426.
- [58] R.M.Vejborg, N.Bernbom, L.Gram, and P.Klemm, Anti-adhesive properties of fish tropomyosins, *Journal of Applied Microbiology* 105 (2008) 141-150.
- [59] A.J.Cox, D.W.L.Hukins, and T.M.Sutton, Infection of Catheterized Patients - Bacterial-Colonization of Encrusted Foley Catheters Shown by Scanning Electron-Microscopy, *Urological Research* 17 (1989) 349-352.
- [60] R.Mittal, S.Sharma, S.Chhibber, and K.Harjai, In Vitro Effect of Urinary Constituents on the Adhesion Ability of *Pseudomonas aeruginosa* to Human Uroepithelial Cells, *Journal of Adhesion Science and Technology* 23 (2009) 1239-1251.
- [61] G.Reid, R.Davidson, and J.D.Denstedt, Xps, Sem and Edx Analysis of Conditioning Film Deposition Onto Ureteral Stents, *Surface and Interface Analysis* 21 (1994) 581-586.
- [62] C.Tieszer, G.Reid, and J.Denstedt, XPS and SEM detection of surface changes on 64 ureteral stents after human usage, *Journal of Biomedical Materials Research* 43 (1998) 321-330.
- [63] P.Cadieux, J.D.Watterson, J.Denstedt, R.R.Harbottle, J.Puskas, J.Howard, B.S.Gan, and G.Reid, Potential application of polyisobutylene-polystyrene and a *Lactobacillus* protein to reduce the risk of device-associated urinary tract infections, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 28 (2003) 95-105.
- [64] L.Hawthorn and G.Reid, The Effect of Protein and Urine on Uropathogen Adhesion to Polymer Substrata, *Journal of Biomedical Materials Research* 24 (1990) 1325-1332.
- [65] S.M.Macleod and D.J.Stickler, Species interactions in mixed-community crystalline biofilms on urinary catheters, *Journal of Medical Microbiology* 56 (2007) 1549-1557.
- [66] V.Yadav, K.Harjai, R.Kaur, K.Joshi, and S.Sharma, Urovirulence of *Pseudomonas aeruginosa*: pPlanktonic cells vs. biofilm cells, *Folia Microbiologica* 49 (2004) 465-470.
- [67] B.D.Ratner, D.G.Castner, *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*, In: Vickerman, J. C. and Gilmore, I. S. (Eds.), *Surface Analysis The Principle Techniques*, 2010, pp. 47-112.
- [68] D.A.Shirley, High-Resolution X-Ray Photoemission Spectrum of Valence Bands of Gold, *Physical Review B* 5 (1972) 4709-&.

- [69] A.Benninghoven, Observing surface oxidation of molybdenum with the statical method of secondary ion mass spectroscopy, *Chemical Physics Letters* 6 (1970) 626-628.
- [70] N.Suzuki, L.Gamble, C.Tamerler, M.Sarikaya, D.G.Castner, and F.S.Ohuchi, Adsorption of genetically engineered proteins studied by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS). Part A: data acquisition and principal component analysis (PICA), *Surface and Interface Analysis* 39 (2007) 419-426.
- [71] Lottspeich, F. and Engels, J. W. *Bioanalytik*, Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010.
- [72] R.C.Ebersole, J.A.Miller, J.R.Moran, and M.D.Ward, Spontaneously Formed Functionally Active Avidin Monolayers on Metal-Surfaces - A Strategy for Immobilizing Biological Reagents and Design of Piezoelectric Biosensors, *Journal of the American Chemical Society* 112 (1990) 3239-3241.
- [73] C.K.O'Sullivan and G.G.Guilbault, Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications, *Biosensors & Bioelectronics* 14 (1999) 663-670.
- [74] F.R.Lack, G.W.Willard, and I.E.Fair, Some improvements in quartz crystal circuit elements, *Bell System Technical Journal* 13 (1934) 453-463.
- [75] K.A.Marx, Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface, *Bio-macromolecules* 4 (2003) 1099-1120.
- [76] G.Sauerbrey, Verwendung Von Schwingquarzen Zur Wagung Dunner Schichten und Zur Mikrowagung, *Zeitschrift fur Physik* 155 (1959) 206-222.
- [77] F.Hook, M.Rodahl, P.Brzezinski, and B.Kasemo, Energy dissipation kinetics for protein and antibody-antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance, *Langmuir* 14 (1998) 729-734.
- [78] G.Binnig, C.F.Quate, and C.Gerber, Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters* 56 (1986) 930-933.
- [79] U.Dammer, M.Hegner, D.Anselmetti, P.Wagner, M.Dreier, W.Huber, and H.J.Guntherodt, Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy, *Biophysical Journal* 70 (1996) 2437-2441.
- [80] E.L.Florin, V.T.Moy, and H.E.Gaub, Adhesion Forces Between Individual Ligand-Receptor Pairs, *Science* 264 (1994) 415-417.
- [81] G.U.Lee, D.A.Kidwell, and R.J.Colton, Sensing Discrete Streptavidin Biotin Interactions with Atomic-Force Microscopy, *Langmuir* 10 (1994) 354-357.
- [82] L.Mei, H.C.van der Mei, Y.J.Ren, W.Norde, and H.J.Busscher, Poisson Analysis of Streptococcal Bond Strengthening on Stainless Steel with and without a Salivary Conditioning Film, *Langmuir* 25 (2009) 6227-6231.

