

**Biomimetische Oberflächenmodifikation
mit rekombinanten pilzlichen Hydrophobinen
und ihr Einfluss auf die bakterielle Biofilmbildung**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologin Annika Rieder

aus

Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2012

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von August 2008 bis März 2012 am Institut für Funktionelle Grenzflächen, Abteilung Mikrobiologie an natürlichen und technischen Grenzflächen, des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Betreuung von Herrn Dr. Thomas Schwartz und Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Biomimetische Oberflächenmodifikation mit rekombinanten pilzlichen Hydrophobinen und ihr Einfluss auf die bakterielle Biofilmbildung“ selbständig und nur mit Hilfe der erlaubten Mittel angefertigt habe. Dabei habe ich mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Karlsruhe, Oktober 2012

Annika Rieder

Im direkten Zusammenhang mit dieser Dissertation entstanden folgende Publikationen:

Rieder A, Ladnorg T, Wöll C, Obst U, Fischer R, Schwartz T. (2011). The impact of recombinant fusion-hydrophobin coated surfaces on *E. coli* and natural mixed culture biofilm formation. *Biofouling*. 27(10):1073-1085.

Rieder A, Schwartz T, Obst U, Bollschweiler C, Gutt B, Zoller J, Fischer R. (2010). Hydrophobins - using hydrophobins to prevent microbial biofilm growth on mineral surfaces. *Geotechnologies Science Report*. 16:3-18.

Weitere, über das Thema der vorliegenden Dissertation hinausgehende, Publikationen:

Kirschhöfer F, Rieder A, Prechtl C, Kühl B, Sabljo K, Wöll C, Obst U, Brenner-Weiß G. (2013). Quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) coupled to on-chip MALDI-ToF mass spectrometry as a tool for characterising proteinaceous conditioning films on functionalised surfaces. in preparation

Gusbeth C, Frey W, Schwartz T, Rieder A. (2009). Critical comparison between the pulsed electric field and thermal decontamination methods of hospital wastewater. *Acta Phys Pol A*. 115:1092-94.

Rieder A, Schwartz T, Schön-Hölz K, Marten SM, Süß J, Gusbeth C, Kohnen W, Swoboda W, Obst U, Frey W. (2008). Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field (PEF) treatment of clinical wastewater. *J Appl Microbiol*. 105:2035–2045.

Alber BE, Olinger M, Rieder A, Kockelkorn D, Jobst B, Hügler M, Fuchs G. (2006). Malonyl-coenzyme A reductase in the modified 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic carbon fixation in archaeal *Metallosphaera* and *Sulfolobus* spp. *J Bacteriol*. 188 (24):8551-8559.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Biofilme – Städte der Mikroben	1
1.1.1 Biofilme beherrschen die Welt – „die Guten und die Bösen“	2
1.1.2 Entstehung und Struktur von Biofilmen.....	4
1.2 Konzepte zur Beeinflussung der Biofilmentwicklung.....	7
1.2.1 Modifikation physikochemischer Oberflächeneigenschaften	7
1.2.2 Gestaltung biomimetischer Oberflächen.....	16
1.2.3 Spezifische Funktionalisierung von Oberflächen	17
1.2.4 Integration funktioneller Substanzen in Release Coatings	18
1.3 Biomimetische Oberflächenmodifikation mit Hydrophobinen	18
1.3.1 Funktion der Hydrophobine in Pilzen	19
1.3.2 Struktur und Eigenschaften natürlicher Hydrophobine	20
1.3.3 Hydrophobine für Oberflächenmodifikationen.....	23
1.4 Motivation und Aufgabenstellung	24
2. ERGEBNISSE	27
2.1 Charakterisierung der rekombinanten Fusionshydrophobine	27
2.1.1 Die Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B	27

2.1.2	Reinheit und Enzymaktivitäten der Hydrophobinlösungen	28
2.1.3	Spaltung und Aufreinigung der Fusionshydrophobine.....	30
2.2	Einfluss der Fusionshydrophobine auf das Bakterienwachstum	31
2.2.1	Kirby-Bauer Diffusionstest	31
2.2.2	Quantitative Bestimmung der Empfindlichkeit verschiedener Bakterien..	32
2.2.3	Einfluss der Hydrophobine auf die Kultivierbarkeit von Bakterien	34
2.2.4	Zusammenfassung	35
2.3	Biomimetische Oberflächenmodifikation mit Fusionshydrophobinen	36
2.3.1	Anlagerungsverhalten von H*Protein A und H*Protein B	36
2.3.2	Veränderung der Oberflächenhydrophobizität	38
2.3.3	Beschichtungshomogenität mit Immunfluoreszenzmikroskopie	44
2.3.4	Etablierung eines Standardbeschichtungsprotokolls.....	45
2.3.5	Charakterisierung der Beschichtungshomogenität auf der Nanoskala	46
2.3.6	Spektroskopische Untersuchungen der Hydrophobinbeschichtung	50
2.3.7	Bestimmung der angelagerten Hydrophobinmenge und Schichtdicke	52
2.3.8	Stabilität der Hydrophobinbeschichtung.....	54
2.3.9	Zusammenfassung	56
2.4	Einfluss der Hydrophobinbeschichtung auf die Biofilmbildung	57
2.4.1	Primäre bakterielle Adhäsion und frühe Stadien der Biofilmbildung	58
2.4.2	Ausgereifte Biofilme.....	64
2.4.3	Zusammenfassung	68
2.5	Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung	68
2.5.1	Strategie: Funktionalisierung über eine Streptavidin-Brücke.....	69
2.5.2	1. Schritt: Biotinylierung der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen....	70
2.5.3	2. Schritt: Bindung von Streptavidin	71
2.5.4	3. Schritt: Immobilisierung von antimikrobiellen Substanzen.....	72
2.5.5	Proof of Principle: Nachweis und Quantifizierung der Funktionalisierung	75
2.5.6	Zusammenfassung	79
2.6	Einfluss der Funktionalisierung auf das Bakterienwachstum	80
2.6.1	antimikrobielle Aktivität der funktionalisierten Oberflächen	80
2.6.2	Einfluss auf das bakterielle Biofilmwachstum – statisches System	82

2.6.3	Einfluss auf das bakterielle Biofilmwachstum – Durchfluss-System	85
2.6.4	Zusammenfassung	90
3.	DISKUSSION	91
4.	MATERIAL UND METHODEN	99
4.1	Herstellung von Hydrophobinlösungen	99
4.2	Physikalisch-chemische Oberflächenanalytik.....	99
4.2.1	Oberflächenbeschichtung mit rekombinanten Fusionshydrophobinen	99
4.2.2	Statische Kontaktwinkelmessung	100
4.2.3	Untersuchung der Oberflächenmorphologie	101
4.2.4	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS).....	102
4.2.5	Quarzkristall-Mikrowaage (QCM-D).....	103
4.3	Proteinbiochemische Untersuchungen.....	105
4.3.1	Bromcyanspaltung der Fusionshydrophobine	105
4.3.2	Aufreinigung der Fusionshydrophobine über Affinitätschromatographie	106
4.3.3	Auftrennung der Hydrophobine über SDS-PAGE	106
4.3.4	Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung	107
4.3.5	Kontrolle der Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung	109
4.3.6	Quantifizierung der Biotinylierung der antimikrobiellen Substanzen.....	109
4.3.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	110
4.4	Immunologische Nachweismethoden	110
4.4.1	Immunologischer Nachweis der Hydrophobinbeschichtung	111
4.4.2	Nachweis der Biotinylierung der Hydrophobinbeschichtung.....	112
4.4.3	Immunologischer Nachweis der Lysozymimmobilisierung	112
4.5	Mikrobiologische Untersuchungen	113
4.5.1	Bakterien	113
4.5.2	Nährmedien.....	113
4.5.3	Bakterienanzucht und Biofilmkultivierung	114
4.5.4	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten	117

4.5.5	Kristallviolett-Assay	118
4.5.6	Resazurin-Assay	118
4.6	Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften	119
4.6.1	Methode der Bouillon-Mikrodilution (MHK-Bestimmung).....	119
4.6.2	Kirby-Bauer Diffusionstest (Agardiffusionstest).....	121
4.6.3	Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität (ASTM E 2149)	121
4.6.4	Turbidity Assay zur Analyse der Lysozymaktivität	122
4.7	Mikroskopische Methoden	123
4.7.1	Fluoreszenzfärbungen.....	123
4.7.2	Bestimmung der Oberflächenbedeckung.....	124
4.8	Molekularbiologische Methoden	124
4.8.1	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (PCR-DGGE).....	124
5.	LITERATURVERZEICHNIS	126
	DANKSAGUNG	138

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFM	<i>atomic force microscope</i> (Rasterkraftmikroskop)
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BHI	<i>brain-heart infusion</i> (Hirn-Herz Bouillon)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder Serum Albumin)
CA	<i>contact angle</i> (Kontaktwinkel)
CaCl ₂	Calciumchlorid
CTC	5-Cyano-2,3-ditolychlorid
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DTT	Dithiothreitol
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IRRAS	<i>infrared reflection absorption spectroscopy</i> (Infrarot Spektroskopie)
KBE	koloniebildende Einheit
MH	Müller-Hinton
MHK	minimale Hemmkonzentration
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PEG	Polyethylenglycol
QCM-D	<i>quartz crystal microbalance with dissipation monitoring</i> (Quarzkristall-Mikrowaage)
REM	Rasterelektronenmikroskop
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecyl-Sulfat)
SiO ₂	Siliziumdioxid
ZOI	<i>zone of inhibition</i> (Inhibitionszone)

ZUSAMMENFASSUNG

Biofilme sind eine spezielle und sehr erfolgreiche mikrobielle Lebensform. Sie sind ubiquitär verbreitet und haben einen ambivalenten Einfluss auf die Umwelt, technische Systeme und die menschliche Gesundheit. Biofilme sind einerseits ein bewährter Bestandteil der Abwasseraufbereitung und essentiell für den Abbau von umweltschädigenden Substanzen, auf der anderen Seite können sie jedoch auch eine Quelle von Kontaminationen mit Pathogenen darstellen und damit zu erheblichen Problemen im medizinischen Bereich oder der Lebensmittelindustrie führen. Die gezielte Beeinflussung der Biofilmbildung ist daher von großem Interesse. Neben der Immobilisierung spezifischer Funktionsmoleküle wird vor allem die Modifikation von physikochemischen Oberflächenparametern und die damit verbundene Beeinflussung der initialen bakteriellen Adhäsion als Erfolg versprechendes Konzept angesehen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Verwendung von rekombinant erzeugten Hydrophobinen für biomimetische Oberflächenmodifikationen als eine sehr vielversprechende und umweltverträgliche Variante der Biofilmanipulation.

Hydrophobine sind nicht immunogene, nicht toxische, und sehr oberflächenaktive pilzliche Proteine, die sich in stabilen Monolagen auf unterschiedlichen Oberflächen anlagern und die Oberflächenhydrophobizität verändern. Die ausgebildeten Proteinschichten besitzen eine Amyloid-ähnliche Struktur und sind außerordentlich stabil. Die Anwendung der Hydrophobine für Oberflächenmodifikationen war bisher aufgrund ihrer geringen Verfügbarkeit limitiert. Die BASF-SE konnte jetzt ein Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Hydrophobinen, bestehend aus dem Klasse I Hydrophobin DewA aus *Aspergillus nidulans* und einem N-terminalen Fusionspartner, etablieren.

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B der BASF-SE wurden in dieser Arbeit zur Oberflächenmodifikation eingesetzt und ein Standardprotokoll zur Beschichtung von unterschiedlichen Referenzmaterialien etabliert. Das Anlagerungsverhalten der Hydrophobine wurde online mit der Quarzkristall-Mikrowaage (QCM-D) untersucht und zeigte eine deutliche Abhängigkeit vom verwendeten Puffersystem. In Tris-Puffer mit 1 mM CaCl₂ lagerten sich H*Protein A und H*Protein B temperatur- und zeitabhängig an hydrophile und hydrophobe Referenzoberflächen an und veränderten die Oberflächenhydrophobizität. Kontaktwinkelmessungen (CA) und Untersuchungen der Beschichtungshomogenität auf der Mikro- und Nanoskala mit Immunfluoreszenzmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie zeigten, dass mit einer Inkubationszeit von 16 Stunden und einer Beschichtungstemperatur von 80°C die größte Veränderung der Oberflächenhydrophobizität und gleichzeitig eine homogene, hochgeordnete Beschichtung erreicht werden konnte. Auf hydrophilen Ausgangsmaterialien wie Glas (CA 11°) und Keramik (CA 45°) führte die Hydrophobinbeschichtung zu einer Erhöhung des Kontaktwinkels auf 80°. Die 14-17 nm dicke Proteinschicht war stabil und wurde durch die Behandlung mit Pufferlösungen,

Detergenzien oder Säuren nicht abgelöst. Quantitative QCM-D Messungen zeigten, dass sich pro Quadratmeter 14-17 mg H*Protein A und H*Protein B anlagerten.

Die biomimetische Oberflächenmodifikation auf der Basis der rekombinanten Fusionshydrophobine wies eine Analogie zu den natürlichen Hydrophobinen mit ihren vielversprechenden Eigenschaften auf und belegte ihre Eignung auch für großflächige Oberflächenbeschichtungen.

Die Untersuchung des Einflusses der rekombinanten Hydrophobine auf das Bakterienwachstum zeigte, dass diese in Suspension antibakteriell gegenüber verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Referenzbakterien wirken. In Abhängigkeit von der verwendeten Bakterienart lag die minimale Hemmkonzentration für H*Protein A und H*Protein B zwischen 0,63-5 mg/mL. Hydrophobin-beschichtete Oberflächen wiesen dahingegen keine antibakterielle Aktivität auf. Die Oberflächenmodifikation hatte jedoch einen Einfluss auf die initiale Bakterienanlagerung. In Abhängigkeit von der Bakterienart und dem Wachstumsmedium kam es zu einer veränderten primären Adhäsion und frühen Biofilmbildung. Wie mit Epifluoreszenzmikroskopie und über die Quantifizierung der kultivierbaren Bakterien gezeigt werden konnte, adhärierte das Referenzbakterium *Escherichia coli* verstärkt auf Hydrophobin-modifizierten Oberflächen. Auch natürliche Mischpopulationen unbekannter Zusammensetzung adhärten verstärkt auf Hydrophobin-beschichteten Oberflächen. Diese anfänglichen Adhärenzverstärkungen wirkten sich jedoch nicht auf die weitere Entwicklung der Biofilme aus. In ausgereiften Biofilmen auf Hydrophobin-modifizierten und Kontrolloberflächen konnten mit Epifluoreszenzmikroskopie keine Unterschiede in der Biofilmstruktur oder räumlichen Verteilung detektiert werden. Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien und die qualitativ mit einer molekularbiologischen Fingerabdruck-Methode (PCR-DGGE) untersuchte Populationszusammensetzung, wiesen ebenfalls keine Unterschiede auf.

Weiterführend wurde die biomimetische Oberflächenbeschichtung mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen funktionalisiert, um die positiven Eigenschaften der Beschichtung, wie das effektive Self-Assembly Verhalten, mit antibakteriellen bzw. antifouling Wirkungen zu koppeln. Die Funktionalisierung wurde schrittweise aufgebaut, wobei zuerst die Hydrophobinbeschichtung biotinyliert, anschließend über Self-Assembly eine Streptavidin-Monolage auf dieser Oberfläche generiert und zuletzt exemplarisch die biotinylierten antimikrobiellen Substanzen Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin gebunden wurden. Die einzelnen Schritte der sequentiellen Funktionalisierung konnten immunologisch bzw. fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen und online mit QCM-D detektiert werden. Exemplarisch wurde die Menge an immobilisiertem Lysozym quantifiziert. Pro Quadratmeter wurden abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration 1,6-4,6 pg Lysozym stabil immobilisiert.

Eine antibakterielle Aktivität der Lysozym funktionalisierten Oberfläche konnte jedoch nur in einem statischen Versuchsaufbau nachgewiesen werden. Die Rolle des sogenannten „Conditioning Films“ ist Gegenstand nachfolgender Untersuchungen.

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B lassen sich für großflächige biomimetische Oberflächenmodifikationen sehr effektiv nutzen und können darüber hinaus für gezielte Oberflächenfunktionalisierungen verwendet werden. Durch die anwendungsorientierte Funktionalisierung kann eine spezifische Manipulation des Biofilmwachstums eingeführt und gleichzeitig ein breites Anwendungsspektrum abgedeckt werden.

SUMMARY

Biofilms are a special and very successful microbial form of life. They are ubiquitous and have an ambivalent impact on nature, technical systems and human health. On the one hand biofilms are a substantial part of waste water treatment and essential for degradation of substances which are harmful to the environment. However, on the other hand they might be as well a source of contamination with pathogens leading to considerable problems in the medical field or food industry. Therefore, the specific manipulation of biofilm formation is of great interest. In addition to the immobilization of specific functional molecules, the modification of physico-chemical surface characteristics and the resulting influence of the initial bacterial adhesion is considered to be a promising concept.

The aim of this work is to use recombinantly produced hydrophobins for biomimetic surface modification as a very promising and environmentally compatible variant of biofilm manipulation.

Hydrophobins are non-immunogenic, non-toxic and very surface active fungal proteins, which self-assemble in stable monolayers on a variety of surfaces and change the surface hydrophobicity in an amphipathic manner. The formed protein layers have an amyloid-like structure and are very stable. So far, the use of hydrophobins for surface modifications was limited by low availability. Recently, the BASF-SE successfully established a procedure for biotechnological production of hydrophobins, consisting of the class I hydrophobin DewA of *Aspergillus nidulans* and an N-terminal fusionpartner, in kilogram scale.

The recombinant fusionhydrophobins H*Protein A and H*Protein B of the BASF-SE were used in this work for surface modification and a standardized protocol for coating of various reference materials was established. The adsorption dynamics of hydrophobins were analyzed online with quartz crystal microbalance (QCM-D) measurements and showed a considerable dependence on the used buffer system. H*Protein A and H*Protein B adsorbed in Tris-buffer with 1 mM CaCl₂ on hydrophilic and hydrophobic reference materials in a temperature- and time-dependent manner and changed the surface hydrophobicity. Contact angle (CA) measurements and the analysis of the coating homogeneity on the micro- and nanoscale by immunofluorescence microscopy, atomic force microscopy and scanning electron microscopy showed that with an incubation time of 16 hours and a coating temperature of 80°C the highest change in surface hydrophobicity and, at the same time, a homogenous, highly ordered coating could be reached. On hydrophilic reference materials like glass (CA 11°) and ceramics (CA 45°) the hydrophobin coating resulted in an increased contact angle of 80°. The 14-17 nm thick protein layer was stable and could not be disassembled by treatment with buffer solutions, detergents or acids. Quantitative QCM-D measurement showed that 14-17 mg H*Protein A and H*Protein B adsorbed per square meter.

The biomimetic surface modification with the recombinant fusionhydrophobins had analogies with the natural hydrophobins and their promising characteristics and H*Protein A and H*Protein B proved their suitability for large scale surface coatings.

The analysis of the impact of the recombinant hydrophobins on different Gram-positive and Gram-negative reference bacteria showed that H*Protein A and H*Protein B have an antibacterial effect in solution. Depending on the used type of bacteria the minimal inhibitory concentration for fusionhydrophobins was between 0.63-5 mg/mL. Hydrophobin-coated surfaces showed no antibacterial activity but the surface modification had an impact on initial bacterial adhesion. Depending on the type of bacteria and the growth medium a changed primary adhesion and early biofilm formation was detectable. Fluorescence microscopy and the quantification of cultivable bacteria showed that the reference bacterium *Escherichia coli* adhered in higher numbers on hydrophobin-modified surfaces. Natural mixed populations with an unknown composition adhered in higher numbers on hydrophobin-modified surfaces as well. This primarily increased adhesion had no impact on further biofilm development. In matured biofilms on hydrophobin-modified and control surfaces no differences in biofilm structure and spatial distribution could be detected by fluorescence microscopy. The number of cultivable bacteria and the population composition, qualitatively analyzed with a molecular-biological fingerprint-method (PCR-DGGE), showed no differences as well.

Based on the previous results, the biomimetic surface coating with the recombinant fusionhydrophobins was functionalized to combine the positive characteristics of the coating, like the effective self-assembly behavior, with antibacterial or antifouling effects. The functionalization was built up stepwise. First the hydrophobin coating was biotinylated, then a streptavidin monolayer was generated by self-assembly and at last the biotinylated substances lysozyme, polymyxin B and vancomycin were exemplarily bound. The individual steps of the sequential functionalization were proved immunological or fluorescence microscopical and detected with online QCM-D measurements. Exemplarily the amount of immobilized lysozyme was quantified. Depending on the used protein concentration 1.6-4.6 pg lysozyme were bound per square centimeter. An antibacterial effect of lysozyme functionalized surfaces could only be proven in static systems. The role of the so called "conditioning film" will be analyzed in further experiments.

The recombinant fusionhydrophobins H*Protein A and H*Protein B can be effectively used for large-scale biomimetic surface modifications and moreover for specific surface functionalization. With application-oriented functionalization a specific manipulation of biofilm formation can be established and simultaneously a wide spectrum of applications can be covered.

1. EINLEITUNG

1.1 Biofilme – Städte der Mikroben

Biofilme sind funktionale mikrobielle Gemeinschaften, die in einer selbstproduzierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingelagert sind und aneinander und/oder an Oberflächen haften (Costerton und Lewandrowski 1995). Mikrobielle Biofilme stellen eine spezielle, sehr erfolgreiche Lebensweise der Bakterien dar, die zu den ältesten Lebensformen auf der Erde gehört. Die ersten bekannten Funde von versteinerten Biofilmen in Stromatolithen sind etwa 3,5 Milliarden Jahre alt (Schopf *et al.* 1983).

Wie neueste Studien zeigen, sind Biofilme sehr komplexe und dynamische Systeme, die Merkmale sowohl von ursprünglichen vielzelligen Organismen als auch breitgefächerten Ökosystemen aufweisen (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Bakterien bevorzugen diese erfolgreiche, Oberflächen-gebundene, sessile Lebensweise im Vergleich zum planktonischen Wachstum. Es konnte bisher keine Bakterienspezies beobachtet werden, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen nur in planktonischer Form vorkommt (Christensen 1989; Carpentier und Cerf 1993). Die Biofilmbildung stellt eine Lebensweise dar, die es den Mikroorganismen erlaubt, in einer feindlichen Umgebung zu überleben und sich zu verbreiten, um neue Nischen zu besiedeln (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Die Mikroorganismen profitieren in dieser symbiotischen Organisationsform vom Austausch von Stoffwechselprodukten, von genetischer Flexibilität und vom Schutz, den ein Biofilm im Vergleich zum planktonischen Wachstum bietet. Bakterielle Lebensgemeinschaften weisen Eigenschaften, Verhaltensweisen und Überlebensstrategien auf, die die Fähigkeiten einzelner Bakterien weit übersteigen. Biofilme bieten Mikroorganismen Schutz vor einer Vielzahl von Umweltfaktoren wie z.B. UV-Strahlung (Espeland und Wetzel 2001), Dehydrierung (Le Magrex-Debar *et al.* 2000) oder antimikrobiellen Substanzen. So sind z.B. Bakterien einer Spezies im Biofilm, im direkten Vergleich zur planktonischen Population, gegenüber deutlich erhöhten Antibiotikakonzentrationen (1000fache minimale Hemmstoffkonzentration für planktonische Bakterien) resistent (Ceri *et al.* 1999).

In natürlicher Umgebung ist ein Biofilm fast ausnahmslos eine Lebensgemeinschaft aus vielen verschiedenen bakteriellen Spezies. Hier werden Bakterien beherbergt, die sich ansiedeln, aber auch den Biofilm wieder verlassen, in hohem Maße ihr genetisches

Material teilen und bestimmte Nischen ausfüllen. Ähnlich unserer Städte sind Biofilme komplexe, hochdifferenzierte, multikulturelle Gemeinschaften (Watnick und Kolter, 2000).

1.1.1 Biofilme beherrschen die Welt – „die Guten und die Bösen“

In unserer Umwelt sind Biofilme ubiquitär. In natürlichen aquatischen Ökosystemen ist die Anzahl an Oberflächen-assoziierten Mikroorganismen sehr viel größer als die Anzahl an frei schwimmenden Organismen (Zobell 1943). Alle bisher bekannten Bakterienspezies können zusätzlich zur planktonischen, frei schwimmenden, Lebensform auf den unterschiedlichsten natürlichen und synthetischen Oberflächen Biofilme etablieren. Es gibt praktisch keine Oberfläche, die nicht von Mikroorganismen besiedelt wird oder, unter geeigneten Bedingungen, besiedelt werden kann. Biofilme entstehen überall dort, wo Mikroorganismen, eine Grenzfläche, ausreichend Feuchtigkeit und Nährstoffe vorhanden sind (Flemming 1991; Martienssen 2001).

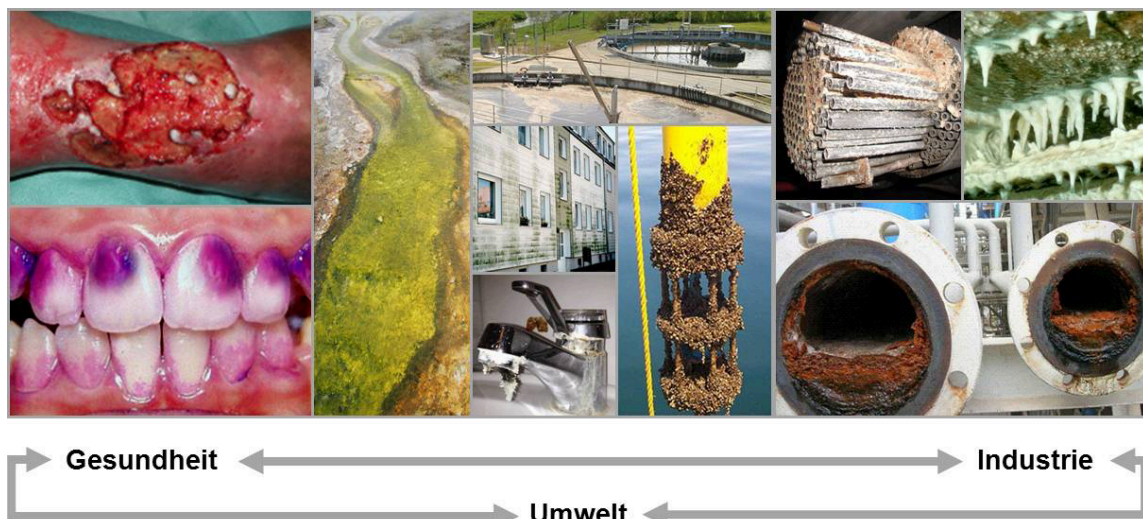


Abbildung 1. Biofilme sind die bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen und auf den unterschiedlichsten natürlichen und synthetischen Oberflächen zu finden. Sie haben einen großen, ambivalenten Einfluss auf die menschliche Gesundheit, die Umwelt und technische Systeme. (Abbildungen aus unterschiedlichen Quellen; Quellenangaben siehe Literaturverzeichnis).

