

Berichte aus der Biophysik

Nicole Lawrence

**Untersuchungen zur Biofilmbildung:
Proteinadsorption auf Dentalmaterialien
und Modelloberflächen**

D 386 (Diss. Technische Universität Kaiserslautern)

Shaker Verlag
Aachen 2009

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

Zugl.: Kaiserslautern, TU, Diss., 2009

Copyright Shaker Verlag 2009

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

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-8629-3

ISSN 1439-7897

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

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

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

Zusammenfassung

Proteinadsorption als Grundlage der Biofilmbildung ist in vielen Bereichen der Medizin und Materialwissenschaften ein wichtiges Thema. Ziel der vorliegenden Arbeit war ein größeres Verständnis der molekular ablaufenden Prozesse bei der Proteinadsorption. Da die Adsorption der Proteine von vielen komplexen Parametern abhängt, wurde versucht mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops und der dynamischen Kontaktwinkelanalyse verschiedene Bereiche in der Wechselwirkung Protein-Oberfläche zu beleuchten.

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bilden Adhäsionskraftmessungen zwischen einem Protein und einer Oberfläche mittels Rasterkraftspektroskopie. Dazu wurden Proteine an den Messsensor spezifisch gebunden und Kraftabstandskurven in Abhängigkeit verschiedener Parameter wie Kontaktzeit und pH-Wert der Flüssigkeit aufgenommen und ausgewertet. Ein wichtiger Punkt war dabei eine neue Proteinfixierung durch Silanisierung (3-Aminopropyltriethoxisilan (APTES)) zu testen und zu optimieren. Als nächster Schritt wurden die Adhäsionskräfte von Amylase auf einer nativen und einer mit Octadecyltrichlorosilan (OTS) belegten Siliziumschicht verglichen. Beide Oberflächen dienen als Modelloberfläche hinsichtlich ihrer Hydrophobie bzw. Hydrophilie, um die entropischen bzw. enthalpischen Beiträge zur Abrisskraft herausfiltern zu können. Danach wurden zwei Prototypen von Zahnfüllungsmaterialien (FAP und FAPS), die sich durch einen zusätzlichen Prozessschritt bei einer der Proben unterscheiden, miteinander verglichen. Hierfür wurden die Proben rasterkraftmikroskopisch untersucht, die chemische Zusammensetzung mittels Flugzeitmassenspektrometer verglichen und anschließend die Abrisskräfte von Amylase auf den Oberflächen gemessen. Um einen direkten Vergleich zwischen Imitation und Natur zu erhalten, wurde das kommerziell erhältliche Zahnfüllungsmaterial Dyract AP mit Rinderzahnschmelz verglichen. Dafür wurde die Topologie der Materialien mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht und die Abrisskräfte bestimmt. In einem weiteren Schritt wurde ein in vivo gebildeter 60-Minuten-Pellikel auf diesen Oberflächen untersucht. Zum Abschluss wurden Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Amylase und drei Proteinschichten (Lysozym, Rinderserumalbumin und Amylase) in Abhängigkeit der isoelektrischen Punkte der drei Proteine untersucht. Alle untersuchten Systeme zeigten ein wechselwirkungszeitabhängiges Verhalten, das durch Konformationsänderungsprozesse des Proteins bei Kontakt der Oberfläche erklärt werden kann. Im Rahmen eines dazu passenden kinetischen Modells wurde die Reaktionskinetik für die unterschiedlichen Protein-Oberfläche-Systeme betrachtet. Die Messungen bei verschiedenen pH-Werten zeigten, dass für bestimmte Oberflächen/Proteinschichten die elektrostatischen Wechselwirkungen eine große Rolle spielen.

Bei dynamischen Kontaktwinkelmessungen (Wilhelmy-Waage) wurden die Fortschritt- und Rückzugswinkel für Aussagen bezüglich der pH-Wert-Abhängigkeit der Proteinschichten Lysozym, BSA und Amylase verwendet. Zusätzlich wurden mehrzyklische Adsorptionsexperimente mit Lysozym und BSA auf den zwei Modelloberflächen Siliziumdioxid und OTS durchgeführt. Die Oberflächen zeigen eine zunehmende Homogenisierung bei Proteinadsorption.

Abstract

Protein adsorption as the basis for biofilm formation plays an important role in many fields of medical and material science. The purpose of this work is to broaden the understanding of the molecular processes that occur during protein adsorption. Because the adsorption of proteins depends on many complex parameters, various areas in protein to surface interaction between protein and the surface were examined with the help of scanning force microscopy (SFM) and dynamic contact angle analysis (DCA).

Adhesion force measurements between proteins and surfaces performed by scanning force spectroscopy are the main focus of this work. Therefore, proteins were specifically bound to the sensor surface and force distance curves were measured by various parameters as interaction time and pH-value. An important aspect was to test and optimize a new protein immobilization reached by silanization (3-aminopropyltriethoxysilan (APTES)). In a further step the adhesion force between amylase and a native silica surface and one covered with octadecyltrichlorosilan (OTS) were compared. Both surfaces were chosen as model surfaces as to their hydrophobicity or hydrophilicity in order to differentiate between the entropy and enthalpy shares of the adhesion force. Afterwards, two dental filling materials prototypes (FAP and FAPs) that differ from each other by an additional process step were compared with each other. For this purpose, first sample surfaces were characterized by SFM and time-of-flight mass spectrometry and afterwards the adhesion force of amylase was measured. In order to compare nature with substitution, the filling material Dyract AP and bovine enamel were analyzed. Therefore, surface topology was monitored and adhesion forces between bovine serum albumin (BSA) and the substrate surfaces were determined. In a further step, a pellicle which was formed *in vivo* in a time frame of 60 minutes was monitored. Finally, protein-protein-interactions between amylase and three protein films (amylase, lysozyme, BSA) were measured with different pH-values.

All SFM measurements show an adhesion force dependence on contact time, which can be explained by conformational changes of the protein at contact with the surface. A kinetic model has been used to compare the reaction kinetics of the different protein-surface-systems. The measurements with different pH-values reflect the influence of electrostatic interactions of the adhesion force of some of the surfaces, but not of all.

DCA measurements were used to characterize the advancing and receding contact angles as an indicator for pH-value dependence on protein films of lysozyme, amylase and BSA. Additionally, adsorption experiments were carried out with lysozyme and BSA on the two model surfaces OTS and SiO₂. The substrates exhibit an increasing surface homogeneity.