- [83] T.Schroder, T.Geisler, V.Walhorn, B.Schnatwinkel, D.Anselmetti, and J.Mattay, Single-molecule force spectroscopy of supramolecular heterodimeric capsules, *Physical Chemistry Chemical Physics* 12 (2010) 10981-10987.
- [84] W.A.Ducker, T.J.Senden, and R.M.Pashley, Direct Measurement of Colloidal Forces Using An Atomic Force Microscope, *Nature* 353 (1991) 239-241.
- [85] H.J.Butt, B.Cappella, and M.Kappl, Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications, *Surface Science Reports* 59 (2005) 1-152.
- [86] J.M.Neumeister and W.A.Ducker, Lateral, Normal, and Longitudinal Spring Constants of Atomic-Force Microscopy Cantilevers, *Review of Scientific Instruments* 65 (1994) 2527-2531.
- [87] C.T.Gibson, G.S.Watson, and S.Myhra, Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy, *Nanotechnology* 7 (1996) 259-262.
- [88] J.L.Hutter and J.Bechhoefer, Calibration of Atomic-Force Microscope Tips, *Review of Scientific Instruments* 64 (1993) 1868-1873.
- [89] I.Orskov, A.Ferencz, and F.Orskov, Tamm-Horsfall Protein Or Uromucoid Is the Normal Urinary Slime That Traps Type-1 Fimbriated Escherichia-Coli, *Lancet* 1 (1980) 887.
- [90] D.F.Putnam, Composition and Concentrative Properties of Human Urine, NASA (National Aeronautics and Space Administration) Contractor Report CR (1971) 1-107.
- [91] C.Tieszer, G.Reid, and J.Denstedt, Conditioning film deposition on ureteral stents after implantation, *Journal of Urology* 160 (1998) 876-881.
- [92] Y.F.Dufrene, Direct evidence for the involvement of extracellular proteins in the adhesion of *Azospirillum brasilense*, (1996).
- [93] Dufrene, Y. F., Boonaert, C. J. P., and Rouxhet, P. G. Surface analysis by X-ray photoelectron spectroscopy in study of bioadhesion and biofilms, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, 1999.
- [94] H.L.T.Mobley, G.R.Chippendale, J.H.Tenney, R.A.Hull, and J.W.Warren, Expression of Type-1 Fimbriae May be Required for Persistence of *Escherichia-Coli* in the Catheterized Urinary-Tract, *Journal of Clinical Microbiology* 25 (1987) 2253-2257.
- [95] C.Poleunis, C.Compere, and P.Bertrand, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: characterisation of stainless steel surfaces immersed in natural seawater, *Journal of Microbiological Methods* 48 (2002) 195-205.
- [96] C.M.Pradier, P.Bertrand, M.N.Bellon-Fontaine, C.Compere, D.Costa, P.Marcus, C.Poleunis, B.Rondot, and M.G.Walls, Adsorption of proteins on an AISI 316