Biofilme haben einen großen, ambivalenten Einfluss auf die Umwelt, technische Systeme und die menschliche Gesundheit (Abbildung 1).

Mikrobielle Biofilme sind ein wesentlicher Bestandteil der natürlichen Umwelt und in ihrer Wirkung als „biologischer Filter“ ein entscheidender und bewährter Bestandteil von Aufbereitungstechniken, wie zum Beispiel der Trinkwasser- oder Abwasseraufbereitung. Sie tragen dazu bei die Menge der organischen Substanzen im Wasser zu vermindern. Biofilme sind auch ein unschätzbare Hilfsmittel für die biologische

Sanierung, d.h. den Ab- und Umbau von schädlichen Substanzen, die unter konventionellen Bedingungen als schwer oder nicht abbaubar gelten (Suidan und Nakhla 1988). So wurden unter anderem für heterozyklische Aromaten (Höke und Hempel 1990) oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe mit Biofilmtechnologien deutlich bessere Abbauleistungen erzielt als mit konventionellen Verfahren (Klein *et al.* 1991; Martienssen 2001).

Die unerwünschte Ausbildung von mikrobiellen Belägen, allgemein als „Biofouling“ bezeichnet (Characklis und Marshall 1990), führt jedoch auch zu erheblichen Problemen und finanziellen Einbußen in der Industrie, der Schifffahrt und der Medizin.

So kann durch Biofouling in der Industrie die Leistungsfähigkeit von Anlagen verringert und die Lebensdauer von Anlagenteilen erheblich verkürzt. Biofilmwachstum ist in nahezu allen wasserbasierenden industriellen Prozessen zu finden, wie z.B. der Papierherstellung (Väisänen *et al.* 1998), der Lebensmittelverarbeitung (Wirtanen und Salo 2003) oder dem Betrieb von Kühltürmen und Heizsystemen (Characklis *et al.* 1981). Biofouling in Umkehrosmose- oder Ultrafiltrationsanlagen kann zu einer vollständigen und irreversiblen „Verblockung“ der Membranen führen (Martienssen 2001). Auf Grund der großen Tendenz von Bakterien zur Anlagerung auf Oberflächen finden sich nach wenigen Wochen in wasserführenden Kompartimenten regelmäßig persistierende Besiedlungen mit unterschiedlichen bakteriellen Spezies (Boe-Hansen *et al.* 2003). Diese mikrobiellen Beläge sind an der Alterung und Zerstörung der Materialien durch z.B. mikrobiell induzierte Korrosion beteiligt. Biofilme können Rohrleitungen verstopfen und insbesondere bei Trinkwasser, durch die kontinuierliche Freisetzung von (pathogenen) Bakterien, zur Beeinträchtigung der Wasserqualität führen.

Die offensichtlichste Form des Biofouling ist in der Meeresumwelt zu finden. Hier werden Schiffe, Anlegestellen, Bojen, Plattformen, Sonargeräte und Unterwasserkabel von Mikroorganismen, Algen und Seepocken besiedelt. Dies führt neben der Korrosion und einem möglichen Sicherheitsrisiko auch zu einem erhöhten Strömungswiderstand der Schiffe, und somit einer langsameren Geschwindigkeit, einem steigenden Treibstoffverbrauch und einer höheren Motorenbelastung (Bixler und Bhushan 2012). Ein 1 mm dicker Biofilm auf einem Schiffsrumpf erhöht den Widerstand um 80% was zu einem Geschwindigkeitsverlust von 15% führt (Gordon und Mawatari 1992).

Für den Menschen sind Biofilme ein großes Gesundheitsrisiko, wenn sie sich auf (dentalen) Implantaten, Kathetern, Biosensoren oder medizinischem Equipment ausbilden. Pathogene Bakterien aus diesen Biofilmen stellen eine kontinuierliche Infektionsquelle für die Patienten dar. Mehr als 45% der Krankenhausinfektionen sind auf Biofilm-verunreinigte medizinische Geräte zurückzuführen (Bixler und Bhushan 2012). Die charakteristische, hohe Resistenz von Bakterien in Biofilmen gegenüber antibakteriellen Substanzen erschwert die Verhinderung von Biofilmwachstum. Orthopädische Implantate müssen aufgrund von Infektionen häufig ausgetauscht werden, was das Mortalitätsrisiko und Abstoßungsreaktionen erhöht (Smeltzer *et al.* 2009). Auch

der Plaque auf den Zähnen ist ein Biofilm. Hier ist die mikrobielle Anlagerung an der Entstehung von Karies und Parodontitis beteiligt.

Wie gezeigt, spielen Biofilme eine ambivalente Rolle. Sie sind einerseits ein wesentlicher Bestandteil der natürlichen Umwelt und essentiell für z.B. die Trinkwasser- oder Abwasseraufbereitung. Auf der anderen Seite stellen mikrobielle Anlagerungen ein signifikantes Gesundheitsrisiko dar und können zu erheblichen Problemen und finanziellen Einbußen in der Industrie, der Schifffahrt und der Medizin führen. Um Biofilme gewinnbringend nutzen zu können, oder Biofouling zu vermeiden, sind daher grundlegende Kenntnisse über die Entstehung und die Struktur von Biofilmen notwendig.

1.1.2 Entstehung und Struktur von Biofilmen

Biofilme sind die bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen und weisen eine große Heterogenität und Variabilität hinsichtlich ihrer Zusammensetzung auf. Obwohl viele unterschiedliche Faktoren die Biofilmbildung beeinflussen, zeigen alle Biofilme einen weitgehend strukturierten Aufbau (Costerton *et al.* 1999, 2001). Für die Biofilmentwicklung von *Pseudomonas aeruginosa* wurden anhand von Proteomuntersuchungen fünf regulierte, aufeinanderfolgende Entwicklungsstufen postuliert (Sauer *et al.* 2002; Stoodley *et al.* 2002). Diese Stadien der Biofilmentwicklung sind in einer bemerkenswert großen Anzahl an Prokaryoten konserviert und können als charakteristisches Schema für die Abfolge der Biofilmbildung angesehen werden (Hall-Stoodley *et al.* 2004) (Abbildung 2).

Der erste Schritt beim Übergang vom planktonischen zum sessilen Wachstum ist die primäre Adhäsion der Bakterien an eine Oberfläche. Diese ist, durch den Kontakt mit dem umgebenden Medium, mit einem heterogenen „Conditioning Film“ aus organischen und/oder anorganischen Substanzen bedeckt (Frant 2008). Die initiale, reversible Adhäsion der Bakterienzellen an eine konditionierte Oberfläche ist ein zufälliges Ereignis, das durch die physikochemischen Oberflächeneigenschaften des Materials und die räumliche Nähe der Bakterien zur Oberfläche beeinflusst wird. Die Bakterien kommen in die Nähe der Oberfläche durch Diffusion infolge der Brownschen Molekularbewegung, durch konvektiven Transport infolge von Strömungen des flüssigen Mediums oder durch aktive Bewegung (Van Loosdrecht *et al.* 1990). Die primäre Adhäsion der Bakterien an die Oberfläche ist ein vorwiegend physikochemischer Prozess. Durch die Produktion von EPS und der Ausbildung von molekularen Interaktionen zwischen den Bakterien und der Oberfläche kommt es in der zweiten Phase der Biofilmentwicklung zu einer festeren, irreversiblen Anhaftung der Bakterien. Durch die Teilung der adhärenen Zellen entsteht ein „Linking Film“, auf dem die weitere Anlagerung von Bakterien stattfindet (Jenkinson und Lappin-Scott 2001). Der dritte Schritt der

Biofilmentwicklung wird bestimmt durch das Wachstum der Mikroorganismen und die Anlagerung neu hinzukommender Bakterien. Hierbei stellt jedes Bakterium, das an den vorhandenen Linking Film bindet, eine neue Oberfläche mit neuen Eigenschaften dar, die die Anlagerung weiterer Organismen beeinflussen können. Irreversibel haftende Mikroorganismen vermehren sich, beginnen Mikrokolonien zu bilden, und einen mehrlagigen Biofilm aufzubauen. Im vierten Schritt wird eine Plateauphase erreicht. Hier stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem weiteren Aufwachsen des Biofilms und seinem Abtrag ein. Die Dicke des Biofilms kann, je nach Umgebungsbedingungen, wenige Mikrometer bis mehrere Zentimeter betragen (Frant 2008). Aus den ausgereiften Biofilmen werden in der fünften Phase einzelne Bakterienzellen freigesetzt, die erneut an Oberflächen adhären können und zur Ausbreitung des Biofilms beitragen.

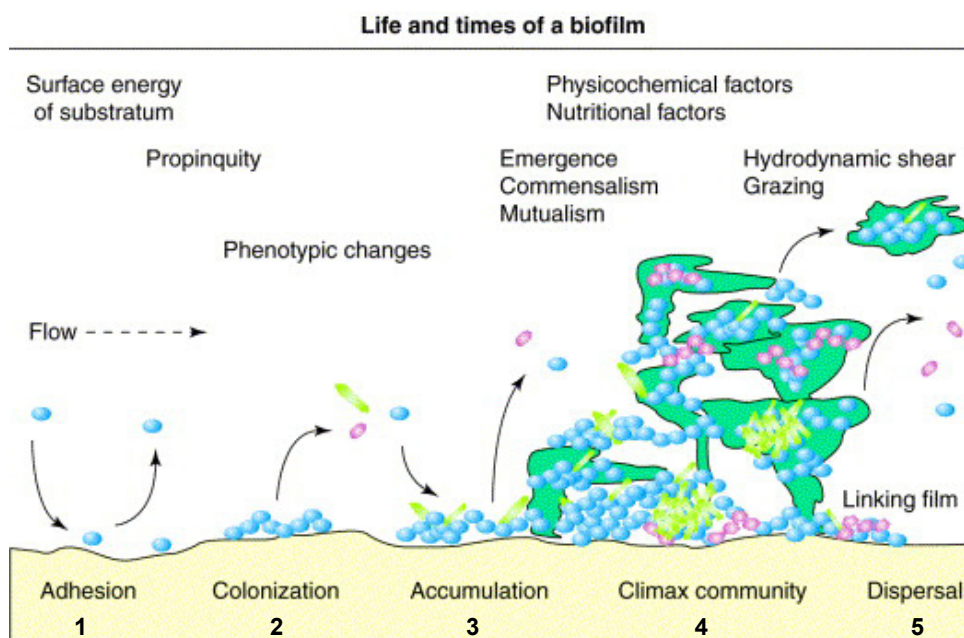


Abbildung 2. Der Entwicklungszyklus eines Biofilms besteht aus fünf aufeinanderfolgenden Schritten, die durch eine Vielzahl von physikalischen, biologischen und Umweltfaktoren beeinflusst werden können. Die primäre Adhäsion (1) an eine Oberfläche ist ein zufälliges Ereignis, das durch die Oberflächeneigenschaften und die räumliche Nähe der Bakterien zur Oberfläche beeinflusst wird. Adhärenente Bakterien beginnen sich zu teilen, EPS zu produzieren und die Oberfläche irreversibel zu besiedeln (2). Dieser „Linking Film“ bildet die Grundlage für die weitere Adhäsion und Akkumulation von Bakterien (3). Der ausgereifte Biofilm (4) ist eine dynamische Einheit. Bakterienzellen lagern sich an den bestehenden Biofilm an und werden aus diesem freigesetzt (5), was zum einen die Diversität des Biofilms fördert und zum anderen zu dessen Ausbreitung beiträgt. (Abbildung aus Jenkinson und Lappin-Scott 2001).

Die Entstehung von Biofilmen ist ein sehr komplexer Prozess, der von der Materialoberfläche, dem Mikroorganismus selbst, und dem umgebenden Medium, sowie der Temperatur und den hydrodynamischen Bedingungen beeinflusst wird (Flemming und Wingender 2001; Frant 2008). Sowohl der Zeitraum, der notwendig ist bis die Besiedlung der Oberfläche beginnt, als auch die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Biofilmbildung werden von unterschiedlichen Faktoren bestimmt. Oberflächeneigen-

schaften wie die Struktur (z.B. Porosität, Rauigkeit), die Polarität (z.B. Ladung) oder die chemische Zusammensetzung (z.B. Hydrophobizität) (Abbildung 3) beeinflussen die Adhäsion von Molekülen und Zellen (Rosenhahn *et al.* 2008) und haben darüber hinaus einen Einfluss auf die Struktur (Dalton *et al.* 1994) und die Festigkeit des entstehenden Biofilms (Busscher *et al.* 1995). Neben den Oberflächeneigenschaften des Materials spielen auch die Oberflächeneigenschaften der Bakterien eine entscheidende Rolle in der Biofilmentwicklung. Bakteriellen Eigenschaften wie die Hydrophobizität, die Oberflächenenergie und Oberflächenladung, sowie die spezifische Struktur der Zelloberfläche sind in gewissen Grenzen durch die beteiligten Spezies festgelegt. Sie stellen jedoch keine fest Größe dar und können in Abhängigkeit von der Wachstumsphase, vom Ernährungszustand der Zellen und unter dem Einfluss verschiedener Umweltfaktoren erheblich variieren (Martienssen 2001). Die dritte wichtige Komponente der Biofilmentwicklung ist das umgebende Medium. Dieses beeinflusst durch seine Zusammensetzung, durch die vorhandenen gelösten organischen und anorganischen Verbindungen, durch die Ionenstärke, den pH-Wert und die Temperatur, sowie durch hydrodynamische Wirkungen wie Scherkräfte den Aufbau und die Struktur der Biofilme (Martienssen 2001).

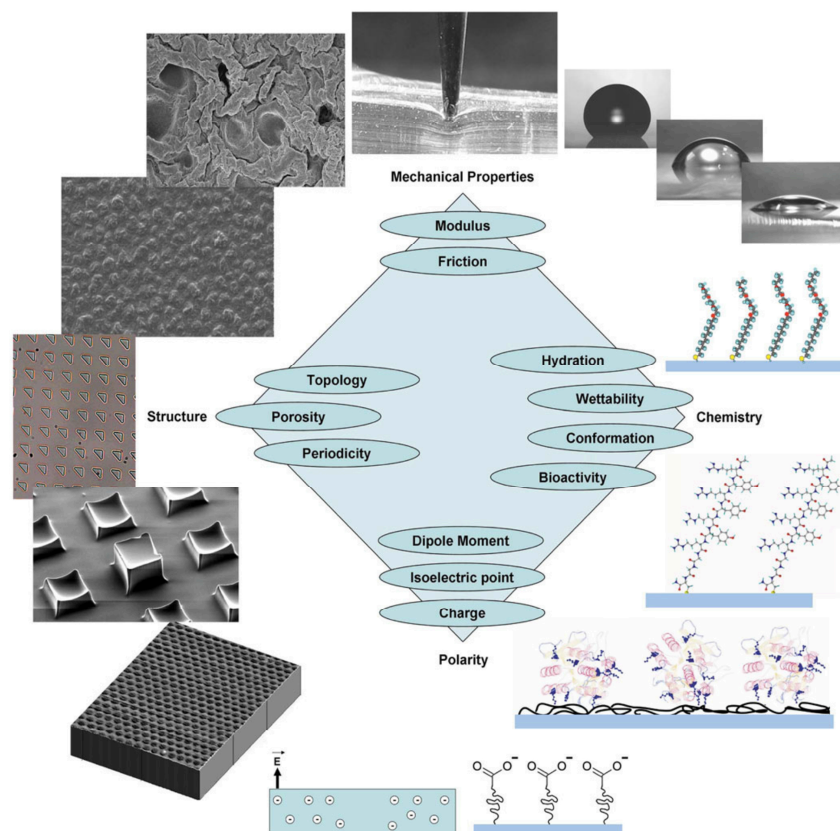


Abbildung 3. Die Oberflächeneigenschaften eines Materials wie die Struktur (z.B. Porosität, Rauigkeit), die Polarität (z.B. Ladung) oder die chemische Zusammensetzung (z.B. Hydrophobizität) beeinflussen die Adhäsion von Bakterien. (Abbildung aus Rosenhahn *et al.* 2008).

Verschiedene Faktoren können die Biofilmbildung beeinflussen. Da in natürlichen Systemen (meist) kein Einfluss auf die bakteriellen Eigenschaften und das umgebende Medium genommen werden kann, zielen die Ansätze zur Beeinflussung der Biofilmbildung auf die Modifikation der Oberflächen.

1.2 Konzepte zur Beeinflussung der Biofilmentwicklung

Biofilme sind ubiquitär und die Beeinflussung der Biofilmbildung spielt in verschiedenen Bereichen eine wichtige Rolle. In der Industrie und der Schifffahrt können durch die Verhinderung von Biofouling Beträge in Milliardenhöhe eingespart werden. Im medizinischen Bereich ist es essentiell, durch effektive Strategien die Biofilmbildung und damit mögliche Gesundheitsrisiken für den Menschen zu minimieren. Im Gegensatz dazu setzt die technische Nutzung der Leistung von Mikroorganismen oft voraus, dass diese gezielt an Oberflächen gebunden werden, um stabile Populationen für die Realisierung der gewünschten Prozesse bereitzustellen. So wurden z.B. Oberflächen mit Polyethylenglycol-Ketten (PEG) mit verschiedenen funktionellen Gruppen modifiziert, um die Bildung von nitrifizierenden Biofilmen und ihre Widerstandsfähigkeit gegen Scherkräfte in der Abwasserbehandlung zu erhöhen (Lackner *et al.* 2009).

Grundsätzlich lassen sich die Konzepte zur Manipulation von Biofilmen trotz der unterschiedlichen Anwendungsgebiete vergleichen und auf analoge Wechselwirkungsprinzipien und wissenschaftliche Modelle zurückführen. Nach Frant (2008) ergibt sich folgende Einteilung:

- Modifikation physikochemischer Oberflächenparameter mit dem Ziel, die Wechselwirkungen des Systems zu beeinflussen.
- Gestaltung biomimetischer Oberflächen, um natürlich vorkommende Mechanismen zu reproduzieren bzw. zu imitieren.
- Spezifische Funktionalisierung von Oberflächen durch die Bindung verschiedener reaktiver Gruppen (z.B. Hydroxyl-, Amino- oder Sulfatgruppen), natürlicher und synthetischer Peptide, oder größerer Moleküle.
- Integration funktioneller Substanzen in oberflächennahe Bereiche, aus denen sie kontrolliert freigesetzt werden (Release Coating).

1.2.1 Modifikation physikochemischer Oberflächeneigenschaften

Die bakterielle Adhäsion ist der initiale, essentielle Schritt der Biofilmentwicklung. Dieser reversible Prozess wird hauptsächlich durch physikochemische Wechselwirkun-

gen zwischen den Bakterien und der Oberfläche bestimmt (Van Loosdrecht *et al.* 1990). Aus heutiger Sicht ist daher die gezielte Modifikation physikochemischer Oberflächenparameter das vielversprechendste Konzept zur Manipulation der Biofilmbildung.

Physikochemische Interaktionen bestimmen die primäre bakterielle Adhäsion

Die primäre Adhäsion wird beeinflusst durch die räumliche Nähe des Bakteriums zur Oberfläche und die physikochemischen Oberflächeneigenschaften des Materials. Jede bakterielle Adhäsion setzt die Annäherung des Bakteriums an die Oberfläche, durch Diffusion, konvektiven Transport oder aktive Bewegung, voraus. Während dieses Annäherungsprozesses der Bakterien treten verschiedene Wechselwirkungen auf, die in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Bakterien und der Oberfläche, ihrem Abstand zueinander und von verschiedenen äußeren Einflussfaktoren, einen unterschiedlichen Beitrag zur Anziehung oder Abstoßung zwischen Organismus und Oberfläche leisten können (Abbildung 4).

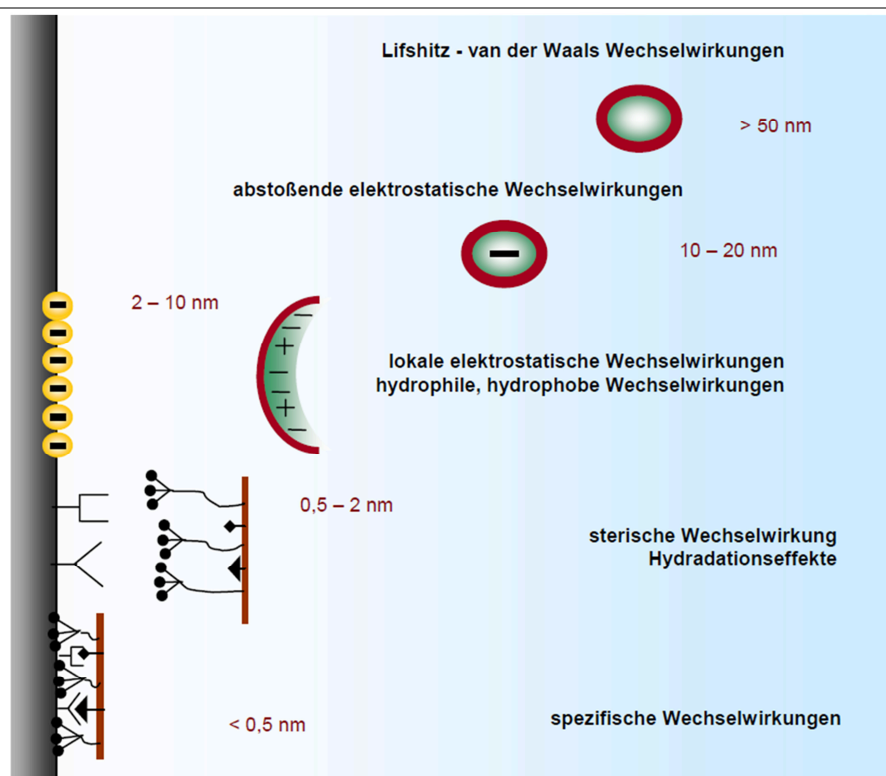


Abbildung 4. Schematische Darstellung der an der primären bakteriellen Adhäsion beteiligten Wechselwirkungen. In Abständen von mehr als 50 nm zwischen dem Bakterium und der Oberfläche wirken Lifshitz - van der Waals Kräfte. In Abständen von 10-20 nm sind zusätzlich (abstoßende) elektrostatische Wechselwirkungen aktiv. Nur in Abständen von weniger als 1,5 nm können spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Bakterium und der Oberfläche stattfinden. (Abbildung aus Frant 2008, nach Busscher und Weerkamp 1987).

Die endgültige Adhäsion wird von der Summe der anziehenden und abstoßenden Kräfte zwischen dem Bakterium und der Oberfläche bestimmt. Diese physikalischen

Interaktionen können in Abhängigkeit vom Abstand des Bakteriums zur Oberfläche in sogenannte *long-range* und *short-range* Wechselwirkungen unterteilt werden (Gottenbos *et al.* 2002). Unspezifische *long-range* Interaktionen wirken bereits in Abständen von mehr als 50 nm zwischen dem Bakterium und der Oberfläche und tragen dazu bei, das Bakterium näher an die Oberfläche zu transportieren. In Abständen von 10-20 nm werden zunehmend elektrostatische Kräfte wirksam. Diese sind von der Nettoladung der wechselwirkenden Oberflächen abhängig und wirken überwiegend repulsiv. *Short-range* Wechselwirkungen treten auf, wenn die Bakterienzelle nur noch weniger als 5 nm von der Oberfläche entfernt ist und tragen dazu bei, den Organismus fester an die Oberfläche zu binden. Diese Interaktionen sind z.B. lokale elektrostatische Wechselwirkungen, hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen, Lifshitz - van der Waals Kräfte, ionische Interaktionen und chemische Bindungen (Wasserstoffbrückenbindungen) (Katsikogianni und Missirlis 2004). Eine sehr wichtige Rolle für den Prozess der primären Adhäsion wird hierbei den hydrophoben Wechselwirkungen zugesprochen (Van Oss 1995; Martienssen 2001). Erst in einem Abstand von wenigen Nanometern zwischen dem Bakterium und der Oberfläche können spezifische Wechselwirkungen auftreten.

Theorien zur primären Adhäsion

Erreichen Bakterien die Nähe einer Oberfläche, so wird die Adhäsion von physikochemischen, anziehenden oder abstoßenden, Interaktionen bestimmt. Obwohl diese Interaktionen weitestgehend bekannt sind, existiert bis heute keine allgemeingültige Theorie, um das komplexe Gefüge von Wechselwirkungen zwischen Bakterium und Oberfläche vollständig zu beschreiben und vorherzusagen (Martienssen 2001).

Kolloide sind mikroskopisch kleine Partikel, die dieselbe Größenordnung wie durchschnittliche Bakterien (1-5 μm) aufweisen. Für die primäre bakterielle Adhäsion werden im Wesentlichen drei verschiedene Theorien diskutiert, die auf Gesetzen der Kolloid- und Grenzflächenchemie beruhen: die DLVO-Theorie, das thermodynamische Modell und die erweiterte DLVO-Theorie.

DLVO-Theorie

Die Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek Theorie (DLVO-Theorie) (Derjaguin und Landau 1941) beschreibt die Wechselwirkungen, die bei der Annäherung eines kolloidalen Partikels an eine Oberfläche auftreten. Dabei wird die Änderung der freien Enthalpie (Gibbssche Energie) in Abhängigkeit des Abstandes der interagierenden Oberflächen betrachtet. Die totale Gibbssche Energie (G_{tot}) der Wechselwirkung ergibt sich hierbei aus der Summe der Lifshitz - van der Waals Kräfte (G_{vdW}) und elektrostatischer Wechselwirkungen (G_{el}).

$$G_{\text{tot}} = G_{\text{vdW}} + G_{\text{el}}$$

G_{tot} = resultierende Gibbssche Energie (Netto-Wechselwirkung)

G_{vdW} = Lifshitz - van der Waals Wechselwirkung

G_{el} = elektrostatische Wechselwirkung

In Abhängigkeit von der Größe der beteiligten Wechselwirkungen ergibt sich ein charakteristischer Zusammenhang der in Abbildung 5 dargestellt ist.

