

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

Nicole Lawrence
geb.
Schwender

Vom Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

Betreuerin: Prof. Dr. Christiane Ziegler
Zweitgutachter: Prof. Dr. Rolf Diller

Datum der wissenschaftlichen Aussprache:
29.04.2009

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 Fortschreit- 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.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Biofilmbildung	1
1.3	Aufbau und Gliederung der Dissertation	2
2	Verfahren zur Oberflächencharakterisierung	3
2.1	Rasterkraftmikroskopie	3
2.2	Dynamische Kontaktwinkelanalyse	4
2.2.1	Grenzflächenspannung und Kontaktwinkel	4
2.2.2	Wilhelmy-Waage	6
2.3	Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie	9
2.3.1	Festkörperzerstäubung	9
2.3.2	Aufbau und Funktionsweise des Flugzeitmassenspektrometers	9
3	Kraftmessungen	12
3.1	Wechselwirkungen zwischen Spitze und Oberfläche	12
3.1.1	Wechselwirkung an Luft	12
3.1.2	Wechselwirkung in fluiden Medien	13
3.1.3	Kapillarkräfte	14
3.2	Rasterkraftspektroskopie	15
3.2.1	Kraftabstandskurven	15
3.2.2	Messbereich einer Kraftabstandskurve	17
3.2.3	Hydrophobe Wechselwirkung	19
3.2.4	Kraftabstandskurven eines proteinbelegten Cantilevers	21
3.2.5	Kraftspektrum	22
4	Biologische Systeme	23
4.1	Proteine	23
4.1.1	Aufbau und Struktur von Proteinen	23
4.1.2	Albumin	24
4.1.3	Lysozym	25
4.1.4	Speichelamylase	25
4.1.5	Aminosäurezusammensetzung der drei Modellproteine	26
4.2	Zahn und Implantate	26
4.2.1	Zahn	26
4.2.2	Implantate	27
4.3	Dentale Biofilmbildung	29
4.3.1	Speichel	29
4.3.2	Pellikel	30
4.4	Energetische Betrachtung der Proteinadsorption	33
4.4.1	Enthalpie gesteuerte Prozesse	33
4.4.2	Entropie gesteuerte Prozesse	33

5	Experimenteller Teil	35
5.1	Material	35
5.1.1	Chemikalien	35
5.1.2	Phosphatpuffer und Proteinlösung	35
5.1.3	Herstellung der Schmelzproben	35
5.1.4	Komposite	36
5.1.5	Probekörpertrageschiene	36
5.1.6	Cantilever	36
5.2	Methoden	38
5.2.1	Rasterkraftmikroskopie	38
5.2.2	ToF-SIMS Analyse	40
5.2.3	Kontaktwinkelanalyse	40
6	Oberflächenfunktionalisierung	41
6.1	Silanisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan	41
6.1.1	Silanisierung von Siliziumoberflächen mit APTES	41
6.1.2	Funktionalisieren der Siliziumschichten mit Glutardialdehyd und Proteinen	42
6.2	Charakterisierung der mit APTES funktionalisierten Oberflächen	42
6.2.1	Rasterlektronenmikroskopie	42
6.2.2	Ellipsometrie	43
6.2.3	Rasterkraftmikroskopie	43
6.2.4	Dynamische Kontaktwinkelanalyse	44
6.3	Oberflächenfunktionalisierung mit OTS	47
6.4	Charakterisierung der mit OTS funktionalisierten Oberflächen	47
6.4.1	Ellipsometrie	47
6.4.2	Statische Kontaktwinkelanalyse	47
6.4.3	Dynamische Kontaktwinkelanalyse	47
7	Ergebnisse und Diskussion	49
7.1	Kraftmessungen	49
7.1.1	Charakterisierung der silanmodifizierten Cantilever	49
7.1.2	Vergleich der Proteinanbindung	50
7.1.3	Kraftmessungen auf zwei Modelloberflächen zur Untersuchung der hydrophob/-hydrophilen-Wechselwirkung	54
7.1.4	Adsorptionskinetik	59
7.1.5	Protein-Fluorapatit-Wechselwirkung	62
7.1.6	Vergleich Zahnschmelzoberfläche und Dentalmaterial	68
7.1.7	Protein-Protein-Wechselwirkung	75
7.1.8	Fazit	80
7.2	Dynamische Kontaktwinkelanalyse	81
7.2.1	Protein-APTES-Schichten bei verschiedenen pH-Werten	81
7.2.2	OTS und SiO ₂	83
8	Zusammenfassung und Ausblick	89
A	RMS-Rauigkeit	91
B	Protokoll Cantileverbelegung	92
C	Berechnung der Debeylänge	93
D	Korrelationskoeffizient r^2	94
E	Flüssigkeitszelle fürs MFP	95