- stainless-steel surface in natural seawater, *Surface and Interface Analysis* 30 (2000) 45-49.
- [97] M.S.Wagner and D.G.Castner, Characterization of adsorbed protein films by time-of-flight secondary ion mass spectrometry with principal component analysis, *Langmuir* 17 (2001) 4649-4660.
- [98] M.S.Wagner, M.Shen, T.A.Horbett, and D.G.Castner, Quantitative time-of-flight secondary ion mass spectrometry for the characterization of multicomponent adsorbed protein films, *Applied Surface Science* 203 (2003) 704-709.
- [99] F.Bernsmann, N.Lawrence, M.Hannig, C.Ziegler, and H.Gnaser, Protein films adsorbed on experimental dental materials: ToF-SIMS with multivariate data analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 545-554.
- [100] F.D'Amico and E.Skarmoutsou, Quantifying immunogold labelling in transmission electron microscopy, *Journal of Microscopy-Oxford* 230 (2008) 9-15.
- [101] J.Fritz, D.Anselmetti, J.Jarchow, and X.FernandezBusquets, Probing single biomolecules with atomic force microscopy, *Journal of Structural Biology* 119 (1997) 165-171.
- [102] C.Rabouille, Quantitative aspects of immunogold labeling in embedded and nonembedded sections, *Methods Mol Biol* 117 (1999) 125-144.
- [103] G.Griffiths and H.Hoppeler, Quantitation in Immunocytochemistry - Correlation of Immunogold Labeling to Absolute Number of Membrane-Antigens, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 34 (1986) 1389-1398.
- [104] I.Orskov, F.Orskov, and A.Birchandersen, Comparison of Escherichia-Coli Fimbrial Antigen F7 with Type-1 Fimbriae, *Infection and Immunity* 27 (1980) 657-666.
- [105] J.Pak, Y.B.Pu, Z.T.Zhang, D.L.Hasty, and X.R.Wu, Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated Escherichia coli and prevents E. coli from binding to uroplakin Ia and Ib receptors, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 9924-9930.
- [106] K.Merritt, Y.H.An, Factors Influencing Bacterial Adhesion, In: An, Y. H. and Friedman R.J. (Eds.), *Handbook of Bacterial Adhesion*, Humana Press, Totowa, 2000, pp. 53-72.
- [107] J.H.Pringle and M.Fletcher, Influence of Substratum Hydration and Adsorbed Macromolecules on Bacterial Attachment to Surfaces, *Applied and Environmental Microbiology* 51 (1986) 1321-1325.
- [108] M.A.Hayat, Quantitation of Immunogold Labeling, *Micron and Microscopica Acta* 23 (1992) 1-16.
- [109] M.B.Linder, Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14 (2009) 356-363.

- [110] P.C.Y.Lau, J.R.Dutcher, T.J.Beveridge, and J.S.Lam, Absolute Quantitation of Bacterial Biofilm Adhesion and Viscoelasticity by Microbead Force Spectroscopy, *Biophysical Journal* 96 (2009) 2935-2948.
- [111] G.A.Burks, S.B.Velegol, E.Paramonova, B.E.Lindenmuth, J.D.Feick, and B.E.Logan, Macroscopic and nanoscale measurements of the adhesion of bacteria with varying outer layer surface composition, *Langmuir* 19 (2003) 2366-2371.
- [112] S.Kang and M.Elimelech, Bioinspired Single Bacterial Cell Force Spectroscopy, *Langmuir* 25 (2009) 9656-9659.
- [113] A.Razatos, Application of atomic force microscopy to study initial events of bacterial adhesion, *Microbial Growth in Biofilms, Pt B 337* (2001) 276-285.
- [114] V.Vadillo-Rodrigues, H.J.Busscher, W.Norde, J.de Vries, R.J.B.Dijkstra, I.Stokroos, and H.C.van der Mei, Comparison of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods, *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004) 5441-5446.
- [115] Y.H.An, R.B.Dickinson, R.J.Doyle, Mechanisms of Bacterial Adhesion and Infection, In: An, Y. H. and Friedman R.J. (Eds.), *Handbook of Bacterial Adhesion*, Humana Press, Totowa, 2000, pp. 1-28.
- [116] H.J.Busscher, W.Norde, and H.C.van der Mei, Specific molecular recognition and nonspecific contributions to bacterial interaction forces, *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2008) 2559-2564.
- [117] C.E.Giacomelli, M.G.E.G.Bremer, and W.Norde, ATR-FTIR study of IgG adsorbed on different silica surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science* 220 (1999) 13-23.
- [118] M.Malmsten and B.Lessen, Ellipsometry studies of protein adsorption at hydrophobic surfaces, *Proteins at Interfaces Ii* 602 (1995) 228-238.
- [119] M.B.Linder, Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14 (2009) 356-363.
- [120] E.C.Reynolds and A.Wong, Effect of Adsorbed Protein on Hydroxyapatite Zeta Potential and Streptococcus-Mutans Adherence, *Infection and Immunity* 39 (1983) 1285-1290.
- [121] L.Mei, Y.Ren, H.J.Busscher, Y.Chen, and H.C.van der Mei, Poisson Analysis of Streptococcal Bond-strengthening on Saliva-coated Enamel, *Journal of Dental Research* 88 (2009) 841-845.
- [122] A.Razatos, Y.L.Ong, F.Boulay, D.L.Elbert, J.A.Hubbell, M.M.Sharma, and G.Georgiou, Force measurements between bacteria and poly(ethylene glycol)-coated surfaces, *Langmuir* 16 (2000) 9155-9158.