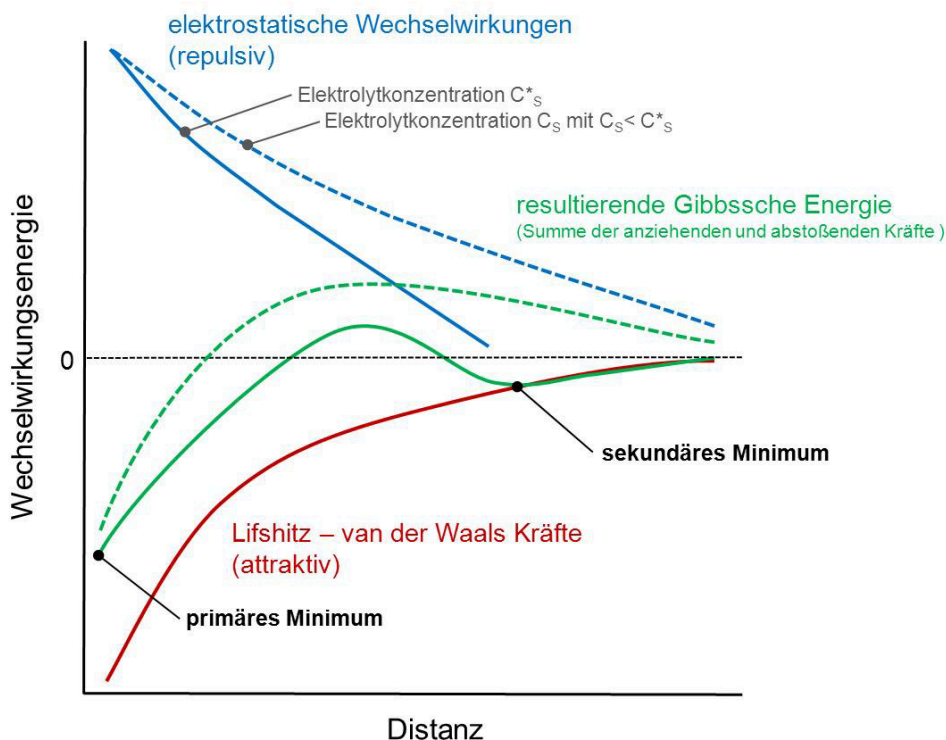


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Abstoßungs- und Anziehungswechselwirkung bei der Annäherung eines Partikels (Bakteriums) an eine Oberfläche. Der rote Graph (—) stellt die anziehenden Lifshitz – van der Waals Kräfte und die blauen Graphen die abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen bei verschiedenen Elektrolytkonzentrationen dar (— höhere Elektrolytkonz. C_s^* ; niedrigere Elektrolytkonz. C_s). Die Netto-Wechselwirkungsenergie (Gibbssche Energie — /) ergibt sich aus der Differenz der anziehenden und abstoßenden Kräfte und ist von der Elektrolytkonzentration abhängig. Je höher die Elektrolytkonzentration ist, desto kleiner ist der Energieberg, der überwunden werden muss. Bei der Annäherung des Bakteriums wird bei einem bestimmten Verhältnis der Lifshitz - van der Waals und elektrostatischen Kräfte zuerst ein sekundäres Minimum erreicht, in dem es zu einer reversiblen Adhäsion kommt. Eine festere Adhäsion an die Oberfläche findet erst in geringer Distanz zur Oberfläche in einem primären Minimum statt. (Abbildung nach Sigg und Stumm 1994).

Elektrostatische Wechselwirkungen sind stark von der Ionenstärke (Elektrolytkonzentration) der Lösung abhängig, wohingegen diese keinen Einfluss auf die Lifshitz - van der Waals Kräfte hat (Rumpf 2009). Eine starke elektrostatische Abstoßung in Lösungen mit einer geringen Elektrolytkonzentration bedingt die Ausbildung einer hohen Ener-

giebarriere, die die Anlagerung von Partikeln verhindert. Mit abnehmender elektrostatischer Abstoßung (und zunehmender Ionenstärke) vermindert sich die Höhe der Energiebarriere und es kann ein Übergang der Partikel in das primäre Minimum und damit eine irreversible Adhäsion erfolgen. Bei bestimmten Verhältnissen der Lifshitz - van der Waals und elektrostatischen Kräfte existiert in einer Distanz von 10-20 nm zwischen dem Partikel und der Oberfläche neben dem primären ein zweites weniger tief ausgeprägtes Energieminimum, das sogenannte sekundäre Minimum (Martienssen 2001). Die Adhäsion eines Bakteriums wird nach der DLVO-Theorie in eine schwache, reversible Adhäsion im sekundären Minimum und eine irreversible Adhäsion im primären Minimum, in geringer Distanz des Bakteriums zur Oberfläche, unterteilt.

Die DLVO-Theorie kann die experimentell beobachtete geringe Bakterienadhäsion an negativ geladenen Oberflächen erklären, aber nicht die Vielfalt der unterschiedlichen Adhäsionsvorgänge an anderen Oberflächen beschreiben (Katsikogianni und Missirlis 2004). In der DLVO-Theorie werden die Wechselwirkungen zwischen dem Bakterium und der Oberfläche im short-range Bereich nicht betrachtet. Das bedeutet, dass z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen oder sterische Effekte, die für die Adhäsion von erheblicher Bedeutung sind, nicht berücksichtigt werden (Martienssen 2001). Die DLVO-Theorie beschreibt nur eine der verschiedenen Komponenten im Adhäsionsprozess (Katsikogianni und Missirlis 2004), so dass viele Autoren eine weitere Theorie, das thermodynamische Modell, anwenden.

Thermodynamisches Modell

Das thermodynamische Modell nach Van Oss (Van Oss *et al.* 1988) betrachtet die Adsorption von Mikroorganismen an eine Oberfläche als einen Prozess der Minimierung der Gibbsschen Energie (freien Enthalpie) des Systems. Die Wechselwirkungen, d.h. die Grenzflächenspannungen, zwischen dem Bakterium, der Oberfläche und dem umgebenden Medium werden in der freien Energie des Systems kombiniert (Absolom *et al.* 1983).

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{ob} - \gamma_{om} - \gamma_{bm}$$

ΔG_{adh} = Änderung der freien Energie (durch die Adhäsion)

γ_{ob} = Grenzflächenspannung Oberfläche - Bakterium

γ_{om} = Grenzflächenspannung Oberfläche- Medium

γ_{bm} = Grenzflächenspannung Bakterium - Medium

Nach dieser Theorie ist eine Adhäsion thermodynamisch aufgrund des Energiegewinns favorisiert, sobald $\Delta G_{adh} \leq 0$.

Der thermodynamische Ansatz geht davon aus, dass der Adhäsionsprozess reversibel ist und sich das System in einem geschlossenen Gleichgewichtszustand befindet. Bakterien sind jedoch lebende Organismen, die in ständigem Austausch und Kontakt mit ihrer Umwelt stehen. Sie besitzen die Fähigkeit gezielt Nährstoffe in metabolische Energie umzuwandeln, und die Adhäsion kann durch physiologische Mechanismen oder die Synthese von adhäsiven Polymeren ein energieverbrauchender Prozess sein (Katsikogianni und Missirlis 2004). Aktive metabolische Prozesse sind darüber hinaus stark von Umweltfaktoren beeinflusst und können somit je nach Versuchsbedingungen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Die thermodynamische Beschreibung der bakteriellen Adhäsion ermöglicht eine Aussage über die prinzipielle Möglichkeit der Adhäsion der Organismen an die Oberfläche. Die theoretischen Berechnungen sowie experimentelle Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die bakterielle Adhäsion vor allem durch die im short-range Bereich wirksamen polaren (hydrophoben) Wechselwirkungen beeinflusst wird (Martienssen 2001). In vielen Fällen entsprechen die durch das thermodynamische Modell gewonnenen Aussagen jedoch nicht den experimentellen Ergebnissen.

Weder die DLVO-Theorie noch der thermodynamische Ansatz sind in der Lage, die Bakterienadhäsion in allen Aspekten zu erklären. Die DLVO-Theorie kann zwar aussagen, ob eine Adhäsion im primären Minimum stattfindet, aber die Stärke der Wechselwirkung kann nicht vorhergesagt werden. Es werden Lifshitz - van der Waals Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen in Abhängigkeit vom Abstand der interagierenden Oberflächen betrachtet, aber short-range Interaktionen, sterische Effekte und spezifische Wechselwirkungen werden nicht mit einbezogen. In der thermodynamischen Theorie werden vor allem polare Kräfte und Lifshitz - van der Waals Kräfte zur Erklärung der Bakterienadhäsion berücksichtigt. Die Bedeutung elektrostatischer Wechselwirkungen und des Abstandes der interagierenden Oberflächen wird jedoch nicht erfasst. Zudem wird das System als geschlossenes Gleichgewicht betrachtet.

Aus diesem Grund wurde von Van Oss (Van Oss *et al.* 1986) die erweiterte DLVO-Theorie vorgeschlagen, die Aspekte der klassischen DLVO-Theorie und des thermodynamischen Modells berücksichtigt.

Erweiterte DLVO-Theorie

Mit der erweiterten DLVO-Theorie können bei der Vorhersage der bakteriellen Adhäsion präzisere Angaben gemacht werden als mit der klassischen DLVO-Theorie, da zusätzlich zu Lifshitz - van der Waals Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen die polaren (hydrophil-hydrophoben) Wechselwirkungen des thermodynamischen Modells mit einbezogen werden (Hermansson 1999). Die Adhäsionsenergie kann ausgedrückt werden als:

$$\Delta G_{\text{adh}} = \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{el}} + \Delta G_{\text{AB}}$$

$$\Delta G_{\text{adh}} = \text{Adhäsionsenergie}$$

$$\Delta G_{\text{vdW}} = \text{Lifshitz - van der Waals Wechselwirkung}$$

$$\Delta G_{\text{el}} = \text{elektrostatische Wechselwirkung}$$

$$\Delta G_{\text{AB}} = \text{Lewis Säure-Base (polare) Interaktionen}$$

Hierbei wird, wie in der klassischen DLVO-Theorie, die Abhängigkeit vom Abstand des Bakteriums zur Oberfläche berücksichtigt (Katsikogianni und Missirlis 2004). Die Oberflächenenergiekomponente ΔG_{AB} nimmt, wie auch die Lifshitz - van der Waals Kräfte und elektrostatischen Interaktionen, mit größer werdendem Abstand zwischen den Interaktionspartnern ab. Lewis Säure-Base Interaktionen (polare Wechselwirkungen) sind in der frühen ersten Phase der Adhäsion nicht beteiligt, haben aber einen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung einer festen Bindung des Bakteriums an die Oberfläche. Verglichen mit Lifshitz - van der Waals Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen haben polare Wechselwirkungen den größten Einfluss. Lewis Säure-Base Interaktionen beschreiben anziehende hydrophobe Interaktionen und repulsive Hydratisierungseffekte und sind 10-100mal stärker als Lifshitz - van der Waals Kräfte (Katsikogianni und Missirlis 2004).

Die erweiterte DLVO-Theorie kann die bakterielle Adhäsion präziser beschreiben als die klassische DLVO-Theorie und das thermodynamische Modell. Aber auch hier wird die Adhäsion als ein rein physikochemischer Prozess betrachtet, der die Physiologie der Bakterien nicht mit einbezieht. Die physikochemischen Theorien haben geholfen verschiedene Beobachtungen zu erklären, sie können jedoch nicht das vielfältige Adhäsionsverhalten, das in bakteriellen Systemen beobachtet wird, erfolgreich beschreiben. Dies bestätigt die allgemeine Schwierigkeit, physikalische Theorien in biologischen Systemen anzuwenden.

Die Komplexität der Bakterienoberfläche und die Veränderungen in der Polymerzusammensetzung und –synthese aufgrund veränderter Umweltbedingungen können für die hohe Variabilität der beobachteten bakteriellen Adhäsionsvorgänge verantwortlich sein. Zelloberflächenproteine, Polysaccharide, Conditioning Filme auf Oberflächen, Co-Adhäsion, und biologische Veränderungen beeinflussen die Voraussetzungen für den Adhäsionsprozess in einem Ausmaß, dass eine Vorhersage aufgrund der physikochemischen Modelle fast unmöglich ist (Katsikogianni und Missirlis 2004). Die beschriebenen Theorien können nur eine Hilfestellung sein, um die bakterielle Wechselwirkung mit Oberflächen zu betrachten. Eine Vorhersage des bakteriellen Verhaltens ist nicht möglich. Schon 1989 hat Van Loosdrecht auf die Vielseitigkeit der mikrobiellen Adhäsion aufmerksam gemacht (Van Loosdrecht *et al.* 1989). Modifizierte Oberflächen

müssen im Hinblick auf ihren Einfluss auf die bakterielle Adhäsion weiterhin experimentell getestet werden.

Ansätze zur Modifikation physikochemischer Oberflächeneigenschaften

Es existiert eine große Bandbreite an Techniken zur Modifikation physikochemischer Oberflächeneigenschaften. Durch eine Oberflächenmodifikation bleiben die intrinsischen mechanischen Eigenschaften des Materials erhalten, wohingegen die Biokompatibilität und/oder Biofunktionalität des Materials verändert werden. Gängige Modifikationsverfahren verändern die Atome, Komponenten oder Moleküle der bestehenden Oberfläche chemisch oder physikalisch, oder beschichten die Oberfläche mit einem anderen Material (Kurella und Dahotre 2005). Die meisten Techniken zur Oberflächenmodifikation werden trocken mit Ionenstrahlen, oder in wässrigen Lösungen durchgeführt (Hanawa 2009). Während Ionenbestrahlungen werden beschleunigte Ionen in die Oberfläche des Materials eingebracht und die Oberflächeneigenschaften hierdurch verändert. Mit Hilfe dieses Prozesses wurden z.B. Silberionen in Polystyrol-Oberflächen eingesetzt, um die Zelladhäsion auf der Oberfläche zu begünstigen (Ratner und Hoffman 2004). Beispiele für die Oberflächenmodifikation in wässrigen Prozessen sind z.B. „Self-Assembled Monolayers“ (SAMs), Silanisierungen (mit Amino- oder Epoxysilanen) oder „microcontact printing“. Chelmowski *et al.* (2008) beschreiben die Fähigkeit von Peptid-basierten SAMs, Gold-Oberflächen Protein-resistente Eigenschaften zu verleihen.

Da die verschiedenen theoretischen Modelle zur primären bakteriellen Adhäsion gezeigt haben, dass hydrophobe Wechselwirkungen in diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielen, beschäftigen sich viele Untersuchungen mit dem Einfluss der Oberflächenhydrophobizität auf die Biofilmbildung. Bereits in frühen Studien an unterschiedlichen Zahn- und Zahnersatzmaterialien (Glantz 1971) konnte am Beispiel der Plaquebildung ein Bereich stark erhöhter Bioadhäsion für hydrophile Materialien definiert werden. Hochenergetische hydrophile Oberflächen sammeln Plaque, binden diesen stärker und begünstigen die Adhäsion spezifischer Bakterien (Quirynen und Bollen 1995). Untersuchungen zur Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* auf verschiedenen Polymeren mit unterschiedlicher Hydrophobizität zeigten eine deutliche Zunahme der Bakterienadhäsion mit steigender Hydrophilie (Ferreiros *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu adhärierte *S. epidermidis* beim Vergleich von unbehandelten Polymeroberflächen und Polymeroberflächen, die durch Bestrahlung mit 2-Hydroxyethylmethacrylat hydrophiler gemacht worden waren, deutlich verstärkt auf dem hydrophoberen Ausgangsmaterial (Jansen und Peters 1991). Die Untersuchung der *Staphylococcus aureus* Adhäsion auf SAMs mit verschiedenen Endgruppen zeigte ebenfalls eine verstärkte Adhäsion mit steigender Hydrophobizität (Tegoulia und Cooper 2002).

Die Veränderung der Oberflächenhydrophobizität und freien Oberflächenenergie und ihr Einfluss auf die bakterielle Adhäsion kann in industriellen Prozessen gewinnbringend eingesetzt werden. Hadjiev *et al.* (2006) konnten zeigen, dass durch die Beschichtung von Polyethylenvinylacetat-Oberflächen mit einem Polymethylmetacrylat-Aktivkohle-Gemisch die Bakterienadhäsion deutlich erhöht werden konnte. Die beste Besiedlung wurde erreicht bei einem maximalen Unterschied der freien Oberflächenenergie der Materialien und der Bakterien. In der biologischen Abwasserbehandlung spielt die Immobilisation von Mikroorganismen eine entscheidende Rolle, um Prozesse effektiv ablaufen zu lassen. Natürlich in der industriellen Abwasserbehandlung vorkommende Bakterien adhärten schneller und in höheren Zellzahlen auf den modifizierten Oberflächen und zeigten eine deutlich erhöhte Aktivität beim biologischen Abbau.

Neben der Oberflächenhydrophobizität untersuchen viele Studien energetische Materialparameter wie die Polarität und korrelierten diese mit der Biofilmbildung. So konnte bei der Untersuchung von *Staphylococcus thermophilus* und *Bacillus cereus* auf Stahloberflächen gezeigt werden, dass es möglich ist, mit einer Erhöhung der Polarität die bakterielle Adhäsion einzudämmen und die Oberfläche von Sporen freizuhalten (Boulangé-Petermann *et al.* 2004).

Des Weiteren wurden gezielt die Oberflächenladung bzw. elektrostatische Eigenschaften der Oberflächen verändert, um den Einfluss auf die primäre Adhäsion zu untersuchen. So verwendeten Gottenbos *et al.* (2003) verschieden geladene Polymethacrylate und untersuchten den Einfluss auf *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die positiv geladenen Oberflächen zeigten einen antimikrobiellen Effekt und es konnten weniger adhärte und auch weniger lebende Bakterien auf den Oberflächen detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten Kiremitci-Gumustederelioglu und Pesmen (1996), dass die *E. coli* Adhäsion auf positiv geladenem Polymethacrylat im Vergleich zu negativ geladenem deutlich erhöht war.

Die Veränderung physikochemischer Oberflächenparameter hat einen deutlichen Einfluss auf die primäre bakterielle Adhäsion. Die Adhäsionsvorgänge zeigen jedoch eine sehr große Variabilität und führen aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die bakterielle Adhäsion ist ein sehr komplexer Vorgang und es ist nicht immer möglich, allgemeingültige Aussagen über den Einfluss der Oberflächenmodifikation auf das bakterielle Adhäsionsverhalten zu treffen. Durch die Veränderung der physikochemischen Oberflächenparameter ist jedoch eine maßgeschneiderte Modifikation von Oberflächen für spezifische Anwendungen möglich.

1.2.2 Gestaltung biomimetischer Oberflächen

Biologisch inspiriertes Design und die Anpassung und Übertragung von Prinzipien, die sich in der Natur bewährt haben, wird als Biomimetik bezeichnet. Viele Konzepte zur Manipulation der Biofilmbildung nutzen die Natur als Vorbild zur Gestaltung biomimetischer Oberflächen. Die uns umgebende Flora und Fauna zeigt eine Vielzahl an Strategien auf, die in verschiedenen Anwendungsbereichen nachgeahmt werden. Meist werden natürliche Antifoulingmechanismen reproduziert bzw. imitiert. Diese Konzepte beinhalten physikalische und chemische Kontrollmechanismen wie einen geringen Strömungswiderstand, eine geringe Adhäsion, Unterschiede in der Benetzbarkeit (Hydrophobizität), die Mikrostrukturierung von Oberflächen oder eine leichte Abwaschbarkeit (Bixler und Bhushan 2012).

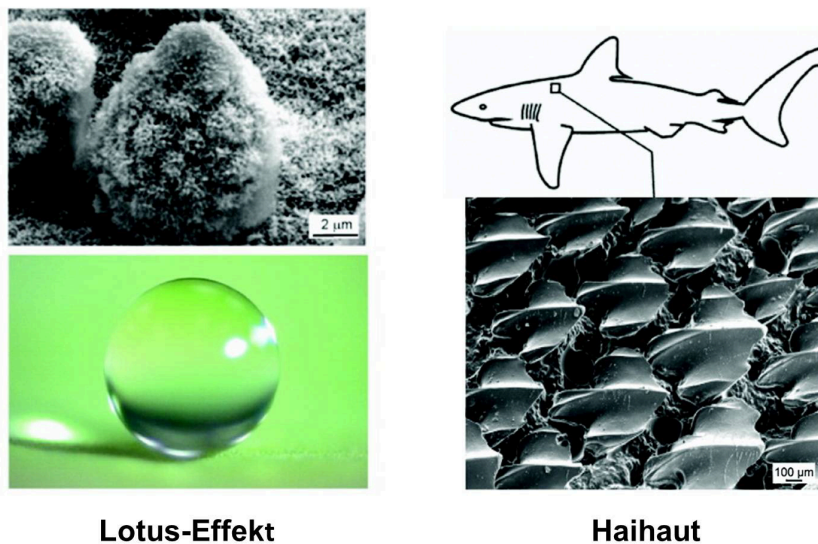


Abbildung 6. Biomimetische Oberflächenstrukturierungen inspiriert durch die Lotusblume und die Haihaut. (Abbildungen aus Bhushan 2012).

Zu den bekanntesten biomimetischen Oberflächenmodifikationen gehört der Lotus-Effekt. Inspiriert durch die Lotusblume sind die biomimetisch mikro-nanostrukturierten Oberflächen superhydrophob und weisen Selbstreinigungseigenschaften und nur eine sehr geringe Adhäsion von Mikroorganismen auf. Anwendungen findet dieses Konzept zur Oberflächenmodifikation z.B. in selbstreinigenden Fenstern, Fassadenanstrichen und der Beschichtung von Textilien, aber auch auf Membranen für Entsalzungsanlagen und die Wasseraufreinigung (Bhushan 2012). Mikrostrukturierungen von Oberflächen, basierend auf dem Vorbild der Haihaut, senken deutlich den Wasserwiderstand, optimieren die Hydrodynamik und verhindern ebenfalls die Ansiedlung von Mikroorganismen. Diese biomimetische Oberflächenstrukturierung wird für Unterwasserbeschichtungen von Schiffen eingesetzt (Abbildung 6).

Neben der biomimetischen Oberflächenstrukturierung konnten natürliche Substanzen auch erfolgreich für neue Strategien zur Oberflächenmodifikation eingesetzt werden. So

verwendeten Dalsin *et al.* (2003) die Adhäsionseigenschaften von 3,4-Dihydroxyphenylalanin, einer wichtigen Komponente der Muscheladhäsionsproteine, um PEG-Ketten fest auf Oberflächen zu verankern. Die so modifizierten Oberflächen waren gegenüber der Adhäsion von Mausfibroblasten nahezu resistent. Oberflächen, die mit einem Tetraetherlipid aus der Membran des Archaeobakteriums *Thermoplasma acidophilum* modifiziert worden waren, zeigten eine Reduktion der Bioadhäsion um bis zu 40% in Fluss- und Trinkwasser (Frant 2008).

Das Wirkungsprinzip biomimetischer Oberflächenmodifikationen ist aufgrund der Komplexität der Oberflächen oft noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird meist eine Kombination aus physikalischen und chemischen Kontrollmechanismen verwendet (Bixler und Bhushan 2012). Die Natur hat in den letzten 3,8 Milliarden Jahren verschiedene Konzepte zur Oberflächenmodifikation entworfen, die noch viel Potential für weitere Ansätze bieten.

1.2.3 Spezifische Funktionalisierung von Oberflächen

Eine Oberfläche kann durch die Bindung von verschiedenen reaktiven Gruppen, natürlichen und synthetischen Peptiden, oder auch größeren Molekülen spezifisch funktionalisiert werden.

So stellten Park *et al.* (1998) ein Antifoulingkonzept, basierend auf der Kombination der antiadhäsiven Eigenschaften einer PEG-Schicht mit dem antibakteriellen Effekt verschiedener oberflächenaktiver Gruppen, vor. Die PEG-Schicht wurde auf Polyurethan aufgebracht und anschließend durch die Bindung von Hydroxyl-, Amino- und Sulfatgruppen oder Heparin funktionalisiert. Es konnte eine signifikante Reduktion der Adhäsion von Staphylokokken und damit eine Verstärkung des Antifoulingeffektes durch die Funktionalisierung nachgewiesen werden.

Funktionelle Gruppen können jedoch nicht nur für die Verhinderung der bakteriellen Adhäsion, sondern auch zur Immobilisierung von Mikroorganismen eingesetzt werden. Lee *et al.* (1997) beschrieben die Verwendung von Polymeroberflächen, funktionalisiert mit Epoxy- und Diethylamingruppen zum erfolgreichen Abfangen von *S. aureus* und *E. coli* Zellen für den Einsatz in der Wasseraufreinigung oder der Immobilisation in Bioreaktoren.

Um das Risiko bakterieller Infektionen durch die Biofilmbildung im medizinischen Bereich zu minimieren, ist es wichtig bakterizide Oberflächenbeschichtungen zu entwickeln. Glinel *et al.* (2009) untersuchten die Funktionalisierung von Polymerbürsten mit dem antibakteriellen Peptid Magainin I. Das Peptid wurde über Hydroxylgruppen an die Oberfläche gebunden und die antibakterielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien konnte erfolgreich nachgewiesen werden.

Die Funktionalisierung von Oberflächen durch die Bindung von verschiedenen reaktiven Gruppen steht in direktem Zusammenhang mit der Variation physikochemischer Oberflächenparameter, lässt aber ebenso wie der Einsatz komplexer Moleküle eine gezielte bakterizide, abstoßende oder anziehende Modifikation zu. Durch die kovalente Bindung über z.B. Ester- oder Amidbindungen wird eine Freisetzung überschüssiger funktioneller Substanzen verhindert. Funktionalisierte Oberflächen weisen eine kontaktgekoppelte Wirkung auf, d.h. damit die immobilisierten Substanzen wirken können, müssen die Bakterien an die Oberfläche adhären. Auf bakteriziden Oberflächen müssen tote Organismen, die gegebenenfalls die Basis für eine weitere Biofilmbildung darstellen, entfernt werden (Frant 2008).

1.2.4 Integration funktioneller Substanzen in Release Coatings

Die Integration funktioneller oder toxischer Substanzen in oberflächennahe Bereiche von Release Coatings bietet als Antifoulingkonzept eine breite Vielfalt in Bezug auf die eingesetzten Substanzen und die Freisetzungskinetik.

So können z.B. Polyelektrolytmultilagern präzise hinsichtlich der Dosierung und der Freisetzungsrates in wässrigen physiologischen Bedingungen eingestellt werden (Chuang *et al.* 2008). Die Funktionalisierung dieser Release Coatings mit dem Antibiotikum Gentamycin zeigte eine effektive Wirkung gegen *S. aureus*. Silber-freisetzende Beschichtungen werden aufgrund ihrer bakteriziden Aktivität in einer Vielzahl von Bereichen eingesetzt. So werden Wundverbände, medizinische Geräte wie Katheter oder Textilien mit Silber Release Coatings ausgestattet. Silberionen oder Silbernanopartikel können in Polyamide, Polyelektrolyte, Glasfasern oder Hydrogele eingelagert werden, um antimikrobielle Beschichtungen zu bilden (Banerjee *et al.* 2011). Alt *et al.* (2004) präsentierten erfolgreich die Applikation von Silbernanopartikeln in Polymethylmetacrylat-Zement der zahnärztlichen Prothetik. Die antibakteriellen Eigenschaften konnten anhand der signifikant reduzierten Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* nachgewiesen werden. Jedoch schlug der Effekt im Langzeitversuch um und es wurde auf der Silberschicht eine Biofilmbildung erkennbar. Der große Nachteil von Release Coatings mit Silber oder anderen antimikrobiellen Komponenten ist der langzeitliche Wirkungsverlust durch die Erschöpfung der aktiven Komponente (Banerjee *et al.* 2011).

1.3 Biomimetische Oberflächenmodifikation mit Hydrophobinen

Die gezielte Beeinflussung der Biofilmbildung spielt in unterschiedlichen Bereichen eine wichtige Rolle. Zur Manipulation der Biofilmbildung können, wie in Absatz 1.2 erläutert, verschiedene Konzepte eingesetzt werden. Einige der in der Vergangenheit beschrie-

benen Verfahren sind jedoch kompliziert durchzuführen, benötigen spezifische organische oder organometallische Synthesestrategien (Bunker et al. 1994) oder sehr teures Equipment. Häufig wurden toxische Komponenten verwendet oder nur kleine Oberflächenbereiche konnten modifiziert werden.

Die Natur hat erfolgreich eine Vielzahl an Ansätzen zur Oberflächenmodifikation entwickelt. Die Verwendung von natürlichen Substanzen für Oberflächenbeschichtungen stellt daher eine sehr interessante und umweltverträgliche Alternative dar. Monomolekulare Filme aus oberflächenaktiven natürlichen Substanzen verändern die physikochemischen Eigenschaften der Oberfläche und bieten gleichzeitig eine Grundlage für weitere spezifische Modifikationen oder Funktionalisierungen.

In dieser Arbeit werden sogenannte Hydrophobine für Oberflächenbeschichtungen eingesetzt. Hydrophobine sind eine einzigartige Familie kleiner Proteine, die von Pilzen sekretiert werden. Sie ordnen sich selbst an hydrophil-hydrophoben Grenzflächen in amphiphilen Filmen an (Wösten und De Vocht 2000) und gehören zu den oberflächenaktivsten Proteinen, die bisher bekannt sind. Sie sind nicht toxisch und nicht immunogen und versprechen beim Einsatz für biomimetische Oberflächenmodifikationen ein innovatives Anwendungsspektrum.

1.3.1 Funktion der Hydrophobine in Pilzen

Hydrophobine wurden erstmals 1990 von Schuren und Wessels im Pilz *Schizophyllum commune* entdeckt und als Proteine, die die Oberfläche von Sporen und Fruchtkörpern wasserabweisend machen, beschrieben (Schuren und Wessels 1990). Inzwischen wurden funktionell homologe Proteine in Bakterien der Gattung *Streptomyces* identifiziert (Kodani et al. 2005). Hydrophobine sind jedoch einzigartig für das Reich der Pilze. Es ist bekannt, dass nahezu alle Pilze ein oder sogar mehrere Hydrophobine produzieren, die bestimmte strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen. Durch Genomanalysen wurde festgestellt, dass Hydrophobine meist in kleinen Genfamilien mit zwei bis zehn Mitgliedern vorliegen (Sunde et al. 2008; Littlejohna et al. 2012).

Hydrophobine spielen eine Schlüsselrolle beim Wachstum und in der Entwicklung der Pilze. Ihre Funktionen basieren hauptsächlich auf ihrer Fähigkeit, sich an hydrophil-hydrophoben Grenzflächen in amphiphilen Filmen anzulagern (Zampieri et al. 2010). Durch die Selbstorganisation (engl. Self-Assembly) an der Grenzfläche zwischen der Luft und dem die Pilze umgebenden wässrigen Milieu verringern die Hydrophobine die Grenzflächenspannung des Wassers. Dies ermöglicht den Pilzhyphen diese Grenzschicht zu durchdringen und in die Luft zu wachsen, um sporenproduzierende Strukturen wie den Pilzhut zu formen (Wösten et al. 1999). Luftstrukturen und auch Pilzsporen sind mit Hydrophobinen überzogen und werden dadurch wasserabweisend (Wösten et al. 1993, 1994, 2001). Die Hyphen pathogener Pilze heften sich mithilfe der Hydro-

phobine an hydrophobe Oberflächen, wie z.B. Pflanzen, an (Wösten *et al.* 1994; Ebbole 1997; Lugones *et al.* 2004). Die hohe Resistenz der Hydrophobine gegenüber chemischen und enzymatischen Behandlungen legt nahe, dass die assemblierten Hydrophobine die Pilzstrukturen auch vor widrigen Umweltbedingungen schützen (Wösten und Wessels 1997). Die hohe Oberflächenhydrophobizität könnte die Pilzstrukturen zudem vor bakteriellen und pilzlichen Infektionen bewahren (Wösten 2001). Im Fall der Sporen sorgt die wasserabweisende Oberfläche für eine effektive Verbreitung dieser durch den Wind und durch Insekten und verhindert ein Zusammenkleben der einzelnen Sporen. Darüber hinaus schützt die Hydrophobinschicht die Konidiosporen vor der Erkennung durch das menschliche Immunsystem (Aimanianda *et al.* 2009).



Abbildung 7. Hydrophobine wurden 1990 im Pilz *S. commune* (links) entdeckt. Sie sind eine einzigartige Familie kleiner oberflächenaktiver Proteine, die von den Pilzen sekretiert werden und sich auf der Oberfläche von Fruchtkörpern, Hyphen und Sporen anlagern. Die assemblierte Hydrophobinschicht macht die Oberflächen wasserabweisend (Mitte und rechts) und schützt den Pilz vor widrigen Umweltbedingungen. (Abbildungen aus unterschiedlichen Quellen; Quellenangaben siehe Literaturverzeichnis).

1.3.2 Struktur und Eigenschaften natürlicher Hydrophobine

Hydrophobine sind relativ kleine Proteine aus 70-120 Aminosäuren (molekulare Masse etwa 7-15 kDa), wobei die Aminosäuresequenz der verschiedenen Hydrophobine sehr unterschiedlich ist (Wessels 1997). Untersuchungen der Aminosäurezusammensetzung haben jedoch gezeigt, dass alle Hydrophobine zum einen aus einem sehr hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren aufgebaut sind und zum anderen ein charakteristisches Muster aus acht hochkonservierten Cysteinen aufweisen. Diese bilden vier intramolekulare Disulfidbrücken, die essentiell für die hohe Stabilität der globulären Tertiärstruktur der Proteine sind. Hydrophobine sind sehr resistent gegenüber thermischen Behandlungen und auch nach einer 15-minütigen Inkubation bei 90°C kann keine Denaturierung beobachtet werden (Askolin *et al.* 2006). Die Tertiärstruktur der Hydrophobine unterscheidet sich deutlich von der anderer Proteine mit mehreren Disulfidbrücken. Sie besteht aus vier zentralen β -Strängen, die zwei β -Hairpin Strukturen bilden. Diese verbinden sich und greifen in einem anti-parallelen β -Faltblatt ineinander. Das β -Faltblatt bildet eine fassähnliche Struktur, die durch die symmetrisch angeordneten

Disulfidbrücken stabilisiert wird. Zwischen den zwei β -Hairpin Strukturen befindet sich eine α -helikale Region, die von Aminosäuren aus der Mitte der Primärsequenz gebildet wird. Die α -Helix liegt außerhalb des β -Faltblatt Bereiches (Linder *et al.* 2005) (Abbildung 8A). Die hydrophoben Aminosäuren bilden im Bereich der β -Hairpin Strukturen einen hydrophoben Bereich (Hakanpää *et al.* 2004) (Abbildung 8B). Normalerweise sind hydrophobe Aminosäuren im Kern, d.h. im Inneren, von in löslichen Proteinen angesiedelt, um die Proteinfaltung zu stabilisieren. Die Struktur der Hydrophobine zeigt neben dem hydrophoben Bereich, der etwa 12% der Proteinoberfläche bedeckt, eine große hydrophile Oberfläche (Bayry *et al.* 2012) (Abbildung 8C).

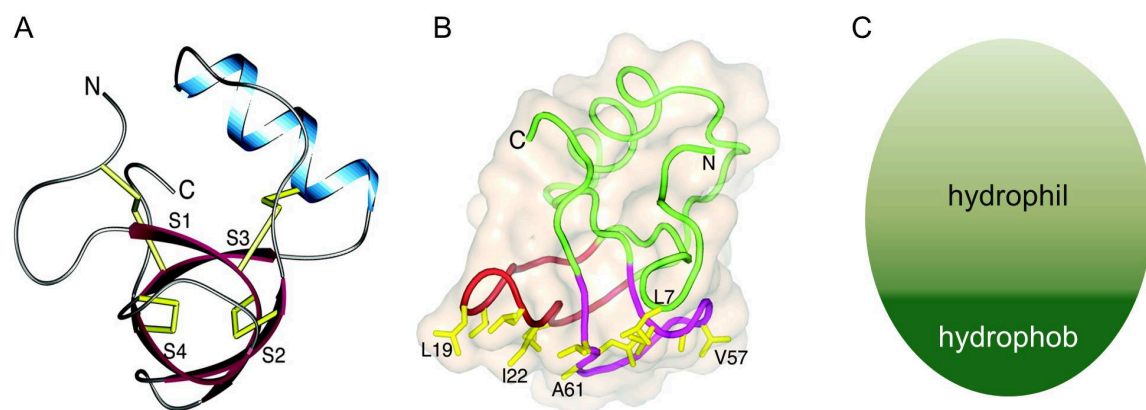


Abbildung 8. Darstellungen der Struktur des Hydrophobins HFBII aus *Trichoderma reesei*. **A** Tertiärstruktur mit α -Helix (blau), antiparalleler fassähnlicher β -Faltblattstruktur (rot) und vier symmetrisch angeordneten Disulfidbrücken (gelb). **B** Der hydrophobe Patch im Bereich der β -Hairpin Strukturen (rot und lila) wird durch hydrophobe Aminosäuren gebildet (gelb). **C** Schematische Darstellung der amphiphilen Proteinoberfläche. (Abbildungen A und B aus Hakanpää *et al.* 2004).

Aufgrund der spezifischen amphiphilen Merkmale ihrer Proteinstruktur werden Hydrophobine als Biotenside angesehen. Sie gehören zu den oberflächenaktivsten Proteinen, die bisher bekannt sind und heben sich von anderen amphiphilen Proteinen durch die sehr starke Tendenz zur Anlagerung an verschiedenen Grenzflächen ab. Durch die Zusammenlagerung der Hydrophobine aufgrund von Wechselwirkungen der hydrophilen Proteinbereiche wird ein deutlicher Energiegewinn erreicht. Im Vergleich zu anderen Proteinen ist sowohl dieser Energiegewinn als auch die mechanische Stabilität der ausgebildeten Membranen sehr viel höher (Basheva *et al.* 2011). Die vier beschriebenen Disulfidbrücken halten die Hydrophobine in einer löslichen Monomeren Form und erlauben das Self-Assembly nur, wenn das Molekül auf eine hydrophil-hydrophobe Grenzfläche trifft (De Vocht *et al.* 2000). Ausgehend von den biophysikalischen Eigenschaften der ausgebildeten Schichten, der Anordnung der konservierten Cysteine, dem Hydrophobizitätsmuster und dem Vorkommen der Hydrophobine differenziert man zwei Klassen (Wessels 1994). Klasse I Hydrophobine werden in Basidiomyceten und Ascomyceten produziert und die ausgebildeten Filme sind sehr stabil und nur in konzentrierter Trifluoressigsäure oder Ameisensäure löslich (De Vries

et al. 1993; Wösten *et al.* 1993). Klasse II Hydrophobine wurden bisher nur in Basidiomyceten beschrieben und die Proteinfilme sind bereits in 60% Ethanol oder 2% SDS (Natriumdodecyl-Sulfat, engl. sodium dodecyl sulfate) löslich (Wösten und De Vocht 2000).

Bei der Bindung der Hydrophobine an hydrophobe Oberflächen interagiert der hydrophobe Bereich des Proteins mit der Oberfläche, und die hydrophile Seite ist nach außen gerichtet. Auf hydrophilen Oberflächen ist entsprechend die hydrophobe Seite des Proteins exponiert. Die Hydrophobizität der Oberfläche wird durch die Anlagerung der Hydrophobine umgedreht. Die Ausbildung dieser Monolagen ist bei Klasse I Hydrophobinen mit signifikanten strukturellen Umlagerungen verbunden (Bayry *et al.* 2012).

Das Hydrophobin SC3 aus *S. commune* ist in gelöster Form reich an β -Faltblatt Strukturen. Während des Self-Assembly an einer Grenzfläche erfolgt eine Umwandlung der löslichen Form über eine Zwischenform, die reich an α -helikalen Strukturen ist, in eine stabile β -Faltblatt Endform. An der Grenzfläche zwischen Wasser und Luft ist dieser Prozess zeitabhängig. Nach einer schnellen initialen Anlagerung in α -helikaler Konformation dauert es etwa zwei Stunden bis sich SC3 in die β -Faltblatt Endform umlagert (Wösten und De Vocht 2000). An der Grenzfläche zwischen Wasser und Teflon verbleibt SC3 jedoch in α -helikaler Konformation und kann durch verdünnte Detergenzien bei Raumtemperatur leicht von der Oberfläche entfernt werden (Abbildung 9). Bei hohen Temperaturen (80°C) induziert die Behandlung mit Detergenzien (z.B. SDS) die Änderung der Konformation in die stabil auf der Oberfläche gebundene β -Faltblatt Endform. Jetzt kann die Hydrophobin-Monolage auch durch verdünnte Detergenzien bei Raumtemperatur nicht mehr von der Oberfläche entfernt werden, was auf eine starke Interaktion mit der Oberfläche hindeutet (Janssen *et al.* 2004).

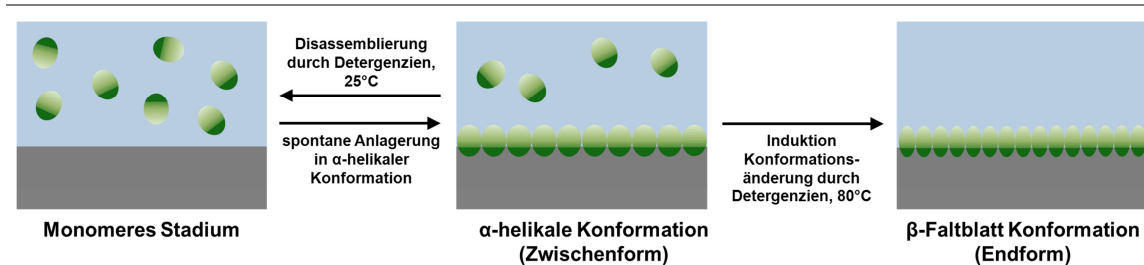


Abbildung 9. Während des Self-Assembly an einer Grenzfläche zwischen Wasser (blau) und einer hydrophoben Oberfläche (grau) verbleibt das Klasse I Hydrophobin SC3 (grün) aus *S. commune* in der α -helikalen Zwischenform. Das Protein kann durch verdünnte Detergenzien bei Raumtemperatur von der Oberfläche entfernt werden. Die Behandlung der beschichteten Oberflächen mit Detergenzien bei 80°C induziert jedoch eine Konformationsänderung in die stabile β -Faltblatt Endform. (Abbildung modifiziert nach Wösten und De Vocht 2000 und Janssen *et al.* 2004).

Die hydrophobe Seite der Proteinmonolage von SC3 und anderen Klasse I Hydrophobinen zeigt in der β -Faltblatt Endform ein charakteristisches Rodletmuster. Diese

Rodlets haben sehr große Ähnlichkeit mit den von Proteinen gebildeten Amyloidfibrillen. Sie bestehen aus einem sehr hohen Anteil an β -Faltblatt Strukturen, lagern sich oberhalb einer kritischen Konzentration selbständig an Grenzflächen an und sind resistent gegenüber dem Verdau durch Proteasen (Wösten und De Vocht 2000).

1.3.3 Hydrophobine für Oberflächenmodifikationen

Die beschriebenen Eigenschaften der natürlichen Hydrophobine, wie das effektive Self-Assembly an Grenzflächen, die Veränderung der Oberflächenhydrophobizität und die hohen Stabilität der ausgebildeten Proteinschichten, machen sie zu sehr interessanten Kandidaten für biomimetische Oberflächenmodifikationen.

Hydrophobine sind sehr effiziente Proteine und nur 2,9 mg sind notwendig um einen Quadratmeter zu beschichten (Linder *et al.* 2002). Es sind jedoch ausreichende Mengen notwendig, um diese Proteine für medizinische, technische oder biotechnologische Anwendungen nutzen zu können. Die Anwendung der Hydrophobine für Oberflächenmodifikationen war bisher aufgrund der geringen Verfügbarkeit limitiert. Die komplexe Aufreinigung aus Pilzkulturen ist ein mühsamer und teurer Prozess und es können nur geringe Mengen gewonnen werden (Scholtmeijer *et al.* 2001).

Der BASF-SE ist es 2009 gelungen, ein Expressionssystem für Hydrophobine in *E. coli* zu etablieren (Wohlleben *et al.* 2010). Dies erlaubt die biotechnologische Produktion von Hydrophobinen, bestehend aus dem Klasse I Hydrophobin DewA aus *Aspergillus nidulans* und einem N-terminalen Fusionspartner, im Kilogramm Maßstab. Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B der BASF-SE werden in dieser Arbeit zur biomimetischen Oberflächenmodifikation eingesetzt.

1.4 Motivation und Aufgabenstellung

Biofilme sind ubiquitär verbreitet und haben einen ambivalenten Einfluss auf die Umwelt, technische Systeme und die menschliche Gesundheit. Die gezielte Beeinflussung der Biofilmbildung ist daher von großem Interesse. Vor allem die Modifikation von physikochemischen Oberflächenparametern und die damit verbundene Beeinflussung der initialen bakteriellen Adhäsion wird hierbei als vielversprechender Ansatz angesehen. Die Natur hat verschiedene Konzepte zur Oberflächenmodifikation entwickelt, und die Verwendung von natürlichen Substanzen für Oberflächenbeschichtungen stellt eine sehr interessante Alternative zur Biofilmanipulation dar. Monomolekulare Filme aus oberflächenaktiven natürlichen Substanzen können die physikochemischen Eigenschaften der Oberfläche verändern und bieten gleichzeitig eine Grundlage für weitere spezifische Modifikationen oder Funktionalisierungen.

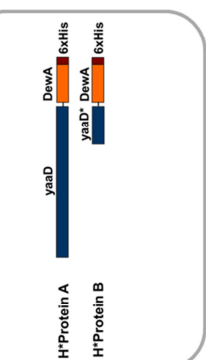
Das Ziel dieser Dissertation ist der Einsatz der von der BASF-SE zur Verfügung gestellten rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B für biomimetische Oberflächenmodifikationen und die Charakterisierung ihres Einflusses auf die bakterielle Biofilmbildung (Abbildung 10).

- Zuerst sollte der Einfluss der Hydrophobine H*Protein A und H*Protein B auf das Wachstumsverhalten und die Vitalität von verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Referenzbakterien untersucht werden, um Informationen über eventuelle antibakterielle Eigenschaften zu erhalten.
- Ausgehend von den für natürliche Hydrophobine beschriebenen Eigenschaften wurden die rekombinanten Fusionshydrophobine zur Oberflächenmodifikation eingesetzt und ihr Verhalten im Vergleich zu natürlichen Hydrophobinen untersucht. Es sollte ein Standardprotokoll zur Beschichtung von verschiedenen hydrophilen und hydrophoben Materialien etabliert und die biomimetische Oberflächenbeschichtung im Hinblick auf die Hydrophobizität, die Homogenität und die Stabilität charakterisiert werden.
- Im nächsten Schritt sollte der Einfluss der biomimetischen Oberflächenmodifikation auf die bakterielle Biofilmbildung untersucht werden. Hierbei wurden sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Referenzbakterien und natürliche gemischte Populationen eingesetzt. Es sollte der Einfluss der Beschichtung auf die primäre bakterielle Adhäsion und die weitere Biofilmentwicklung im Hinblick auf die Anzahl der adhärenierten Bakterien (Gesamt-Biomasse, metabolisch aktive Bakterien, kultivierbare Bakterien), die Struktur des Biofilms und, bei gemischten Kulturen, die Populationszusammensetzung untersucht werden.
- Ausgehend von den positiven Eigenschaften der biomimetischen Oberflächenmodifikation sollte eine mögliche Strategie zur spezifischen Funktionalisierung dieser Beschichtung aufgezeigt werden. Mit verschiedenen antimikrobiellen Substanzen

sollte exemplarisch eine Funktionalisierung durchgeführt und der Einfluss auf die bakterielle Biofilmbildung untersucht werden

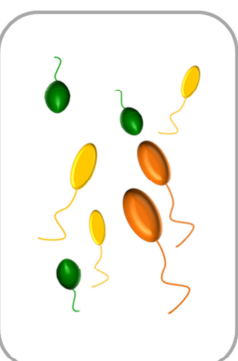
Abbildung 10. Schematische Übersicht der Aufgabenstellung: zuerst sollten die von der BASF-SE zur Verfügung gestellten rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B in Bezug auf ihre Reinheit charakterisiert und ihr Einfluss auf verschiedene Gram-positive und Gram-negative Referenzbakterien in Suspension untersucht werden. Anschließend sollten die Fusionshydrophobine für biomimetische Oberflächenmodifikationen eingesetzt werden. Hierbei sollte ein Standardprotokoll zur Beschichtung von hydrophilen und hydrophoben Referenzmaterialien etabliert und die Oberflächenbeschichtungen in Bezug auf ihre Hydrophobizität, Homogenität und Stabilität charakterisiert werden. Weiterführend sollte aufbauend auf den Ergebnissen die biomimetische Oberflächenbeschichtung funktionalisiert werden, um positive Eigenschaften der Beschichtung mit antibakteriellen bzw. antifouling Wirkungen zu koppeln. Der Einfluss der biomimetischen Oberflächenmodifikation (mit und ohne nachfolgender Funktionalisierung) auf die bakterielle Biofilmbildung sollte während der primären bakteriellen Adhäsion und der weiteren Biofilmentwicklung in Bezug auf die Anzahl der adhärerten Bakterien, die räumliche Struktur der Biofilme und die Populationszusammensetzung charakterisiert werden.

Rekombinante Fusionshydrophobine



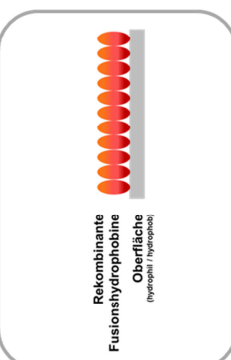
- Charakterisierung des Ausgangsmaterials (Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B) in Bezug auf
- die Reinheit
 - vorhandene Enzymaktivitäten

Einfluss auf planktonische Bakterien



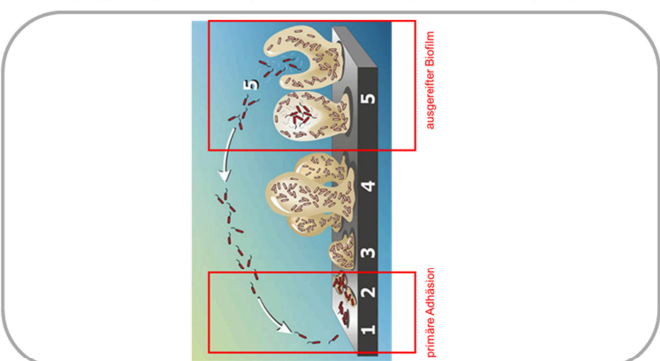
- Untersuchung des Einflusses der rekombinanten Fusionshydrophobine auf das Wachstum verschiedener Referenzbakterien (Gram-positiv und Gram-negativ)

Biomimetische Oberflächenbeschichtung



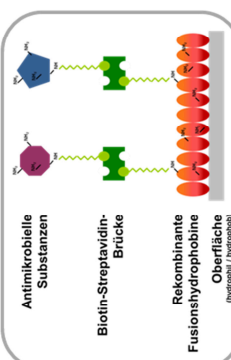
- Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der rekombinanten Hydrophobine
- Etablierung eines Protokolls zur Oberflächenmodifikation von hydrophilen / hydrophoben Materialien
- Charakterisierung der Beschichtung in Bezug auf die Hydrophobizität, Homogenität und Stabilität

Einfluss auf die bakterielle Biofilmbildung



- Charakterisierung des Einflusses der mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen modifizierten und funktionalisierten Oberflächen auf bakterielle Biofilme
- Verwendung von Referenzkeimen und natürlichen gemischten Populationen und ausgereifter Biofilme
- Untersuchung der primären Adhäsion und Vergleich statisches System und Durchfluss-System

Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung



- Entwicklung einer universellen Strategie zur Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung
- Exemplarische Funktionalisierung mit verschiedenen antimikrobiellen Substanzen

2. ERGEBNISSE

2.1 Charakterisierung der rekombinanten Fusionshydrophobine

In dieser Arbeit wurden die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B für biomimetische Oberflächenmodifikationen eingesetzt. Die freundlicherweise von der BASF-SE in sprühgetrockneter Form zur Verfügung gestellten Hydrophobine wurden vor dem Einsatz für die Oberflächenbeschichtung in Bezug auf ihre Reinheit und eventuell vorhandene Enzymaktivitäten untersucht. Darüber hinaus wurde eine Spaltung von H*Protein A und H*Protein B durchgeführt, um neben den Fusionshydrophobinen auch das „reine“, d.h. nur noch aus dem Hydrophobinanteil DewA bestehende, Hydrophobin als Referenzmaterial für Oberflächenbeschichtungen einsetzen zu können.

2.1.1 Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B

Der BASF-SE ist es 2009 gelungen, ein Expressionssystem für Hydrophobine zu etablieren, und das amphiphile Protein im Kilogramm Maßstab zu produzieren (Wohlleben *et al.* 2010).

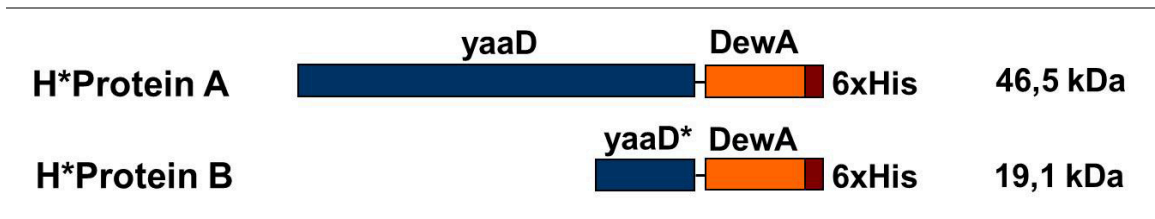


Abbildung 11. Schematische Darstellung der rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B, bestehend aus dem Klasse I Hydrophobin DewA aus *A. nidulans*, dem N-terminalen Polypeptid YaaD aus *Bacillus subtilis* und einem C-terminalen His-Tag.

Der Hydrophobinanteil der von der BASF-SE hergestellten und in diesem Projekt verwendeten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B ist das Klasse I Hydrophobin DewA, das in *A. nidulans* identifiziert und charakterisiert wurde (Abbildung 11). An den N-terminus des Hydrophobins ist über eine kurze Aminosäuresequenz, die eine Protease Schnittstelle enthält, das Protein YaaD aus *B. subtilis* gebunden. YaaD ist eine Synthase, die in *B. subtilis* in die Vitamin B6 Biosynthese involviert ist, und hier

während der Expression für das Einschleusen der Fusionsproteine in die Einschlusskörper verantwortlich ist. In H*Protein A liegt YaaD in kompletter Form, in H*Protein B in verkürzter Form (40 N-terminalen Aminosäuren) vor. Am C-terminalen Ende der Fusionshydrophobine befindet sich ein His-Tag für eine optionale Aufreinigung. H*Protein A hat eine Größe von 46,5 kDa, wobei der Hydrophobinanteil nur 10 kDa, d.h. 20% der Proteingestamtmasse ausmacht. H*Protein B hat eine Größe von 19,1 kDa. Hier stellt der funktionelle Teil 50% der Gesamtmasse dar.