- [123] P.Francois, P.Vaudaux, N.Nurdin, H.J.Mathieu, P.Descouts, and D.P.Lew, Physical and biological effects of a surface coating procedure on polyurethane catheters, *Biomaterials* 17 (1996) 667-678.
- [124] S.Krishnan, C.J.Weinman, and C.K.Ober, Advances in polymers for anti-biofouling surfaces, *Journal of Materials Chemistry* 18 (2008) 3405-3413.
- [125] M.M.Tunney and S.P.Gorman, Evaluation of a poly(vinyl pyrrolidone)-coated biomaterial for urological use, *Biomaterials* 23 (2002) 4601-4608.

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich an alle richten, die mich während meiner Promotion begleitet und in besonderem Maße unterstützt haben. Herrn Professor Dario Anselmetti danke ich dabei für seine fachliche und persönliche Unterstützung. Von Anfang an setzte er Vertrauen in das Thema meiner Arbeit und trug mit anregenden Diskussionen und seiner Zuversicht maßgeblich zur Entstehung und Entwicklung bei. Weiter möchte ich Herrn Professor Thomas Huser für seine Bereitschaft danken, meine Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten. Für Ihre Teilnahme an der Prüfungskommission danke ich Herrn Professor Jürgen Schnack, Professor Norbert Sewald und Herrn Professor Andreas Hütten.

Für die persönliche Betreuung in Ludwigshafen danke ich in besonderem Maße Herrn Dr. Markus Rückel, von dessen wissenschaftlicher Kompetenz ich sehr viel lernen konnte. In zahlreichen, wertvollen Diskussionen und Gesprächen half er mir den roten Faden meiner Arbeit zu verfolgen und hatte stets ein offenes Ohr für die Sorgen einer Doktorandin.

Ich danke Herrn Dr. Wolfgang Schrepp und Herrn Dr. Frank Wilco Bartels für das schon gleich zu Beginn in mich gesetzte Vertrauen. Ein großer Dank geht auch an alle Laborleiter und Laborteams der verschiedenen Forschungslabors in denen ich meine Experimente und Messungen durchgeführt habe und die sich alle sehr aufgeschlossen gegenüber meinem eher ungewöhnlichen Probenmaterial zeigten. Vielen Dank sowohl für die fachliche als auch für die praktische Unterstützung während der vergangenen drei Jahre. Ein Dank geht auch an die Arbeitsgruppe der experimentellen Biophysik und angewandte Nanowissenschaften für die Hilfe während meiner Zeit in Bielefeld, in der ich die ersten Versuche in der Kraftspektroskopie durchführen konnte.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Lisa Wagner, Bernd Kümmerling und Peter Böshans für ihre Hilfe und Unterstützung weit über das Fachliche hinaus.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Petra und Rudi Herzenstiel bedanken, die immer hinter mir standen und durch Ihre Unterstützung den Grundstein für meinen Erfolg gelegt haben. Meinen Geschwistern Peter und Anke Herzenstiel sowie meinen Freunden danke ich für ihre motivierenden Worte und E-mails, die immer zum richtigen Zeitpunkt eintrafen.

Ein riesiger Dank geht an meinen Freund Eric Vincent. Du hast immer an mich geglaubt, mich während der gesamten Zeit begleitet und mich in jeder Hinsicht unterstützt. Ich danke Dir von ganzem Herzen!