2.1.2 Reinheit und Enzymaktivitäten der Hydrophobinlösungen

Zur Kontrolle der Reinheit der rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B wurden diese gelöst und über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Zudem wurden die Proteinlösungen mit einem halbquantitativen kommerziellen Test auf Enzymaktivitäten, die einen Einfluss auf das bakterielle Wachstum haben könnten, untersucht.

Kontrolle der Reinheit der Hydrophobinlösungen mit SDS-PAGE

Durch eine Gelelektrophorese können Makromoleküle, wie z.B. Proteine, auf der Basis ihrer Wanderungsgeschwindigkeit durch ein Gel unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes aufgetrennt und somit Proteinlösungen auf ihre Reinheit untersucht werden.

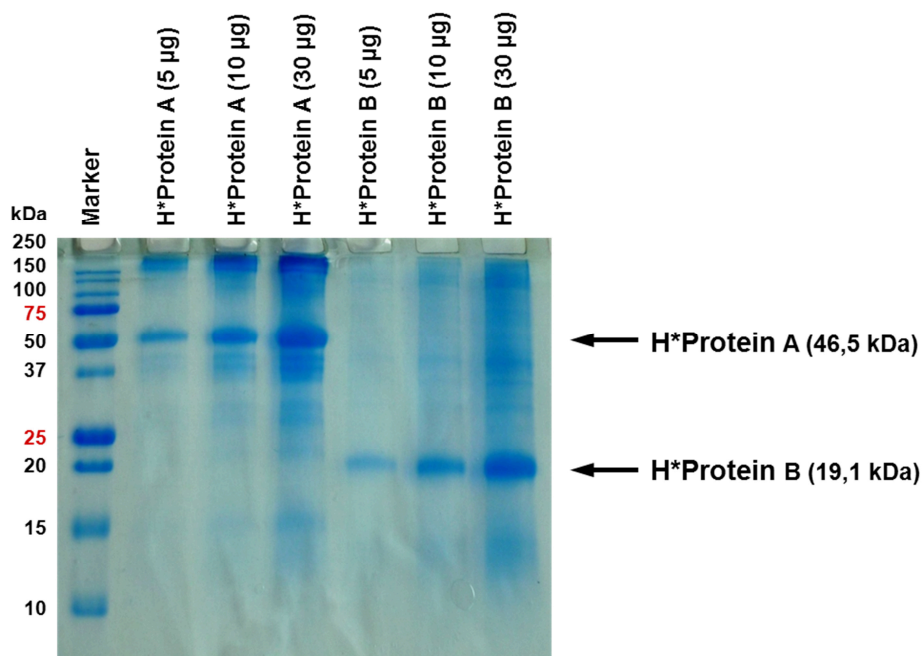


Abbildung 12. Kontrolle der Reinheit der Fusionshydrophobine H*Protein A (46,5 kDa) und H*Protein B (19,1 kDa) mittels SDS-PAGE. Es wurde ein 4%iges Sammelgel und ein 18%iges Trenngel verwendet. Die Proteine wurden vor dem Auftrag für 10 min bei 60°C in Probenpuffer mit 2% SDS und 100 mM DTT denaturiert. Es wurden Proteinmengen zwischen 5 und 30 µg aufgetragen.

Die Eigenschaften der rekombinanten Fusionshydrophobine, wie die durch Disulfidbrücken stabilisierte Tertiärstruktur und das Self-Assembly an Grenzflächen, verlangten eine Optimierung der Gelelektrophorese-Bedingungen. Zur Spaltung der Disulfidbrücken wurden hohe Konzentrationen des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) verwendet, und die Denaturierung der Proteine, d.h. die Reduktion der Disulfidbrücken und die Anlagerung von SDS erfolgte bei 60°C, um ein Agglomerieren der Proteine zu verhindern. Zur Kontrolle der Proteinauftrennung wurden die Proteine im Gel mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

Neben der Hauptbande der Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B sind auf dem Polyacrylamid-Gel weitere Banden erkennbar (Abbildung 12). Die Fusionshydrophobine liegen nicht in reiner Form vor. Laut Angaben der BASF-SE beträgt bei H*Protein A der Gesamtproteingehalt im sprühgetrockneten Produkt 100% und der eigentliche H*Protein A Gehalt 61%. Bei H*Protein B beträgt der Gesamtproteinanteil 84% und der tatsächliche H*Protein B Gehalt 40%.

Eine Aufreinigung der Fusionshydrophobine über den His-Tag ist möglich. Um die Anwendung der zur Verfügung gestellten Fusionshydrophobine für biomimetische Oberflächenbeschichtungen zu testen, wurde jedoch keine weitere Aufreinigung durchgeführt. Eine weitere Aufreinigung von H*Protein A und H*Protein B im industriellen Maßstab für ihren Einsatz zur großflächigen Oberflächenmodifikation wäre aus wirtschaftlichen Aspekten nicht rentabel.

Nachweis von Enzymaktivitäten in den Hydrophobinlösungen

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B liegen, wie anhand der SDS-PAGE gezeigt werden konnte, nicht in reiner Form vor. Um auszuschließen, dass Einflüsse der Hydrophobinlösungen auf Bakterien von weiteren in der Lösung enthaltenen Enzymen hervorgerufen werden, wurde ein kommerzielles API ZYM Testsystem eingesetzt (Abbildung 13). Dieses diente dem semiquantitativen Nachweis von 19 verschiedenen Enzymaktivitäten. Ein Farbumschlag in der jeweiligen Kavität zeigte die enzymatische Umsetzung eines immobilisierten synthetischen Substrates an.



Abbildung 13. Nachweis von Enzymaktivitäten in einer H*Protein B Lösung (20 mg/mL in H₂O dest.). Es wurde ein API ZYM Testsystem verwendet. Ein Farbumschlag in der jeweiligen Kavität zeigt die enzymatische Umsetzung eines immobilisierten synthetischen Substrates an.

In den H*Protein A und H*Protein B Proteinlösungen konnten keine Enzymaktivitäten detektiert werden.

2.1.3 Spaltung und Aufreinigung der Fusionshydrophobine

Natürliche Hydrophobine bilden an Oberflächen und Grenzflächen stabile Monolagen. Um zu untersuchen, ob der Fusionspartner diese Eigenschaft von H*Protein A und H*Protein B beeinflusst, wurde neben den Fusionsproteinen auch das „reine“, d.h. gespaltene und nur noch aus dem Hydrophobinanteil DewA bestehende, Hydrophobin als Referenzmaterial zur Oberflächenmodifikation eingesetzt.

Zur möglichen Spaltung der Fusionshydrophobine wurde von der BASF-SE in der Aminosäuresequenz zwischen dem Fusionspartner YaaD und dem Hydrophobin DewA eine Protease-Schnittstelle eingebaut. Aufgrund der ausgeprägten und stabilen Tertiärstruktur der Fusionsproteine war diese Schnittstelle jedoch nicht zugänglich. Eine Alternative zur Protease-Spaltung von Proteinen ist die Bromcyanspaltung. Hierbei werden Proteine an der C-terminalen Seite der Aminosäure Methionin gespalten. Die Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B wurden bei dieser Spaltung aufgrund ihrer Aminosäuresequenz mehrfach im Bereich des Fusionspartners, jedoch nicht im Bereich des Hydrophobins geschnitten werden, so dass nach vollständiger Spaltung „reines“ DewA (DewA-His) vorliegt.

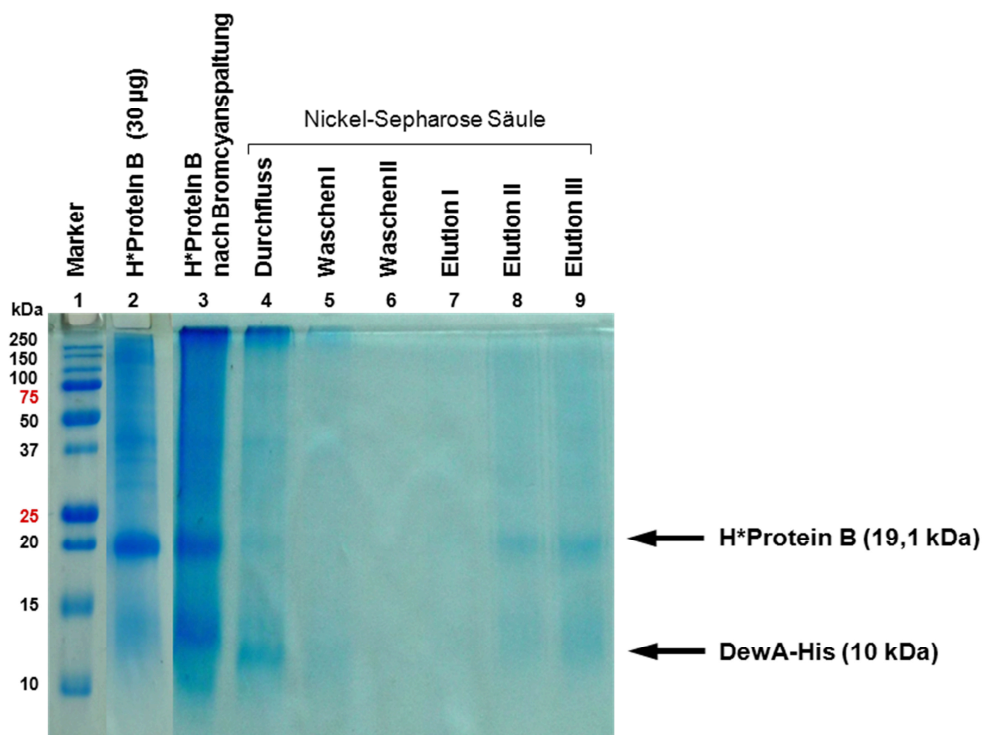


Abbildung 14. Kontrolle der Bromcyanspaltung und anschließenden Aufreinigung von H*Protein B über eine Nickel-Sepharose Säule mittels SDS-PAGE. Es wurde ein 4%iges Sammelgel und ein 18%iges Trenngel verwendet. Die Proteine wurden vor dem Auftrag für 10 min bei 60°C in Probenpuffer mit 2% SDS und 100 mM DTT denaturiert. Spur 1 = Marker; Spur 2 = H*Protein B (30 µg); Spur 3 = H*Protein B nach 4-stündiger Bromcyanspaltung; Spur 4-9 = Fraktionen der Aufreinigung des gespaltenen H*Protein B über eine Nickel-Sepharose Säule; die Elution von der Nickel-Sepharose Säule erfolgte mit 300 mM (Elution I) und 500 mM (Elution II und III) Imidazol.

Nach der Bromcyanspaltung wurden die Fusionshydrophobine dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Für die Aufreinigung und die Entfernung größerer Spaltprodukte wurde wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben eine Nickel-Sepharose Säule verwendet. Die über den His-Tag an das Säulenmaterial gebundenen Hydrophobine wurden mit Imidazol (300 mM und 500 mM) von der Säule eluiert. Die Bromcyanspaltung und anschließende Aufreinigung wurde mit SDS-PAGE kontrolliert.

In Abbildung 14 ist die Kontrolle der Bromcyanspaltung und anschließenden Aufreinigung von H*Protein B durch Affinitätschromatographie über eine Nickel-Sepharose Säule mittels SDS-PAGE dargestellt. Im Ausgangsmaterial (Spur 2) war eine deutliche H*Protein B Bande bei 20 kDa erkennbar. Nach 4-stündiger Bromcyanspaltung (Spur 3) konnte zusätzlich zur H*Protein B Bande im Bereich zwischen 10-15 kDa eine Bande für das DewA-His (und größere Spaltprodukte) detektiert werden. Die Bromcyanspaltung war nach 4 Std. noch nicht vollständig abgelaufen und es konnten immer noch große Mengen an unverdaulichem Protein detektiert werden. Bei der anschließenden Aufreinigung über die Nickel-Sepharose Säule banden sowohl H*Protein B als auch DewA-His an das Säulenmaterial (Spur 4) und eluierten mit 500mM Imidazol (Spur 8 und 9). Größere Spaltprodukte befanden sich im Durchfluss (Spur 4).

Von der BASF-SE wurde eine kleine Menge DewA-His zur Verfügung gestellt. Dieses wies in ersten Versuchen zur Oberflächenmodifikation ein Verhalten analog zu den rekombinanten Fusionshydrophobinen auf. Darüber hinaus zeigten die rekombinanten Hydrophobine H*Protein A und H*Protein B Eigenschaften ähnlich zu den in der Literatur beschriebenen natürlichen Hydrophobinen. Auf eine weitere Optimierung der Spaltung und Aufreinigung wurde daher verzichtet.

2.2 Einfluss der Fusionshydrophobine auf das Bakterienwachstum

Vor dem Einsatz der Hydrophobine H*Protein A und H*Protein B für die biomimetische Oberflächenbeschichtung und der Charakterisierung des Einflusses dieser Beschichtungen auf die Biofilmbildung wurde der Einfluss der Hydrophobinlösungen auf verschiedene Gram-positive und Gram-negative Referenzbakterien und die eukaryotische Hefe *Pichia pastoris* untersucht, um Informationen über antibakterielle oder toxische Eigenschaften zu erhalten.

2.2.1 Kirby-Bauer Diffusionstest

Für eine erste Charakterisierung des Einflusses der rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B auf das Bakterienwachstum wurde der Kirby-Bauer Diffusionstest verwendet. Dieser Agardiffusionstest wird standardmäßig in der Routinediagnostik angewendet, um die Effektivität von antimikrobiellen Substanzen, wie

z.B. Antibiotika, gegenüber Mikroorganismen zu untersuchen. Die Effizienz der antimikrobiellen Substanz wird durch eine Inhibitionszone (ZOI = zone of inhibition) bestimmt, in der mikrobielles Wachstum unterdrückt wird. Eine große ZOI zeigt, dass die untersuchte Substanz effektiv und der Mikroorganismus sensitiv gegenüber der Substanz ist.

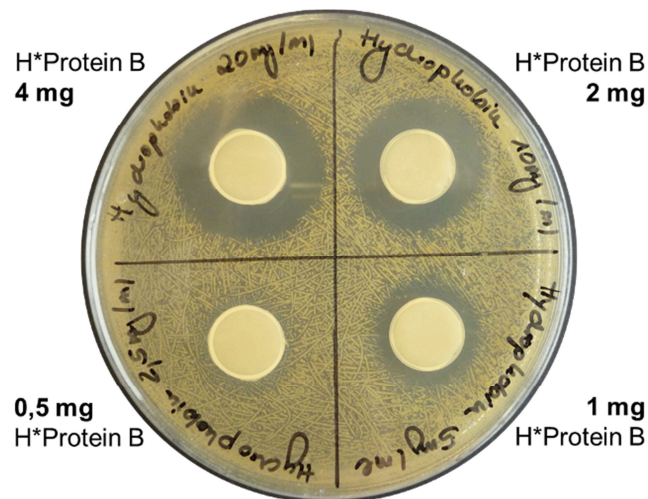


Abbildung 15. Charakterisierung der Empfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber verschiedenen H*Protein B Konzentrationen (0,5-4 mg/Plättchen) mittels eines Agardiffusionstests. Eine *S. aureus* Bakteriensuspension (OD_{600} 0,002) wurde homogen auf einer Müller-Hinton Agarplatte verteilt, mit H*Protein B getränkte Filterpapierplättchen aufgelegt und die Platte für 24 Std. bei 37°C inkubiert. Eine Inhibitionszone in der mikrobielles Wachstum verhindert wird, zeigt die Empfindlichkeit des Bakteriums gegenüber dem Hydrophobin an.

Als Referenzkeim wurde *S. aureus* verwendet und homogen auf einer Müller-Hinton (MH) Agarplatte ausgestrichen. Filterpapierplättchen getränkt mit unterschiedlichen H*Protein A und H*Protein B Konzentrationen wurden auf die Agarplatte aufgelegt und diese für 24 Std. bei 37°C inkubiert. Die Hydrophobinlösung diffundierte aus dem Filterpapier in den Agar. Die Hydrophobinkonzentration war direkt am Plättchen am höchsten und nahm mit steigender Distanz ab. Abhängig von der eingesetzten Konzentration der Fusionshydrophobine war um die getränkten Filterpapierplättchen eine deutliche ZOI erkennbar (Abbildung 15).

Die rekombinanten Fusionshydrophobine inhibierten das Wachstum des Referenzbakteriums *S. aureus*.

2.2.2 Quantitative Bestimmung der Empfindlichkeit verschiedener Referenzbakterien gegenüber H*Protein A und H*Protein B

Der Kirby-Bauer Diffusionstest gab erste Hinweise auf eine antibakterielle Wirkung der rekombinanten Fusionshydrophobine. Zur weiteren quantitativen Beurteilung der

Empfindlichkeit verschiedener Referenzbakterien gegenüber H*Protein A und H*Protein B wurde ein Bouillon-Dilutionsverfahren eingesetzt. Hierbei wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) der Fusionshydrophobine in Abhängigkeit von verschiedenen Nährmedien bestimmt. Die MHK ist die niedrigste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, die Mikroorganismen abtötet bzw. ihr Wachstum inhibiert. Eine niedrige MHK beschreibt eine effektive antimikrobielle Substanz.

Der Test wurde im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Eine Verdünnungsreihe von H*Protein A und H*Protein B wurde vorgelegt und eine genau definierte Anzahl an verschiedenen Gram-negativen (*E. coli*, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* Pa49R) und Gram-positiven Referenzbakterien (*S. aureus*, *Enterococcus faecalis*) und der eukaryotischen Hefe *Pichia pastoris* hinzugegeben. Die Platten wurden für 21 Std. bei 37°C inkubiert und anschließend die Fusionshydrophobinkonzentration bestimmt, bei der gerade kein Wachstum mehr detektierbar war.

Abhängig von der verwendeten Bakterien- bzw. Hefeart, dem Fusionshydrophobin und dem Wachstumsmedium lag die MHK für H*Protein A und H*Protein B zwischen 0,63 und 5 mg/mL (Tabelle 1).

Tabelle 1. MHK-Werte für H*Protein A und H*Protein B bei verschiedenen ausgewählten Gram-positiven und Gram-negativen Referenzbakterien und Hefen. Als Wachstumsmedium wurden Hirn-Herz Bouillon (BHI), Müller-Hinton Medium (MH), BM2 Medium (BM2) und spezifisches Hefemedium (YPG) verwendet.

		MHK (mg/mL) H*Protein A		MHK (mg/mL) H*Protein B			
		BHI	YPG	BHI	MH	BM2	YPG
<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)	5,00		0,63	0,63	0,94	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	Gram (-)	2,50		5,00	2,50	2,50	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pa49R	Gram (-)	n.b.		5,00	2,50	n.b.	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram (+)	1,25		2,50	1,25	n.b.	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram (+)	1,88		n.b.	n.b.	n.b.	
<i>Pichia pastoris</i>	Hefe		0,94				0,94

n.b. nicht bestimmbar

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B unterscheiden sich aufgrund der Länge des Fusionsproteins deutlich in ihrer Größe. H*Protein A hat eine Größe von 46,5 kDa, wobei der Hydrophobinanteil nur 10 kDa, d.h. 20% der Proteingesamtmasse ausmacht. H*Protein B hat eine Größe von 19,1 kDa. Hier stellt der funktionelle Anteil 50% der Gesamtmasse dar. *E. coli* war deutlich sensitiver gegenüber H*Protein B als gegenüber H*Protein A. Bei den anderen untersuchten Referenzbakterien war im Gegensatz dazu eine etwas höhere Empfindlichkeit gegenüber H*Protein A zu beobachten.

Zur Charakterisierung des Einflusses des Wachstumsmediums auf die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber den rekombinanten Fusionshydrophobinen wurden Hirn-Herz

Bouillon (BHI), Müller-Hinton Medium (MH) und BM2 Medium (BM2) eingesetzt. BHI und MH sind nährstoffreiche Komplexmedien, die für die Kultur von anspruchsvollen Organismen geeignet sind. MH wird standardmäßig zur Bestimmung der Sensitivität von Mikroorganismen gegenüber antibakteriellen Substanzen eingesetzt. BM2 ist ein Mineralmedium, das überwiegend aus Salzen besteht. Hier müssen sich die Bakterien die zum Wachstum benötigten Bausteine unter Energieverbrauch selber synthetisieren. Die Referenzbakterien zeigten im Durchschnitt eine höhere Empfindlichkeit in MH als in BHI Medium.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sowohl H*Protein A als auch H*Protein B antibakteriell wirken und das Bakterienwachstum der untersuchten Gram-positiven und Gram-negativen Referenzbakterien und der eukaryotische Hefe *P. pastoris* inhibieren. Gram-positive und Gram-Negative Referenzbakterien zeigten im Durchschnitt eine ähnliche Sensitivität.

2.2.3 Einfluss der Fusionshydrophobine auf die Kultivierbarkeit der Bakterien

Bei antimikrobiellen Substanzen unterscheidet man eine bakteriostatische und eine bakterizide Wirkung. Bakteriostatisch bedeutet, dass die Mikroorganismen reversibel im Wachstum gehemmt werden. Wirken die antimikrobiellen Substanzen dagegen bakterizid, werden die Mikroorganismen abgetötet und ihre Zahl verringert sich effektiv. Um zu überprüfen, ob die Fusionshydrophobine das Bakterienwachstum hemmen oder die Bakterien abtöten, wurde das Bakterienwachstum in Gegenwart der Fusionshydrophobine mit Trübungsmessungen analysiert und parallel die Kultivierbarkeit dieser Bakterien auf Agarplatten untersucht.

Die Referenzbakterien wurden in BHI Medium mit 0, 0,5 und 5 mg/mL H*Protein B bei 37°C für 20 Std. inkubiert. Die gewählten H*Protein B Konzentration lagen unter bzw. über den im Bouillon-Dilutionsverfahren bestimmten MHK-Werten (Tabelle 1). Das Bakterienwachstum wurde durch regelmäßige Messungen der OD₆₀₀ kontrolliert. Zur Bestimmung der Kultivierbarkeit wurden zu Beginn der Inkubation, nach 4,5 und 20 Std. die koloniebildenden Einheiten (KBE) auf BHI-Agar-Platten bestimmt.

Wie aufgrund der zuvor bestimmten MHK-Werte zu erwarten war, wurde das Wachstum von *E. coli* in Gegenwart von 5 mg/mL H*Protein B gehemmt (Abbildung 16, links). Eine Konzentration von 0,5 mg/ml H*Protein B hatte keinen Einfluss auf das Bakterienwachstum. Die Wachstumskurve war identisch mit der Wachstumskurve in BHI Medium ohne Fusionshydrophobin. Bei einer Konzentration von 5 mg/mL H*Protein B im Nährmedium wurde das Bakterienwachstum gehemmt, aber auch nach 20-stündiger Inkubation waren die Bakterien noch kultivierbar (Abbildung 16, rechts). Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien veränderte sich während der Inkubation in Nährmedium mit 5 mg/mL H*Protein B nicht.

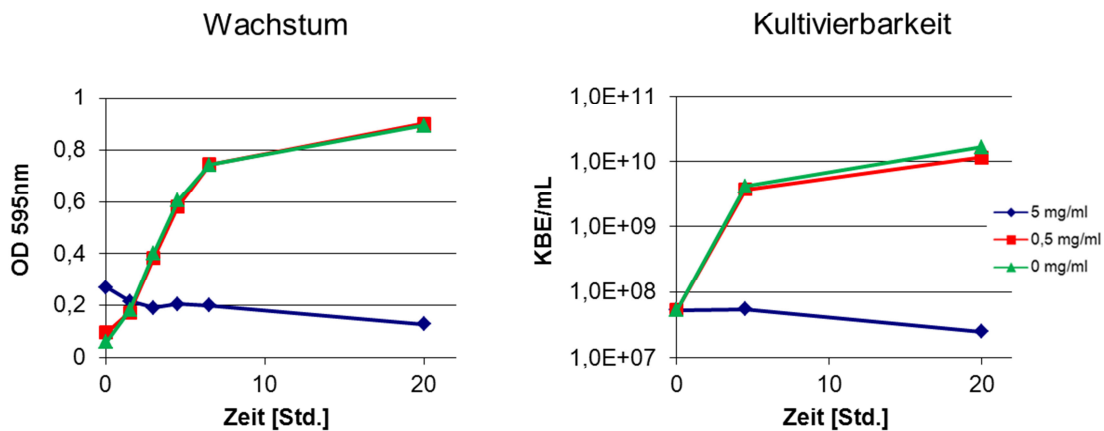
Escherichia coli

Abbildung 16. Untersuchung des Wachstums (Trübungsmessung OD₆₀₀) (links) und der Kultivierbarkeit (KBE) (rechts) von *E. coli* in BHI Medium mit verschiedenen H*Protein B Konzentrationen während einer 20-stündigen Inkubation. Es wurde BHI Medium ohne H*Protein B und mit 0,5 mg/mL bzw. 5 mg/mL H*Protein B verwendet.

Die Referenzbakterien *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* Pa49R, *S. aureus* und *E. faecalis* zeigten ein analoges Verhalten.

Die Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B wirkten bakterio­statisch. Sie hemmten das Bakterienwachstum, töteten die Bakterien jedoch nicht ab. Die Kultivierbarkeit der Bakterien blieb auch nach 20-stündiger Inkubation mit Fusionshydrophobin-Konzentrationen oberhalb der MHK erhalten.

2.2.4 Zusammenfassung des Einflusses der Fusionshydrophobine

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B wirkten bakterio­statisch gegenüber verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Referenzbakterien und der Hefe *P. pastoris*. In Abhängigkeit der verwendeten Bakte­rien- bzw. Hefeart, dem Fusionshydrophobin und dem Wachstumsmedium lag die MHK für H*Protein A und H*Protein B zwischen 0,63 und 5 mg/mL. Gram-positive und Gram-negative Referenzbakterien zeigten in unterschiedlichen Wachstumsmedien im Durchschnitt eine ähnliche Sensitivität gegenüber H*Protein A und H*Protein B. Das Wachstum der Mikroorganismen wurde durch die Fusionshydrophobine inhibiert, aber auch nach 20-stündiger Inkubation mit einer Fusionshydrophobin-Konzentration oberhalb der MHK waren die Bakterien noch kultivierbar.

Diese antibakterielle Wirkung zusammen mit den für natürliche Hydrophobine beschriebenen Eigenschaften macht H*Protein A und H*Protein B zu interessanten Kandidaten für biomimetische Oberflächenbeschichtungen zur Beeinflussung des bakteriellen Biofilmwachstums.

2.3 Biomimetische Oberflächenmodifikation mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B

Ausgehend von den für natürliche Hydrophobine beschriebenen, einzigartigen Eigenschaften wurden die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B für die biomimetische Oberflächenmodifikation eingesetzt.

Es wurde das Anlagerungsverhalten von H*Protein A und H*Protein B untersucht und die für natürliche Hydrophobine typische Veränderung der Oberflächenhydrophobizität analysiert. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde ein Standardprotokoll zur Beschichtung von verschiedenen hydrophilen und hydrophoben Materialien etabliert. Die Beschichtungen wurden im Hinblick auf die Homogenität und die Stabilität sowie die Konformation der Proteine auf der Oberfläche charakterisiert.

2.3.1 Anlagerungsverhalten von H*Protein A und H*Protein B

Das Anlagerungsverhalten der Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B auf SiO₂-Oberflächen wurde mit einer Quarzkristall-Mikrowaage (engl. quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D)) untersucht.

Schwingquarz-Technologien, wie die Quarzkristall-Mikrowaage, haben eine breite Anwendung als empfindliche Massensensoren. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Massenzunahme durch die Anlagerung von z.B. Proteinen an den Schwingquarz eine direkt proportionale Änderung der Schwingungsresonanzfrequenz verursacht. Man erhält dadurch eine Waage mit einer Empfindlichkeit im Nanogrammbereich. Mitte der 90er-Jahre wurden Messungen mit Schwingquarzkristallen auf den flüssigen Bereich erweitert. Im Gegensatz zu den starren Filmen im Vakuum sind die adsorbierten Filme im flüssigen Medium oft sehr weich und können viel Lösungsmittel (in der Regel Wasser) enthalten. QCM-D Systeme bestimmen daher neben der Änderung der Resonanzfrequenz auch das Dämpfungsverhalten (Dissipation) der adsorbierten Filme. Die Änderung der Resonanzfrequenz enthält Informationen zur Massenzunahme, während die Dissipation viskoelastische Informationen des adsorbierten Films liefert. QCM-D Messungen werden heute vor allem im biologischen Bereich eingesetzt, um molekulare Wechselwirkungen und Adsorptionen an unterschiedlichen Oberflächen zu untersuchen.

QCM-D Messungen ermöglichten das online-Monitoring der Hydrophobinanlagerung an eine Sensoroberfläche. Um ein Beschichtungsprotokoll für die rekombinanten Fusionshydrophobine zu entwickeln, wurde zuerst der Einfluss des Lösungsmittels auf die Proteinadsorption untersucht.

Es wurde die Anlagerung von H*Protein A und H*Protein B gelöst in H₂O dest. bzw. Tris-Puffer (50 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 8,0) in einer Konzentration von 10 µM auf

einem SiO₂-beschichteten Schwingquarz über einen Zeitraum von 4 Std. analysiert. SiO₂-Oberflächen sind hydrophil und den in weiteren Untersuchungen als Referenzmaterial verwendeten Glasoberflächen sehr ähnlich. Die Messungen wurden bei 20°C und einer konstanten Flussrate von 50 µL/min durchgeführt.

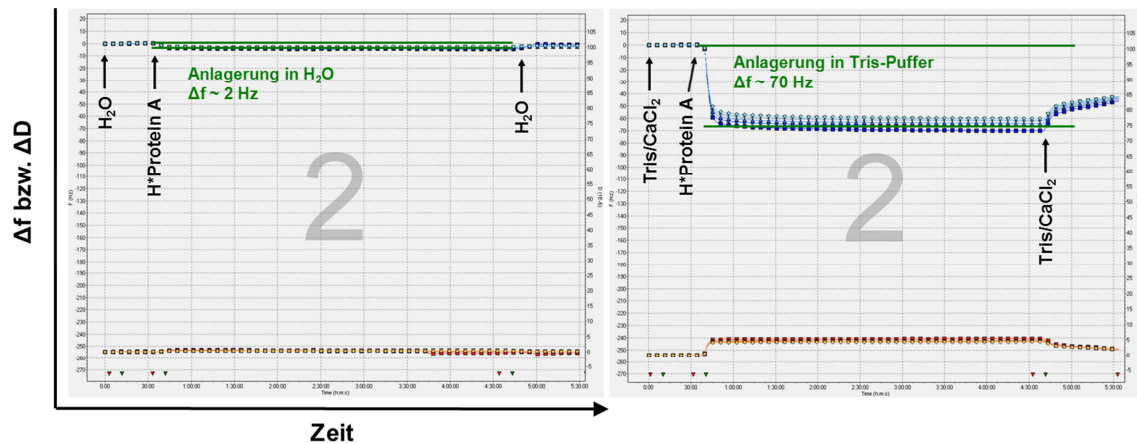


Abbildung 17. Repräsentative QCM-D Sensogramme der Anlagerung von H*Protein A gelöst in H₂O dest. (links) und Tris-Puffer (50 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 8,0) (rechts) an eine hydrophile SiO₂-Oberfläche. Es sind die Änderung der Resonanzfrequenz (blaue Graphen) und der Dissipation (rote Graphen) über die Zeit während der Proteinanlagerung mit einer Konzentration von 10 µM und einer konstanten Flussrate von 50 µL/min bei 20°C dargestellt. Es wurden die Daten der 3. bis 13. Obertöne verwendet.

In Abbildung 17 ist exemplarisch das Anlagerungsverhalten von H*Protein A gelöst in H₂O dest. (links) und in Tris-Puffer (rechts) dargestellt. Die x-Achse zeigt die Zeit und die y-Achse die Änderung in der Resonanzfrequenz (Δf) bzw. der Dissipation (ΔD) der gemessenen Obertöne. Die Bindung des Hydrophobins an die SiO₂-Sensoroberfläche ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Resonanzfrequenz (blaue Graphen) und eine Zunahme der Dissipation (rote Graphen). In Wasser gelöste Hydrophobine lagerten sich in einer sehr geringen Menge an der Oberfläche an. Es wurde eine Änderung der Resonanzfrequenz von 2 Hz erreicht. Durch die Verwendung von Tris-Puffer als Lösungsmittel kam es zu einer deutlich stärkeren Proteinanlagerung. Hier wurde ein Δf von 70 Hz und ein ΔD von 5 x 10⁻⁶ detektiert. H*Protein B zeigte ein ähnliches Anlagerungsverhalten in H₂O dest. und Tris-Puffer.

Das verwendete Lösungsmittel spielte eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur der Hydrophobine und beeinflusste somit auch die amphiphilen Eigenschaften und die Anlagerung an die Oberfläche. In allen weiteren Versuchen wurde daher Tris-Puffer als Lösungsmittel zur Oberflächenbeschichtung eingesetzt.

2.3.2 Veränderung der Oberflächenhydrophobizität durch die Hydrophobinbeschichtung

Beschichtung von hydrophilen Materialien

Natürliche Hydrophobine sind amphiphile Proteine, die sich an Grenzflächen in sehr stabilen Filmen anlagern. Ein Hauptmerkmal dieser Filme ist die Änderung bzw. Umkehrung der Oberflächenhydrophobizität. Für Untersuchungen zur Veränderung der Oberflächenhydrophobizität durch die Beschichtungen mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B wurden Glasobjektträger als hydrophile Ausgangsmaterialien (CA 11°) eingesetzt.

Die Beschichtung der Oberflächen erfolgte in Anlehnung an Janssen *et al.* (2004). Zur Herstellung einer 20-fach konzentrierten Proteinstocklösung (200 μM ; H*Protein A 9,2 mg/mL; H*Protein B 3,8 mg/mL) wurden die Fusionshydrophobine bei Raumtemperatur unter starkem Rühren 2 Std. in H_2O dest. gelöst. Ausgehend von dieser Stocklösung wurden für die Beschichtungen Proteinlösungen mit einer Konzentration von 10 μM in Beschichtungspuffer (50 mM Tris, 1 mM CaCl_2 , pH 8,0) hergestellt. Mit der Konzentration in μM wurde, im Gegensatz zu der oft bei natürlichen Hydrophobinen verwendeten Konzentrationsangabe in $\mu\text{g/mL}$, sichergestellt, dass trotz der sehr unterschiedlichen Masse der Fusionshydrophobine, in allen Ansätzen die gleiche Anzahl an Hydrophobinmolekülen vorliegt. Die Konzentration 10 μM entspricht bei reinen Hydrophobinen mit einer durchschnittlichen Größe von 10 kDa einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ und damit der in der Literatur beschriebenen Konzentration für Hydrophobinbeschichtungen. Die Stocklösungen der Fusionshydrophobine mussten in Wasser hergestellt werden, da ein direktes Lösen der Hydrophobine in Beschichtungspuffer nicht möglich war. Wie in QCM-D Untersuchungen (Abbildung 17) gezeigt werden konnte, spielt das verwendete Lösungsmittel eine entscheidende Rolle bei der Anlagerung der Proteine an eine Oberfläche. In Beschichtungspuffer wurde die Ausbildung der dreidimensionalen Hydrophobinstruktur und damit die Anlagerung an die Oberfläche begünstigt, die Löslichkeit dadurch jedoch verringert.

Um die grundlegenden Eigenschaften der Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B auf hydrophilen Oberflächen zu verstehen, wurden verschiedene Parameter, die einen Einfluss auf das Anlagerungsverhalten und die Ausbildung der postulierten Monolage haben könnten, variiert.

Diese Parameter waren:

- die Beschichtungstemperatur
- die Inkubationsdauer
- die Konformation des Hydrophobins (α -helikal, β -Faltblatt)

Die Glasoberflächen wurden für 1, 6 und 16 Std. bei 20°C und 80°C in der jeweiligen Hydrophobinlösung inkubiert. Hierbei erfolgte die Anlagerung der Hydrophobine in der für natürliche Hydrophobine beschriebenen α -helikalen Übergangsform (Janssen *et al.* 2004). Die Oberflächen wurden anschließend dreimal 10 min. in H₂O dest. gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Ein Teil der Materialien wurde zur Analyse der Stabilität der Beschichtung und der Umwandlung der Proteinkonformation in die β -Faltblattform weiter behandelt. Hierzu wurden die Oberflächen für 10 min. in einer 80°C heißen 2%igen SDS-Lösung inkubiert, anschließend erneut dreimal 10 min. in H₂O dest. gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proteinkonzentration der Hydrophobin-Lösungen wurde vor und nach dem Einsatz zur Oberflächenbeschichtung mit dem BCA-Assay bestimmt. Es wurden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede aufgrund der Oberflächenbeschichtung festgestellt.

Um die Anlagerungseffizienz der Hydrophobine auf den Oberflächen zu untersuchen und den Einfluss der Hydrophobinbeschichtung auf die Oberflächenhydrophobizität zu bestimmen, wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Die Kontaktwinkel eines 5 μ L H₂O dest. Tropfens wurden wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben an mindestens fünf unterschiedlichen Stellen auf den Oberflächen mit der „Sessile Drop“ Technik bestimmt.

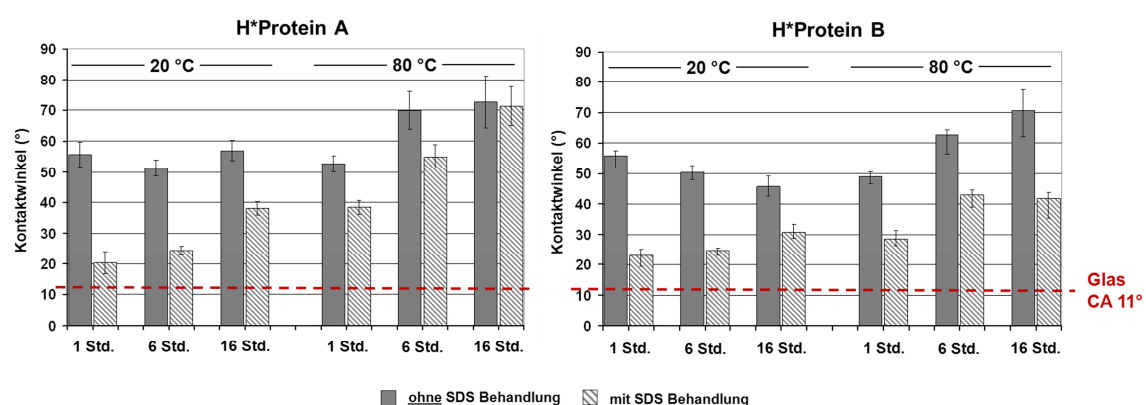


Abbildung 18. Kontaktwinkel von mit H*Protein A (links) und H*Protein B (rechts) beschichteten Glasoberflächen. Dargestellt sind die Kontaktwinkel der Hydrophobinbeschichtungen für Inkubationszeiten von 1, 6 und 16 Std. bei 20°C bzw. 80°C. Die ausgefüllten Balken zeigen die Kontaktwinkel ohne und die gestreiften Balken mit SDS Behandlung (α -helikale bzw. β -Faltblatt Konformation). Glas ist ein hydrophiles Ausgangsmaterial und hat ohne Hydrophobinbeschichtung einen Kontaktwinkel von 11°.

Die gemessenen Kontaktwinkel zeigten, dass durch die Beschichtung mit den Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B die Hydrophobizität der Glasoberflächen deutlich erhöht wurde (Abbildung 18). Unbeschichtete Glasoberflächen hatten einen Kontaktwinkel von 11°. Durch die Beschichtung mit H*Protein A wurde nach 1-stündiger Inkubation bei 20°C ein Kontaktwinkel von 56° und nach 16-stündiger Inkubation von 57° erreicht. Die Hydrophobine lagerten sich innerhalb einer Stunde auf den Glasoberflächen an, und längere Inkubationszeiten führten nicht zu einer weiteren Erhöhung des

Kontaktwinkels. Ein Temperatureffekt wurde deutlich, als die Inkubationstemperatur auf 80°C erhöht wurde. Hier wurde nach 1-stündiger Inkubation ein Kontaktwinkel von 53° gemessen. Mit einer längeren Inkubationszeit wurde die Hydrophobizität weiter erhöht, und nach 16-stündiger Inkubation wurde ein Kontaktwinkel von 73° erreicht.

Oberflächenmodifikationen mit H*Protein B zeigten ein ähnliches Verhalten. Oberflächenbeschichtungen bei 20°C führten zu Kontaktwinkeln von 46° bzw. 56° nach 1- bzw. 16-stündiger Inkubation. Eine längere Inkubationszeit (16 Std.) bei erhöhter Temperatur (80°C) resultierte in einem erhöhten Kontaktwinkel von 71°. Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B assemblierten auf den Glasoberflächen und änderten temperatur- und inkubationszeitabhängig die Oberflächenhydrophobizität.

Die mit H*Protein A bzw. H*Protein B beschichteten Glasoberflächen wurden nach der primären Anlagerung der Fusionshydrophobine mit einer 2%igen SDS-Lösung behandelt, um die für natürliche Hydrophobine beschriebene stabile β -Faltblatt Konformation zu induzieren. Mit dieser Behandlung gingen Teile der Hydrophobinbeschichtung und korrespondierenden Oberflächenhydrophobizität verloren. Auf bei 20°C für 1 bzw. 6 Std. mit H*Protein A beschichteten Oberflächen wurden nach der SDS Behandlung nur noch Kontaktwinkel von 20° bzw. 24° gemessen. Auf Oberflächen, die für 16 Std. bei 20°C inkubiert worden waren, konnten, eventuell bedingt durch eine stärkere Hydrophobinbindung an die Oberfläche, noch Kontaktwinkel von 38° gemessen werden. Dieser Effekt verstärkte sich bei einer Inkubationstemperatur von 80°C. Auf Oberflächen, die für 1 bzw. 16 Std. bei 80°C inkubiert worden waren, konnten nach der SDS Behandlung Kontaktwinkel von 38° bzw. 71° gemessen werden. Oberflächenbeschichtungen mit H*Protein A für 16 Std. bei 80°C waren sehr stabil, und die erreichte Oberflächenhydrophobizität wurde durch die SDS Behandlung nicht beeinflusst.

Oberflächenmodifikationen mit H*Protein B zeigten ein sehr ähnliches Verhalten. Oberflächen, die für 1 bzw. 16 Std. bei 20°C beschichtet worden waren, hatten nach der SDS Behandlung noch Kontaktwinkel von 23° bzw. 31°. Beschichtungen mit einer langen Inkubationszeit (16 Std.) bei einer erhöhten Inkubationstemperatur (80°C) waren stabiler und hatten noch Kontaktwinkel von 42°.

Die bei 80°C durchgeführten Beschichtungen waren, im Vergleich zu den Beschichtungen bei Raumtemperatur, stabiler. Die Verluste durch die Umwandlung in die β -Faltblattform durch die SDS Behandlung waren geringer. Bei H*Protein A war bei einer Inkubationszeit von 16 Std. bei 80°C keine Änderung der Hydrophobizität durch die Konformationsänderung erkennbar. Obwohl in H*Protein A der Anteil des Fusionsproteins 80 % statt wie in H*Protein B nur 50% der Masse ausmacht, ist bei H*Protein A eine geringfügig stärkere Änderung der Oberflächenhydrophobizität und auch eine höhere Stabilität der Beschichtung erkennbar.

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass für eine effektive Beschichtung in α -helikaler Form schon kurze Inkubationszeiten bei niedriger Temperatur ausreichend waren. Für die Beschichtungen in der β -Faltblattform (nach der SDS Behandlung) wurden die besten Ergebnisse mit langen Inkubationszeiten (16 Std.) bei einer hohen Temperatur (80°C) erzielt.

Beschichtung von hydrophoben Materialien

Da natürliche Hydrophobine durch die Ausbildung amphiphiler Filme die Fähigkeit besitzen die Hydrophobizität von Oberflächen umzukehren, wurde das Anlagerungsverhalten der rekombinanten Fusionshydrophobine auch auf hydrophoben Referenzmaterialien analysiert. Hierfür wurde Teflon als Ausgangsmaterial ($CA\ 110 \pm 5^\circ$) eingesetzt. Die Teflonoberflächen wurden wie oben beschrieben mit den Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B beschichtet. Ausgehend von den Ergebnissen auf Glasoberflächen wurden die Beschichtungen mit einer Inkubationszeit von 16 Std. bei 80°C durchgeführt. Anschließend wurde die α -helikale Konformation der Hydrophobinbeschichtung durch SDS Behandlung in die β -Faltblatt Konformation überführt.

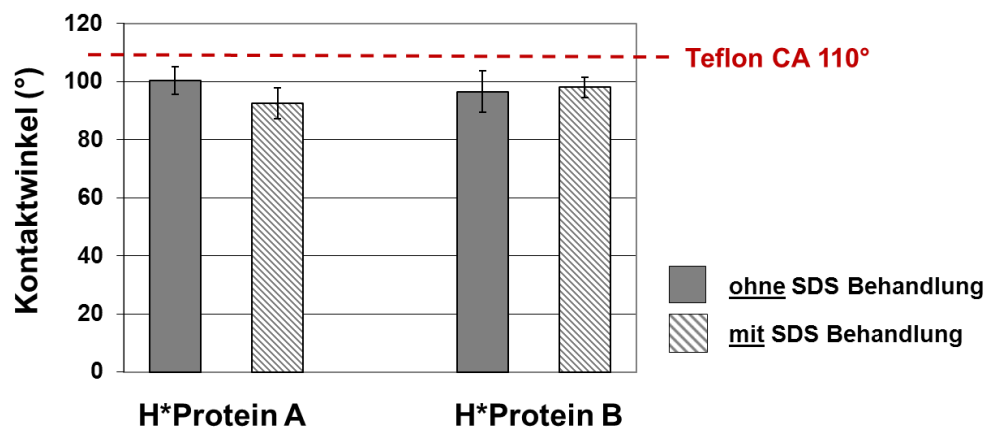


Abbildung 19. Kontaktwinkel von mit H*Protein A (links) und H*Protein B (rechts) beschichteten Teflonoberflächen. Dargestellt sind die Kontaktwinkel der Hydrophobinbeschichtungen für eine Inkubationszeit von 16 Std. bei 80°C. Die ausgefüllten Balken zeigen die Kontaktwinkel ohne und die gestreiften Balken mit SDS Behandlung (α -helikale bzw. β -Faltblatt Konformation). Teflon ist ein hydrophobes Ausgangsmaterial und hat ohne Hydrophobinbeschichtung einen Kontaktwinkel von 110°.

Die Veränderung der Oberflächenhydrophobizität der Teflonoberflächen durch die Hydrophobinbeschichtung ist in Abbildung 19 dargestellt. Die Beschichtung mit H*Protein A in α -helikaler Konformation (ohne SDS Behandlung) führte zu einer Kontaktwinkeländerung um 10° auf 100°. In der β -Faltblatt Konformation (mit SDS Behandlung) war die Änderung der Oberflächenhydrophobizität größer und es wurde ein Kontaktwinkel von 93° erreicht (Änderung um 17°). Die Beschichtung mit H*Protein B führte zu ähnlichen Veränderungen der ursprünglichen Oberflächenhydrophobizität. Mit H*Protein B in α -helikaler Konformation beschichtete Teflonoberflächen hatten

einen Kontaktwinkel von 97° , in β -Faltblatt Konformation von 98° (Änderung um 13° bzw. 12° im Vergleich zum Ausgangsmaterial).

Die bei 80°C für 16 Std. durchgeführten Beschichtungen waren stabil, so dass durch die SDS Behandlung, d.h. die Umwandlung in die β -Faltblatt-Konformation, keine signifikanten Verluste der erreichten Oberflächenhydrophobizität detektiert wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Eigenschaften der Hydrophobinbeschichtungen auf Glasoberflächen überein. Auch hier konnte durch die Beschichtung für 16 Std. bei 80°C eine stabile Hydrophobinschicht angelagert werden. Die Veränderung der Oberflächenhydrophobizität der Teflonoberflächen durch die Hydrophobinbeschichtung ist jedoch geringer als die der analog beschichteten hydrophilen Glasoberflächen. Bei den Glasoberflächen wurden durch die Beschichtung Änderungen in der Oberflächenhydrophobizität von bis zu 70° erreicht.

Beschichtung von Keramikmaterialien

Da eine spätere Anwendung der Hydrophobinbeschichtung unter anderem auf mineralischen Oberflächen z.B. im Sanitär- oder medizinischen Bereich angestrebt ist, wurde die Oberflächenmodifikation mit Hydrophobinen auch auf keramischen Materialien getestet. Diese wurden freundlicherweise von der Firma Villeroy & Boch zur Verfügung gestellt.

Bei den Keramikmaterialien handelt es sich um Sanitärporzellan und Steingutfliesen. Beide Materialien haben einen sogenannten „2-Schichtaufbau“, d.h. auf den Scherben liegt eine keramische Glasur. Das Sanitärporzellan besteht aus den Rohstoffen Kaolin, Feldspat, Quarz, Kreide und Zirkonsilikat und hat gebrannt eine Zusammensetzung von 55,15 Gew% SiO_2 , 9,99% Al_2O_3 , 8,06% CaO , 2,94% Na_2O und 1,20% ZrO_2 . Das Sanitärporzellan wird aus flüssigem Schlicker (ca. 75 Gew% Feststoff (Ton, Kaolin, Feldspat, Quarz und Pegamit) in Wasser) hergestellt und mittels Hohl-guss in Gipsformen gefüllt, getrocknet, glasiert und gebrannt.

Die Beschichtung der Keramikmaterialien erfolgte analog zur Beschichtung der Glasoberflächen. Nach der primären Hydrophobinanlagerung in der α -helikalen Zwischenform wurde eine Behandlung mit 2% SDS bei 80°C durchgeführt, um eine Umlagerung der Hydrophobine in die stabile β -Faltblatt Konformation zu erreichen. Neben der Konformationsänderung diente der SDS-Schritt auch der Untersuchung der Stabilität der Hydrophobinbeschichtung.

Bei Sanitärporzellan und Steingutfliesen handelte es sich um hydrophile Ausgangsmaterialien mit einem Kontaktwinkel von 45 - 50° . Durch die Beschichtung mit H*Protein A und H*Protein B wurden die hydrophilen Keramikmaterialien deutlich hydrophober. Die Hydrophobine lagerten sich innerhalb einer Stunde in α -helikaler Konformation auf den Keramikoberflächen an und führten auf den Steingutfliesen und der Sanitärkeramik zu

einem Kontaktwinkel von 80° (Abbildung 20). Auch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von Raumtemperatur auf 80°C und eine Verlängerung der Inkubationszeit von einer auf 16 Std. führte zu keiner weiteren Erhöhung des Kontaktwinkels.

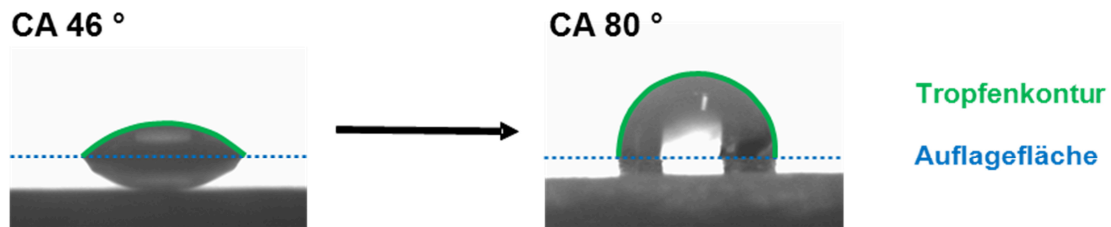


Abbildung 20. Veränderung der Oberflächenhydrophobizität von Sanitärporzellan durch die Beschichtung mit H*Protein A bei 80°C für 16 Std.

Auf Glas als hydrophilem Ausgangsmaterial wurde, wie gezeigt, mit einer Inkubationszeit von 16 Std. bei 80°C ebenfalls ein Kontaktwinkel von etwa 80° erreicht. Bei der Anlagerung der Fusionshydrophobine auf einem hydrophilen Material wird die hydrophobe Seite der Proteine exprimiert. Der Kontaktwinkel der ausgebildeten Hydrophobinschicht ist daher unabhängig vom Kontaktwinkel des Ausgangsmaterials, sondern wird alleine durch den hydrophoben Bereich der Fusionshydrophobine bestimmt.

Durch die SDS Behandlung, d.h. die Umwandlung der intermediären α -helikalen in die stabile β -Faltblatt Konformation, ging auf den Keramikmaterialien viel der ursprünglich gewonnenen Hydrophobizität verloren. Wie bei den Glasoberflächen war auch hier ein Einfluss von Inkubationstemperatur und Inkubationszeit erkennbar. Bei Beschichtungen, die bei Raumtemperatur oder für 1 Std. bei 80°C durchgeführt worden waren, wurden sehr große Teile der Beschichtung durch die SDS Behandlung entfernt. Beschichtungen mit einer Inkubationszeit von 16 Std. bei 80°C zeigten dahingegen nur einen geringen Verlust an Oberflächenhydrophobizität. Hier war eine effektive Umwandlung der α -helikalen in die stabile β -Faltblatt Endform möglich.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die Anlagerung der Fusionshydrophobine auf hydrophilen und hydrophoben Materialien die Oberflächenhydrophobizität verändert wurde. Auf hydrophilen Materialien ($CA < 90^\circ$) kam es aufgrund der gerichteten Anlagerung der rekombinanten Fusionshydrophobine und der Eigenschaften des exponierten hydrophoben Bereiches zur Ausbildung eines Kontaktwinkels von etwa 80°. Die Anlagerung war temperatur- und zeitabhängig und Beschichtungen für 16 Std. bei 80°C führten zur höchsten und auch stabilsten Veränderung der Oberflächenhydrophobizität.

2.3.3 Untersuchung der Beschichtungshomogenität mit Immunfluoreszenzmikroskopie

Neben der Veränderung der Oberflächenhydrophobizität spielt bei Oberflächenmodifikationen auch die Homogenität eine entscheidende Rolle. Um die Homogenität der Hydrophobinbeschichtungen zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von unterschiedlich beschichteten Oberflächen (Variation der Inkubationstemperatur und Inkubationszeit) durchgeführt. Immunfärbungen bzw. Antikörperfärbungen werden in der Biologie und Medizin angewandt, um Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen. Zur Immunfluoreszenzfärbung der Fusionshydrophobine wurde ein monoklonaler primärer Anti-His Antikörper verwendet, der an den His-Tag der auf der Oberfläche angelagerten Hydrophobine bindet. Die Detektion erfolgte über einen fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper. Dieser bindet an die Fc-Region des primären Antikörpers und wurde mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops detektiert.

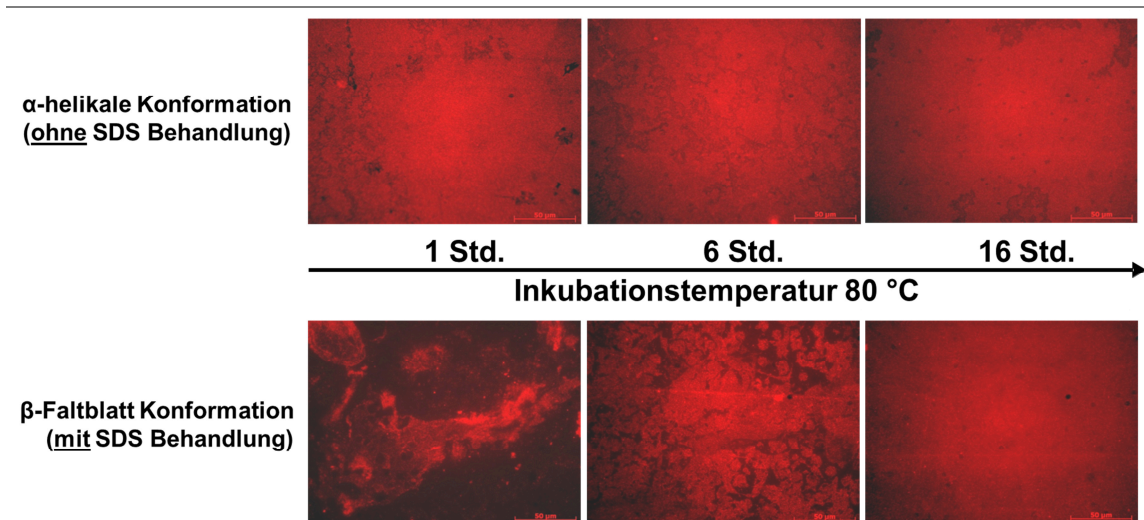


Abbildung 21. Untersuchung der Beschichtungshomogenität auf Glasoberflächen beschichtet mit H*Protein B bei 80°C für 1, 6 und 16 Std. ohne (obere Reihe) und mit (untere Reihe) SDS Behandlung. Die Hydrophobinbeschichtung wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Hierbei wurde als primärer Antikörper ein Anti-His Antikörper und als sekundärer Antikörper ein Cy 3.5-markierter Antikörper eingesetzt.

Beschichtungen von Glasoberflächen mit H*Protein A und H*Protein B zeigten hinsichtlich der Homogenität ein sehr ähnliches Verhalten. Hydrophobinbeschichtungen, die bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, bildeten bereits nach einer kurzen Inkubationszeit (1 Std.) eine sehr homogene Schicht in α -helikaler Konformation. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu keinem signifikant besseren Ergebnis. Durch die SDS Behandlung, d.h. die Umwandlung der α -helikalen in die β -Faltblatt Konformation, ging jedoch viel der ursprünglichen Homogenität verloren. Auf Glasoberflächen, die für 1 bzw. 6 Std. bei Raumtemperatur beschichtet worden waren, war nach der β -Faltblatt Umwandlung keine Hydrophobinbeschichtung mehr mit Immunfluoreszenz-

Mikroskopie detektierbar. Diese Ergebnisse bestätigten die Daten der Kontaktwinkel-messung, dass bei Beschichtungen bei Raumtemperatur Teile der Hydrophobinbe-schichtung und damit auch der Hydrophobizität durch die SDS Behandlung verloren gehen.

Oberflächenmodifikationen bei 80°C waren im Vergleich zu Beschichtungen bei Raumtemperatur sehr viel homogener. Es waren auch hier keine signifikanten Unter-schiede in α -helikaler Konformation zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten erkennbar. Alle Beschichtungen in α -helikaler Konformation waren homogen (Abbildung 21, obere Reihe). Bei der Umwandlung in die β -Faltblatt Konformation wurden Unter-schiede deutlich. Je länger die anfängliche Inkubationszeit war, desto homogener blieb die Beschichtung auch nach der Umwandlung (Abbildung 21, untere Reihe). Beschich-tungen bei 80°C für 16 Std. waren in α -helikaler und β -Faltblatt Konformation mikrosko-pisch homogen.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen ergänzten und bestätigten die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen. Für Beschichtungen in α -helikaler Konforma-tion reichten bereits kürzere Inkubationszeiten bei einer niedrigeren Temperatur aus. Für eine homogene Beschichtung in β -Faltblatt Konformation war jedoch eine längere Inkubationszeit und eine hohe Inkubationstemperatur notwendig. Erst Oberflächen, die für 16 Std. bei 80°C beschichtet worden waren, zeigten die gleiche Hydrophobizität und Homogenität in α -helikaler und β -Faltblatt Konformation.

2.3.4 Etablierung eines Standardbeschichtungsprotokolls

Ausgehend von den Ergebnissen zum Anlagerungsverhalten der rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B, der Analyse der Veränderung der Oberflächenhydrophobizität durch die Hydrophobinbeschichtung und der Bestimmung der Homogenität dieser Proteinschicht, wurde ein Standardbeschichtungsprotokoll etabliert (Abbildung 22).

Für alle weiteren Untersuchungen wurden die Oberflächen für 16 Std. bei 80°C beschichtet.

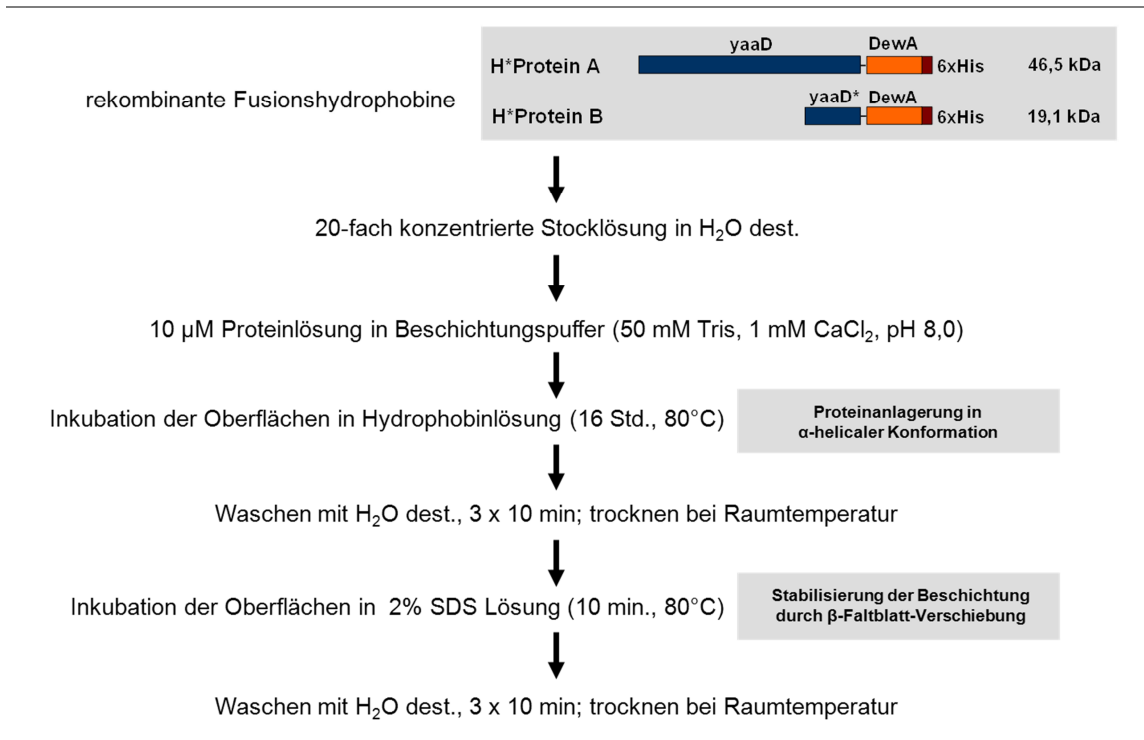


Abbildung 22. Standardprotokoll zur Durchführung der Oberflächenbeschichtung mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B auf verschiedenen Materialien.

2.3.5 Charakterisierung der Beschichtungshomogenität auf der Nanoskala

Neben der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zur Bestimmung der Homogenität der Hydrophobinbeschichtung wurden die beschichteten Oberflächen auch mit Rasterelektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie untersucht. Hier war eine Charakterisierung der Homogenität auf der Nanoskala möglich.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Als Rasterelektronenmikroskop (REM) (engl. scanning electron microscope, SEM) bezeichnet man ein Elektronenmikroskop, bei dem ein Elektronenstrahl in einem bestimmten Muster über das vergrößert abzubildende Objekt geführt (gerastert) wird. Die Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Objekt werden zur Erzeugung eines Bildes genutzt. Die mit einem Rasterelektronenmikroskop erzeugten Bilder sind Abbildungen der Objektoberflächen.

Neben den rekombinanten Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B wurde für diese Untersuchungen auch das „reine“ Hydrophobin DewA-His eingesetzt. Als Ausgangsmaterial wurden Goldoberflächen verwendet, die bei 80°C für 16 Std. beschichtet wurden.

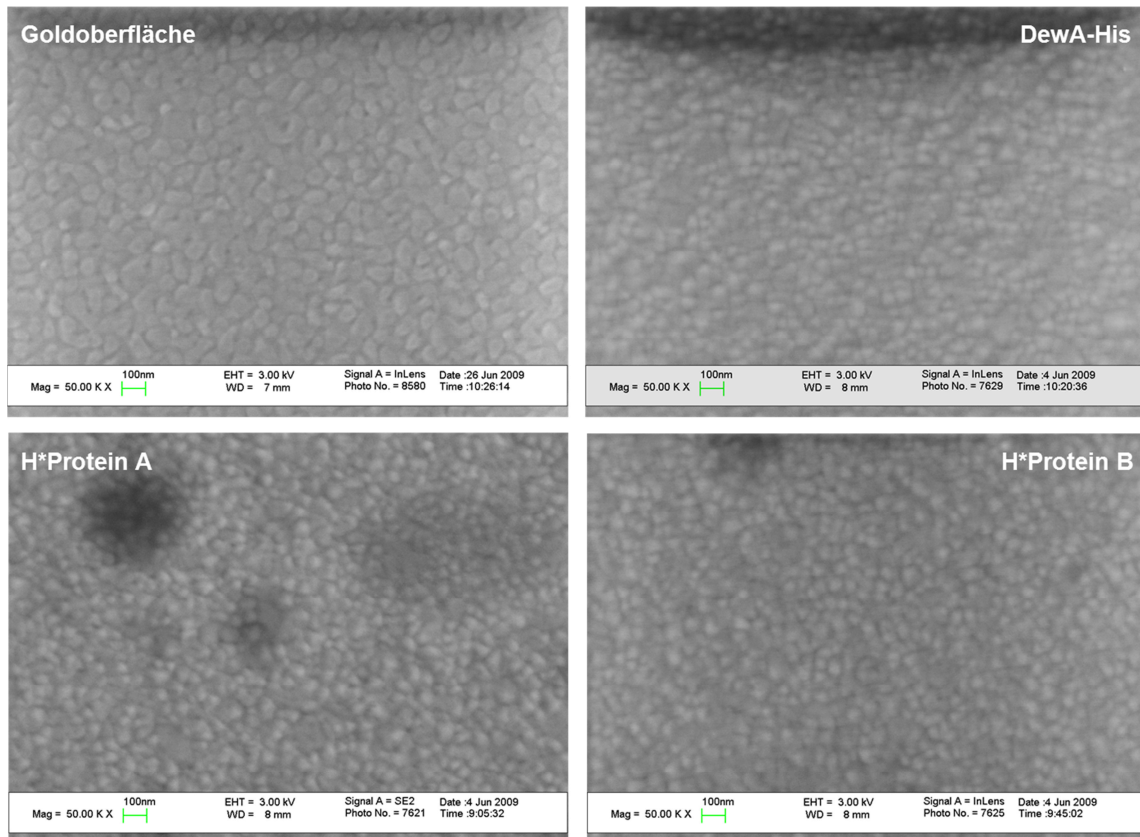


Abbildung 23. REM-Aufnahmen (50.000fache Vergrößerung) von einer unbeschichteten Goldoberfläche und Goldoberflächen beschichtet mit DewA-His, H*Protein A und H*Protein B für 16 Std. bei 80°C.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 23) zeigten ein ähnliches Bild der Homogenität der Hydrophobinbeschichtung wie die Immunfluoreszenzmikroskopie. Auf allen beschichteten Oberflächen war eine homogene Proteinschicht zu erkennen. Die Proteine lagerten sich in einer globulären Struktur auf den Oberflächen an. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B und DewA-His zu erkennen.

Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscopy, AFM)

Zur Untersuchung der Struktur und der Homogenität der Hydrophobinbeschichtung auf der Nanoebene, wurde zusätzlich zur Rasterelektronenmikroskopie auch die Rasterkraftmikroskopie eingesetzt. Während der Messung tastet hier eine kleine Nadel, die an einer Blattfeder, dem sogenannten Cantilever, befestigt ist, mechanisch in einem definierten Raster die Oberfläche ab. Durch die Oberflächenstruktur der Probe biegt sich die Blattfeder positionsabhängig unterschiedlich weit. Durch das punktweise Aufzeichnen der Auslenkungen des Cantilevers mit Hilfe eines Lasers lässt sich eine Abbildung der Probenoberfläche erzeugen.

Es wurden Glasoberflächen als hydrophiles und Teflonoberflächen als hydrophobes Ausgangsmaterial für die Hydrophobinbeschichtung und anschließende Charakterisierung mit AFM eingesetzt.

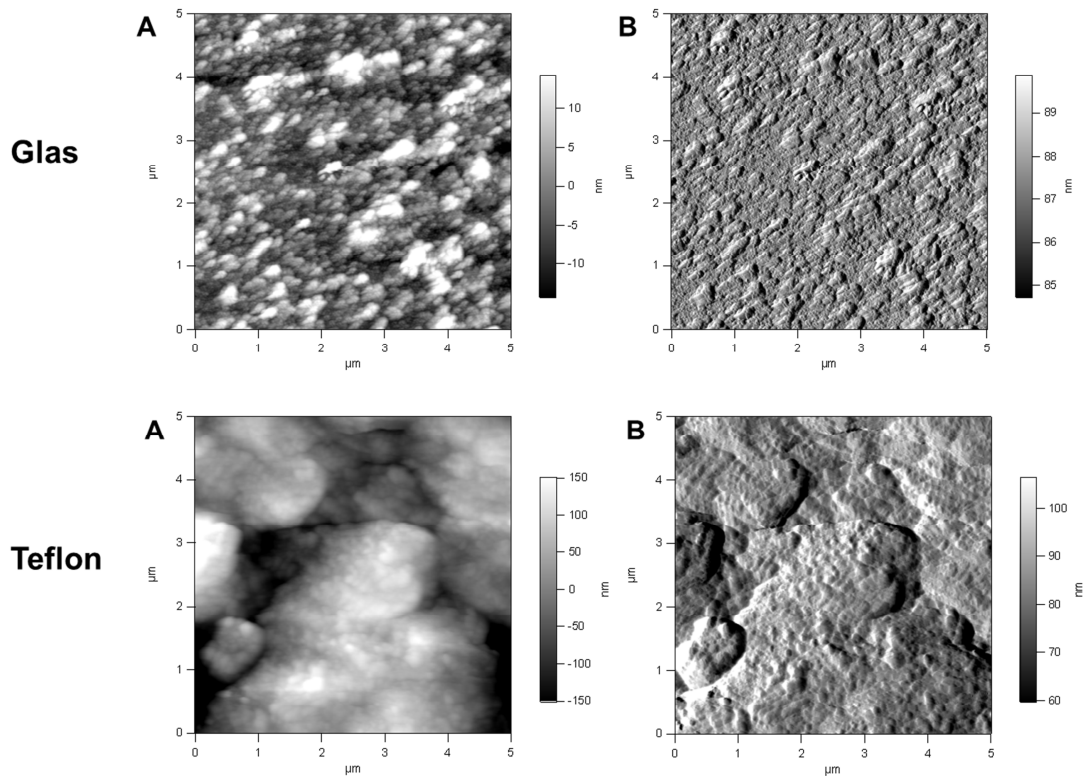


Abbildung 24. AFM-Aufnahmen von Glas- (oben) und Teflonoberflächen (unten) beschichtet mit H*Protein A für 16 Std. bei 80°C (α -helikale Konformation, ohne SDS Behandlung); **A** Höhenbild, **B** Amplitude.

Auf Glasoberflächen bildeten die rekombinanten Fusionshydrophobine eine geordnete Proteinschicht. Bei Beschichtungen mit H*Protein A in α -helikaler Konformation war eine homogene, globuläre Proteinanlagerung auf der Oberfläche erkennbar (Abbildung 24, obere Reihe). Dies stimmt mit den REM-Aufnahmen der Hydrophobinbeschichtung auf hydrophilen Goldoberflächen überein. Die Hydrophobinbeschichtung auf den hydrophoben Teflonoberflächen zeigte eine andere Struktur. Hier war keine strukturierte Anlagerung der Hydrophobine erkennbar (Abbildung 24, untere Reihe). Die Proteine bildeten auf der Oberfläche eine wolkige Schicht ohne eine klar erkennbare geordnete Proteinstruktur.

Bei Kontaktwinkelmessungen auf Hydrophobin-beschichteten Teflonoberflächen konnte im Gegensatz zu den hydrophilen Referenzoberflächen nur eine geringe Veränderung des Kontaktwinkels durch die Beschichtung festgestellt werden. Die typischen Hydrophobineigenschaften, wie die Umkehrung der Oberflächenhydrophobizität durch eine gerichtete Anlagerung, sind bei den Fusionshydrophobinen auf hydrophoben Ausgangsmaterialien nicht deutlich erkennbar. Die Fusionshydrophobine weisen aufgrund

ihrer dreidimensionalen Struktur und dem großen Fusionspartner ein unterschiedliches Anlagerungsverhalten und somit auch eine unterschiedliche Struktur und eine unterschiedlich starke Veränderung der Oberflächenhydrophobizität auf hydrophilen und hydrophoben Materialien auf.

Für eine weitere Charakterisierung der Struktur und der Rauigkeit der Hydrophobinbeschichtung wurden Glasoberflächen mit H*Protein A und H*Protein B für 16 Std. bei 80°C beschichtet und vor (α -helikale Konformation) und nach (β -Faltblatt Konformation) SDS Behandlung untersucht.

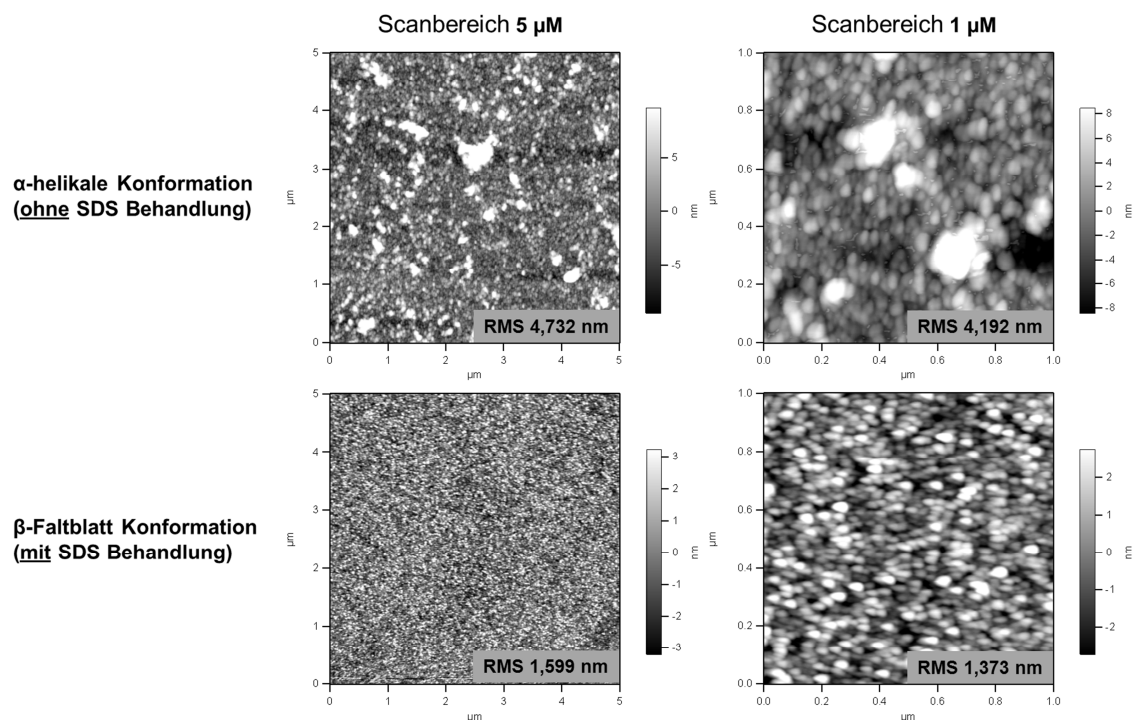


Abbildung 25. AFM-Aufnahmen (Höhenbilder) von Glasoberflächen beschichtet mit H*Protein A für 16 Std. bei 80°C. Die Proteinbeschichtung ist gezeigt in α -helikaler (obere Reihe) und β -Faltblatt Konformation (untere Reihe) und mit Scanbereichen von 5 μ m (linke Spalte) und 1 μ m (rechte Spalte). RMS = root mean square roughness (Oberflächenrauigkeit).

H*Protein A bildete bei der Anlagerung auf den Glasoberflächen in α -helikaler Konformation eine Proteinschicht mit einigen kleineren Aggregaten (Abbildung 25, obere Reihe). Nach der SDS Behandlung bei 80°C waren die Glasoberflächen immer noch dicht mit den Fusionshydrophobinen belegt. Die kleinen Aggregate, die an die homogene Proteinschicht gebunden hatten, wurden durch die SDS Behandlung entfernt. Die Proteinfilme des Fusionshydrophobins H*Protein A waren homogen und hochgeordnet (Abbildung 25, untere Reihe). Beschichtungen mit H*Protein B zeigten ein identisches Verhalten.

Neben der Homogenität und der Struktur der Hydrophobinbeschichtung wurde auch die Oberflächenrauigkeit mit AFM-Messungen bestimmt. H*Protein A und H*Protein B bildeten eine homogene Proteinschicht in α -helikaler Konformation. Die Oberflächenrauigkeit der H*Protein A Schicht auf der Glasoberfläche betrug 4,2 nm für einen Scanbereich von 1 μ m. H*Protein B Beschichtungen hatten eine Rauigkeit von 1,9 nm in einem Scanbereich von 1 μ m. Durch die β -Faltblatt Umwandlung (SDS Behandlung) wurden die Oberflächenbeschichtungen deutlich glatter mit Werten von 1,4 nm für H*Protein A und 1,6 nm für H*Protein B in einem Scanbereich von 1 μ m.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Fusionshydrophobine eine auch auf Nanoebene homogene Proteinschicht auf hydrophilen Glasoberflächen bilden. Es waren keine Unterschiede in der Struktur der unterschiedlich großen Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B und auch des „reinen“ Hydrophobins DewA-His erkennbar. Die Fusionshydrophobine bildeten eine geordnete Proteinschicht aus. Die Rauigkeit der Oberflächenbeschichtung wurde durch die SDS Behandlung verringert und vorhandene Proteinaggregate wurden entfernt. Auf hydrophobem Teflon konnte im Gegensatz zu den hydrophilen Ausgangsmaterialien keine geordnete Proteinschicht detektiert werden.

2.3.6 Spektroskopische Untersuchungen der Hydrophobinbeschichtung

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von hochgeordneten Proteinschichten auf einer Oberfläche besteht in der Anwendung von spektroskopischen Methoden. Diese Methoden können eine Aussage über die Anordnung und die Konformation eines Proteins auf einer definierten Oberfläche liefern. Zur Untersuchung der Hydrophobinbeschichtungen wurde eine spezielle Infrarot Spektroskopie (engl. infrared reflection absorption spectroscopy, IRRAS) eingesetzt. Bei dieser Form der Schwingungsspektroskopie werden Molekülschwingungen durch Infrarot-Strahlung angeregt, wobei ein Teil der Strahlung spezifisch durch die Molekülschwingungen absorbiert wird. IRRAS liefert zerstörungsfrei Informationen zu schwingungsspezifischen Gruppen und Strukturelementen von Oberflächen und es können Aussagen zum Ordnungsgrad und zum chemischen Zustand der Moleküle auf der Oberfläche getroffen werden. Das Substrat muss eine hohe Reflektivität besitzen, daher werden meist Metalle wie z.B. Gold eingesetzt.

Die IRRAS-Messungen wurden eingesetzt, um zum einen die Hydrophobinbeschichtung auf der Oberfläche spektroskopisch nachzuweisen und zum anderen, um Informationen über die Proteinkonformation vor und nach der SDS Behandlung zu erhalten. Für die Messungen wurden aufgrund der notwendigen Reflektivität des Substrates Goldoberflächen verwendet. Diese wurden für 16 Std. bei 80°C mit H*Protein A und

H*Protein B beschichtet. Ein Teil der Oberflächen wurde anschließend für die beschriebene Änderung der Proteinkonformation mit 2% SDS bei 80°C für 10 min. behandelt.

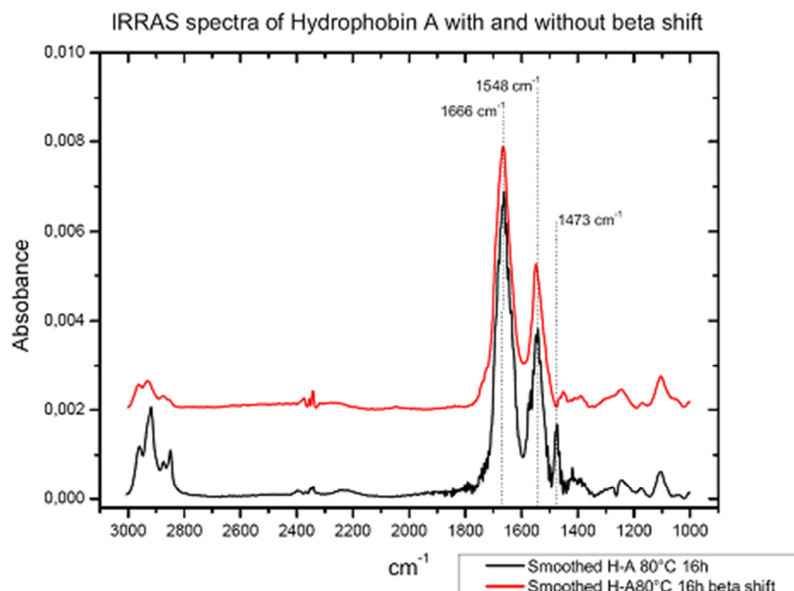


Abbildung 26. IRRAS-Spektren von Goldoberflächen beschichtet mit H*Protein A für 16 Std. bei 80°C in α -helikaler (schwarzer Graph) und β -Faltblatt Konformation (roter Graph).

In Abbildung 26 sind die IRRAS-Spektren für H*Protein A beschichtete Goldoberflächen in α -helikaler und β -Faltblatt Konformation dargestellt. Im oberen Wellenzahlenbereich (2800–3000 cm^{-1}) sind bei beiden Spektren die CH-Schwingungen zu erkennen. Im Bereich von etwa 1700 bis 1500 Wellenzahlen liegt der Amidbereich. Diese für Proteine typischen Peaks unterteilen sich in den Amid I Bereich, hier bei 1666 und den Amid II Bereich, hier bei 1548 Wellenzahlen. Zwischen der α -helikalen und der β -Faltblatt Konformation ist keine signifikante Verschiebung der Amid I und Amid II Region erkennbar, was auf eine Veränderung der Proteinkonformation durch die SDS Behandlung hindeuten würde. Interessant ist jedoch der nur in α -helikaler Form auftauchende charakteristische Peak im unteren Amidbereich bei 1473 Wellenzahlen. Ebenfalls interessant ist der Fingerprintbereich zwischen 1400 und 1000 Wellenzahlen. Dieser Bereich ist einzigartig für jedes Molekül. Hier sind charakteristische Unterschiede zwischen α -helikaler und β -Faltblatt Konformation erkennbar. Die Spektren von H*Protein B beschichteten Goldoberflächen sind sehr ähnlich und zeigten ein identisches Peakmuster im Fingerprintbereich.

Mit IRRAS Messungen war der Nachweis der Hydrophobine auf der Oberfläche möglich. Die Spektren der beschichteten Oberflächen zeigten ein für die α -helikale und die β -Faltblatt Konformation charakteristisches Peak-Muster im Fingerprint-Bereich. Eine Verschiebung der α -helikalen in die postulierte β -Faltblatt Konformation konnte nicht eindeutig detektiert werden.

2.3.7 Bestimmung der angelagerten Hydrophobinmenge und Schichtdicke

Der Einfluss des Lösungsmittels auf das Anlagerungsverhalten der rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B auf SiO₂-Oberflächen wurde mit QCM-D Messungen untersucht (Kapitel 2.3.1). Zusätzlich zur Untersuchung der Adsorptionskinetiken wurde die QCM-D Technik auch eingesetzt, um die viskoelastischen Eigenschaften des adsorbierten Proteinfilms und die angelagerte Proteinmenge und Schichtdicke zu bestimmen.

Abbildung 27 zeigt ein QCM-D Sensogramm der Adsorption von H*Protein A auf einem hydrophilen SiO₂-beschichteten Schwingquarz. Die Adsorption wurde analog zum etablierten Standardbeschichtungsprotokoll über einen Zeitraum von 16 Std. analysiert. Die x-Achse zeigt die Zeit und die y-Achse die Änderung in der Resonanzfrequenz (Δf) (Abbildung 27, links) bzw. der Dissipation (ΔD) (Abbildung 27, rechts) der gemessenen Obertöne. Die Bindung des Hydrophobins an die SiO₂-Sensoroberfläche ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Frequenz und eine Zunahme der Dissipation. Nach der Zugabe adsorbierte H*Protein A sehr schnell an die Sensoroberfläche. Die resultierenden Frequenz- und Dissipationsänderungen blieben während der folgenden 16 Std. konstant. Ein ähnliches Anlagerungsverhalten wurde auch für H*Protein B beobachtet. Die ausgebildeten Proteinlagen waren stabil und praktisch kein gebundenes Protein wurde durch einen abschließenden Spülschritt mit Beschichtungspuffer von der Oberfläche entfernt. H*Protein A (46,5 kDa) verursachte eine Frequenzänderung von bis zu 80 Hz bei einer Dissipationsänderung von 6×10^{-6} . Die Anlagerung des kleineren Fusionshydrophobins H*Protein B (19,1 kDa) führte zu einem Δf von bis zu 65 Hz und einem ΔD von $3,5 \times 10^{-6}$.

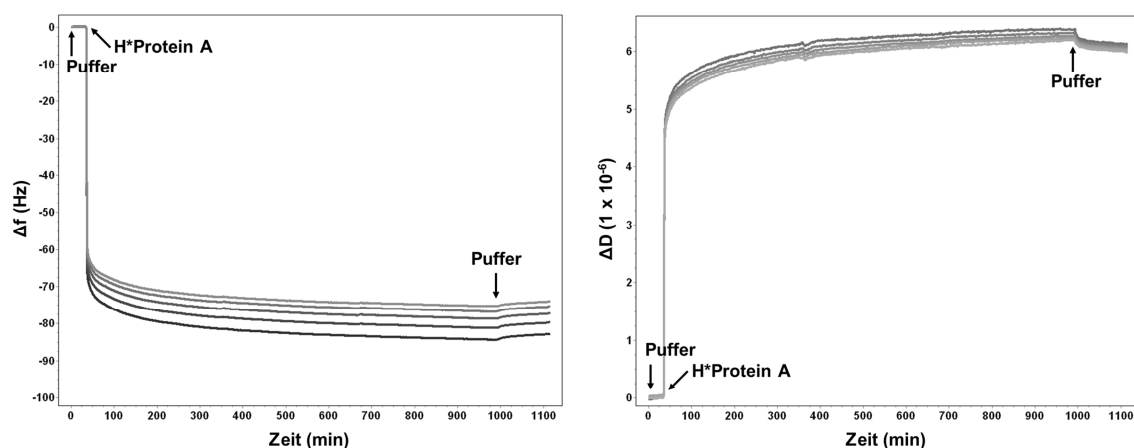


Abbildung 27. Repräsentative QCM-D Sensogramme der Anlagerung von H*Protein A an eine hydrophile SiO₂-Sensoroberfläche. Es sind die Änderung der Resonanzfrequenz (links) und der Dissipation (rechts) über die Zeit während der Proteinanlagerung mit einer Konzentration von 10 μ M und einer konstanten Flussrate von 50 μ L/min bei 20°C dargestellt. Es wurden die Daten der 3. bis 11. Obertöne verwendet.

Die Darstellung von ΔD als eine Funktion von Δf gibt Informationen über die Steifheit der angelagerten Proteinschicht. Die Schichten der rekombinanten Fusionshydrophobine zeigten ähnliche viskoelastische Eigenschaften (Abbildung 28). Der Adsorptionsprozess war linear und keine Zunahme oder Abnahme der Steifheit oder Konformationsänderungen wurden nach der initialen Proteinbindung beobachtet. Die Adsorption von H*Protein A und H*Protein B induzierte eine Dissipationsänderung von $\sim 1 \times 10^{-6}$ für eine Änderung in der Resonanzfrequenz von 10-12 Hz.

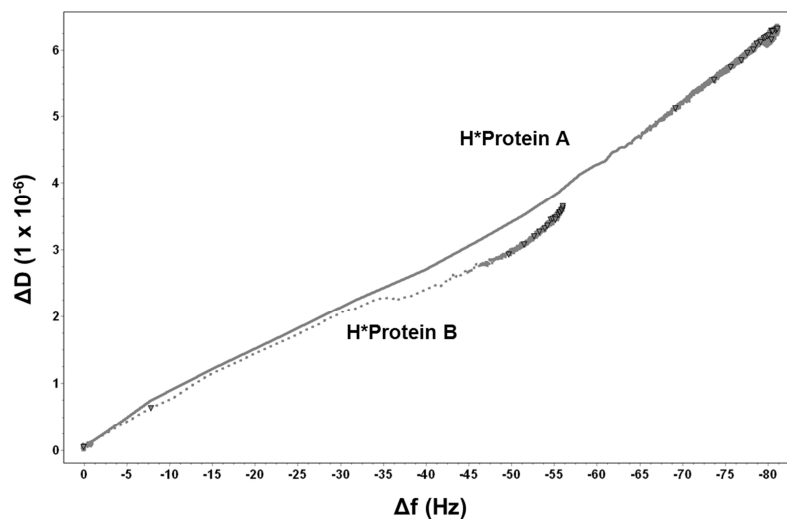


Abbildung 28. Repräsentativer Df-Plot der Anlagerung von H*Protein A (durchgezogene Linie) und H*Protein B (gepunktete Linie) an eine hydrophile SiO_2 -Sensoroberfläche. Es wurden die ΔD und Δf Daten des 7. Obertones während der Proteinanlagerung mit einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ und einer konstanten Flussrate von $50 \mu\text{L}/\text{min}$ bei 20°C verwendet.

Neben den qualitativen Adsorptionseigenschaften von H*Protein A und H*Protein B wurden auch die quantitativen Eigenschaften der angelagerten Hydrophobinschicht mit der QCM-D Technik untersucht. Da das Verhältnis zwischen den detektierten Veränderungen der QCM-D Signale (Frequenz und Dissipation) und den Eigenschaften der adsorbierten Proteinschicht jedoch nicht geradlinig ist, musste hier ein theoretisches Modell eingesetzt werden, um diese zu bestimmen. Um viskoelastische Proteinschichten, wie die Hydrophobinschicht, zu modellieren, kann das Voigt Modell verwendet werden. Dieses ermöglicht die Bestimmung der Schichtdicke und der adsorbierten Proteinmenge (Halthur *et al.* 2010) (Kapitel 4.2.5).

Wie aus vorherigen Untersuchungen bekannt ist, bilden die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B auf hydrophilen Oberflächen eine homogene Proteinschicht. Zur Bestimmung der Schichtdicke und der angelagerten Proteinmasse wurde daher die Adsorption von H*Protein A und H*Protein B auf einem SiO_2 -beschichteten hydrophilen Schwingquarz untersucht. Die Proteinanlagerung wurde

über einen Zeitraum von 16 Std. bei 20°C und einer Flussrate von 50 µL/min beobachtet.

Die Schichtdicke wurde nach dem Spülen der Oberfläche mit Pufferlösung, um lose adhären Proteine zu entfernen, mit Hilfe des viskoelastischen Modells nach Voigt bestimmt. H*Protein A bildete eine 17 ± 3 nm und H*Protein B eine 14 ± 2 nm dicke Proteinschicht auf der SiO₂-Oberfläche. Die maximale Schichtdicke war bereits nach einer Anlagerungszeit von weniger als einer Stunde erreicht und änderte sich auch bei einer weiteren Inkubation für 16 Std. nicht. Diese Daten bestätigten die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen und der Immunfluoreszenzuntersuchungen, dass für eine homogene Hydrophobinschicht und eine signifikante Veränderung der Oberflächenhydrophobizität schon kurze Inkubationszeiten ausreichen. Die erreichten Schichtdicken von 17 ± 3 nm bzw. 14 ± 2 nm entsprachen den Schichtdicken, die für eine hydrierte Monolage erwartet wurde.

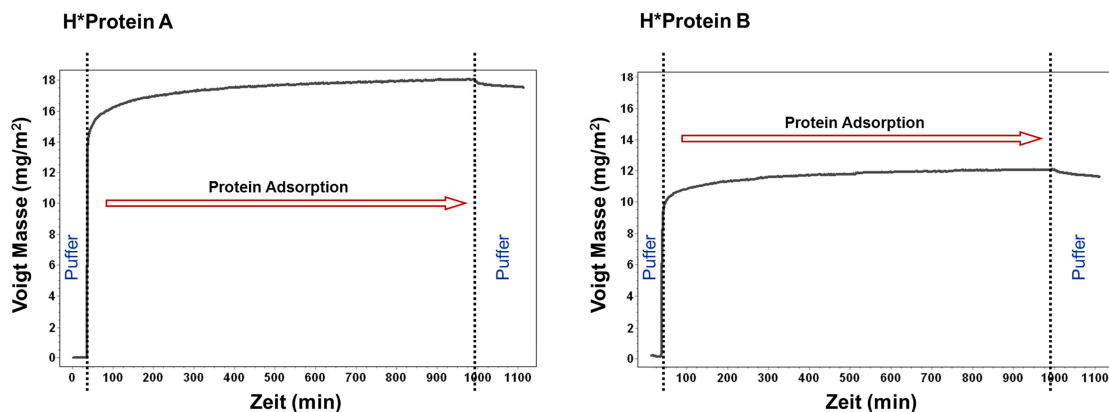


Abbildung 29. Darstellung der Anlagerung von Fusionshydrophobin H*Protein A (links) und H*Protein B (rechts) an eine hydrophile SiO₂-Sensoroberfläche. Die Messung wurde mit einer Proteinkonzentration von 10 µM und einer konstanten Flussrate von 50 µL/min bei 20°C durchgeführt. Die angelagerte Proteinmenge wurde mit Hilfe des viscoelastischen Modells nach Voigt bestimmt.

Die angelagerte Proteinmenge (berechnet nach Voigt) betrug, 17 ± 3 mg/m² für H*Protein A und 14 ± 2 mg/m² für H*Protein B (Abbildung 29).

2.3.8 Stabilität der Hydrophobinbeschichtung

Neben der Veränderung der Oberflächenhydrophobizität und der Beschichtungshomogenität spielt auch die Stabilität der Hydrophobinbeschichtung bei einer längeren Lagerung oder gegenüber dem Ablösen durch Pufferlösungen, Detergenzien und Säuren eine wichtige Rolle.

Um die Stabilität der H*Protein A und H*Protein B Beschichtungen bei einer längeren Lagerung zu untersuchen, wurden Glasoberflächen mit den rekombinanten Fusions-

hydrophobin beschichtet und anschließend staubgeschützt für 30 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Kontaktwinkel der beschichteten Oberflächen wurden nach der Beschichtung und nach 30 Tagen Lagerung gemessen (Abbildung 30).

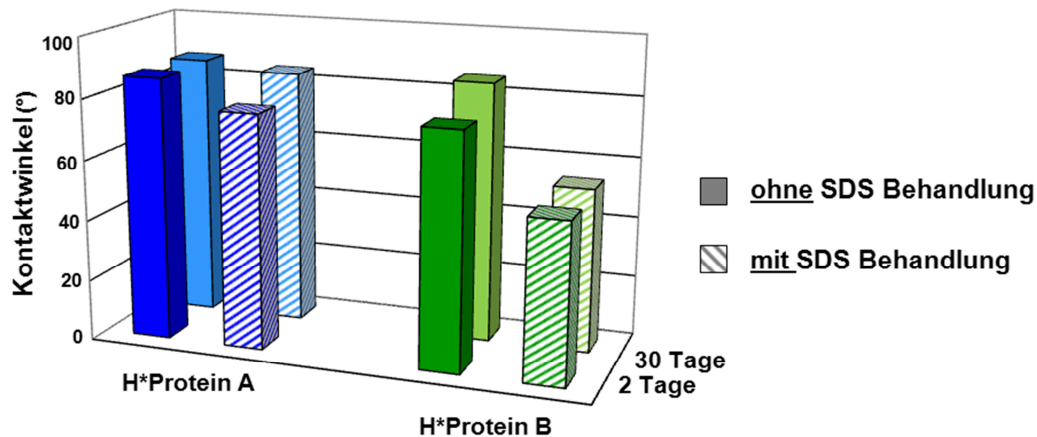


Abbildung 30. Stabilität der Hydrophobinbeschichtung bei Lagerung bei Raumtemperatur. Dargestellt sind die Kontaktwinkel von mit H*Protein A (links, blaue Balken) und H*Protein B (rechts, grüne Balken) beschichteten Glasoberflächen. Die ausgefüllten Balken zeigen die Kontaktwinkel ohne und die gestreiften Balken mit SDS Behandlung (α -helikale bzw. β -Faltblatt Konformation). Die Kontaktwinkel wurden nach der Beschichtung und nach 30-tägiger Lagerung bei Raumtemperatur gemessen.

Auch nach einer 30-tägigen Lagerung waren keine signifikanten Veränderungen der anfänglich bestimmten Oberflächenhydrophobizität erkennbar. Die Beschichtung war bei trockener Aufbewahrung bei Raumtemperatur für 1 Monat stabil.

Darüber hinaus wurde die Stabilität der Hydrophobinbeschichtung in verschiedenen Pufferlösungen, Detergenzien und Säuren getestet. Hierfür wurden Mikrotiterplatten nach Standardprotokoll mit H*Protein A und H*Protein B in α -helikaler und β -Faltblatt Konformation beschichtet und anschließend für 2 Std. bei Raumtemperatur in den zu untersuchenden Lösungen inkubiert. Die Hydrophobinbeschichtung wurde immunologisch mit einem primären Anti-His Antikörper und einem mit Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) funktionalisierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Detektion erfolgte durch die Zugabe des Substrats ECL Plus und der durch die HRP katalysierten enzymatische Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form über die hierbei emittierte Chemilumineszenz (Kapitel 4.4.1).

Die mit H*Protein A in α -helikaler und β -Faltblatt Konformation beschichteten Oberflächen zeigten eine sehr ähnliche Chemilumineszenz (Abbildung 31, „unbehandelt“). Nach der Inkubation der beschichteten Oberflächen mit den verschiedenen Pufferlösungen, Detergenzien und Säuren war keine signifikante Abnahme der Chemilumineszenz detektierbar. Die Oberflächenbeschichtungen mit H*Protein A waren sehr stabil und wurden durch die Behandlung nicht abgelöst.

H*Protein B beschichtete Oberflächen zeigten die gleiche Stabilität.

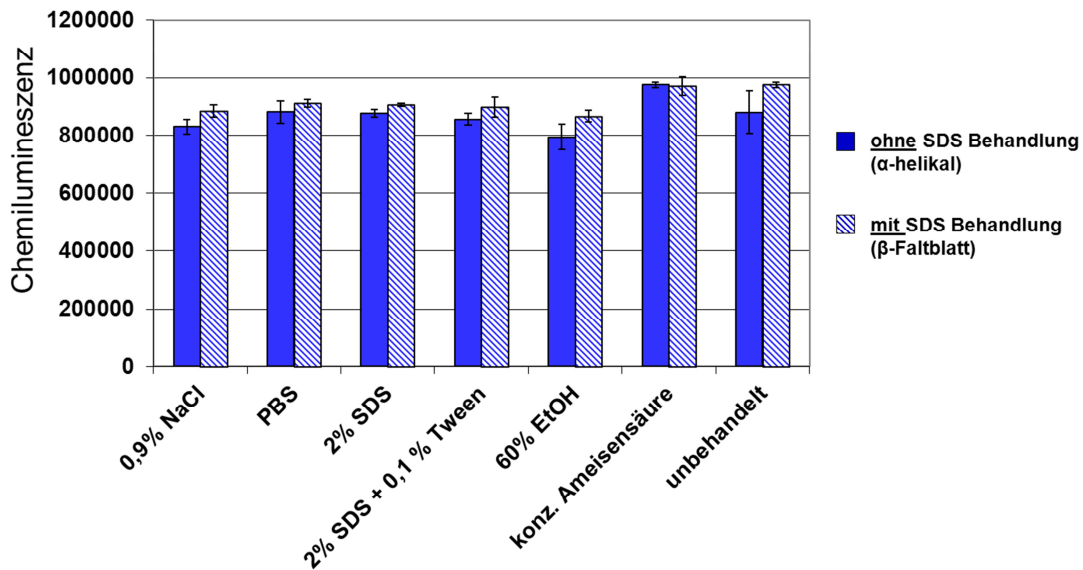


Abbildung 31. Immunologischer Nachweis der Stabilität der H*Protein A Beschichtung gegenüber der Behandlung mit verschiedenen Puffern, Detergenzien und Säuren für 2 Std. bei Raumtemperatur. Es wurden Hydrophobinbeschichtungen in α -helikaler (ausgefüllte Balken) und β -Faltblatt Konformation (gestreifte Balken) untersucht. Die Hydrophobinbeschichtung wurde mit einem primären Anti-His Antikörper und einem HRP-markierten Sekundärantikörper über die Detektion der Chemilumineszenz nachgewiesen.

2.3.9 Zusammenfassung der biomimetischen Oberflächenmodifikation mit den Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B

Online QCM-D Untersuchungen des Anlagerungsverhaltens von H*Protein A und H*Protein B zeigten, dass bei Oberflächenbeschichtungen mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen das verwendete Lösungsmittel eine entscheidende Rolle spielt. Dieses beeinflusst die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur und die Oligomerisierung der rekombinanten Fusionshydrophobine und somit auch die amphiphilen Eigenschaften und die Anlagerung an eine Oberfläche. In Beschichtungspuffer (50 mM Tris, 1 mM CaCl_2 , pH 8,0) lagerten sich die untersuchten Hydrophobine temperatur- und zeitabhängig an hydrophile und hydrophobe Referenzoberflächen an und veränderten die Oberflächenhydrophobizität. Kontaktwinkelmessungen und Untersuchungen der Beschichtungshomogenität auf der Mikro- und Nanoskala mit Immunfluoreszenzmikroskopie, REM und AFM zeigten, dass mit einer Inkubationszeit von 16 Std. und einer Beschichtungstemperatur von 80°C die größte Veränderung der Oberflächenhydrophobizität und gleichzeitig eine homogene, hochgeordnete Beschichtung in α -helikaler und β -Faltblatt Konformation erreicht werden konnte. Die von H*Protein A und H*Protein B ausgebildeten Proteinschichten hatten eine Dicke von 14-17 nm und wurden auch durch die Behandlung mit verschiedenen Puffer, Detergenzien und Säuren nicht abgelöst.

Diese Eigenschaften entsprechen denen von natürlichen Hydrophobinen; auch die DewA-His Beschichtung zeigte keine signifikanten Unterschiede im Verhalten. Der Fusionspartner der rekombinanten Hydrophobine beeinträchtigte nicht die Hydrophobin-typischen Eigenschaften auf hydrophilen Oberflächen. Auf hydrophoben Oberflächen konnte jedoch nur eine geringere Änderung der Oberflächenhydrophobizität und auch keine homogene globuläre Proteinschicht detektiert werden.

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B sind sehr gut für Oberflächenbeschichtungen vor allem auf hydrophilen Ausgangsmaterialien geeignet. Für die Beschichtung eines Quadratmeters wurden nur 14-17 mg der Fusionshydrophobine benötigt, so dass auch großflächige Beschichtungen möglich sind.

Wie in Kapitel 2.2 gezeigt werden konnte, wirkten die Fusionshydrophobine in Lösung bakterio­statisch. Diese Eigenschaft zusammen mit der Möglichkeit für großflächige Oberflächenbeschichtungen macht H*Protein A und H*Protein B zu vielversprechenden Kandidaten für Oberflächenmodifikationen zur Beeinflussung des bakteriellen Biofilmwachstums. Der Einfluss von Oberflächen beschichtet mit H*Protein A und H*Protein B auf die bakterielle Biofilmbildung wird im folgenden Kapitel beschrieben.

2.4 Einfluss der Hydrophobinbeschichtung auf die Biofilmbildung

Die Etablierung eines bakteriellen Biofilms auf einer Oberfläche verläuft in mehreren Schritten. Der erste Schritt beim Übergang vom planktonischen zum sessilen Wachstum, die primäre Adhäsion der Mikroorganismen, ist reversibel und wird hauptsächlich durch physikochemische Wechselwirkungen zwischen dem Bakterium und der Oberfläche bestimmt. Erst durch die anschließende Ausbildung einer extrazellulären Matrix, der beginnenden Teilung und dem Wachstum der Mikroorganismen kommt es zu einer irreversiblen Anheftung (Jenkinson und Lappin-Scott 2001). Der Biofilm beginnt zu reifen und eine dreidimensionale Struktur auszubilden. Bakterien können auf den unterschiedlichsten natürlichen und synthetischen Oberflächen Biofilme etablieren. Eine vielversprechende Möglichkeit zur Manipulation des Biofilmwachstums ist die Veränderung der physikochemischen Oberflächeneigenschaften der Materialien, um die primäre Adhäsion der Bakterien zu beeinflussen (Rosenhahn *et al.* 2008).

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B besitzen antibakterielle Eigenschaften. Sie sind zudem für großflächige Oberflächenbeschichtungen geeignet und verändern die Oberflächenhydrophobizität. Im Folgenden wurde der Einfluss von biomimetischen Oberflächenmodifikationen mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B auf die primäre bakterielle Adhäsion und ausgereifte Biofilme untersucht.

2.4.1 Primäre bakterielle Adhäsion und frühe Stadien der Biofilmbildung

Ein charakteristisches Merkmal aller Biofilme ist ihre regulierte Entwicklung in mehreren chronologischen Schritten, wobei die primäre Adhäsion von einzelnen Bakterienzellen, die sogenannte Linking Film Bildung, ein entscheidender Schritt ist (Jenkinson und Lappin-Scott 2001). Hier spielen physikochemische Interaktionen zwischen dem Bakterium und der Oberfläche eine entscheidende Rolle.

Es wurde der Einfluss der Hydrophobinbeschichtung auf die primäre bakterielle Adhäsion und die frühe Biofilmentwicklung im statischen und im Durchfluss-System analysiert.

Charakterisierung der primären Adhäsion und Biofilmbildung im statischen System

Zeitlicher Verlauf der primären Adhäsion

Zur Quantifizierung der primären Adhäsion ausgewählter Referenzkeime wurden 96-well Mikrotiterplatten beschichtet mit H*Protein A und H*Protein B für 1 Std. bei Raumtemperatur bzw. 80°C verwendet. Als Referenzkulturen wurden die Gram-negativen stäbchenförmigen Bakterien *E. coli* BW3110 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 eingesetzt. Die Biofilme wurden in BHI in den Mikrotiterplatten bei 37°C angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0,5 und 6,5 Std. wurde die planktonische Bakterien suspension vollständig entfernt und die adhärenierten Bakterien in der jeweiligen Kavität mit Kristallviolett angefärbt. Nach einer Entfärbung mit Essigsäure wurde die optische Dichte der Suspension bei 590 nm gemessen. Sie ist ein Maß für die Anzahl der in der Kavität adhärenierten Bakterien.

Die makroskopische Analyse der Mikrotiterplatten (Abbildung 32) verdeutlichte zum einen die Unterschiede in der primären Adhäsion von *E. coli* und *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* ist ein sehr viel stärkerer Biofilmbildner und zeigte auf allen Oberflächen bereits nach 0,5 Std. eine deutliche Adhäsion. Zum anderen waren Unterschiede in der Adhäsion auf den unterschiedlichen Oberflächen erkennbar. Auf den Hydrophobin-beschichteten Oberflächen war nach einer kurzen Inkubationszeit (0,5 Std.) eine stärkere Bakterienadhäsion als auf den unbeschichteten Oberflächen erkennbar. Bei einer längeren Inkubationszeit (6,5 Std.) war die Besiedlung auf den verschiedenen Oberflächen makroskopisch ähnlich.

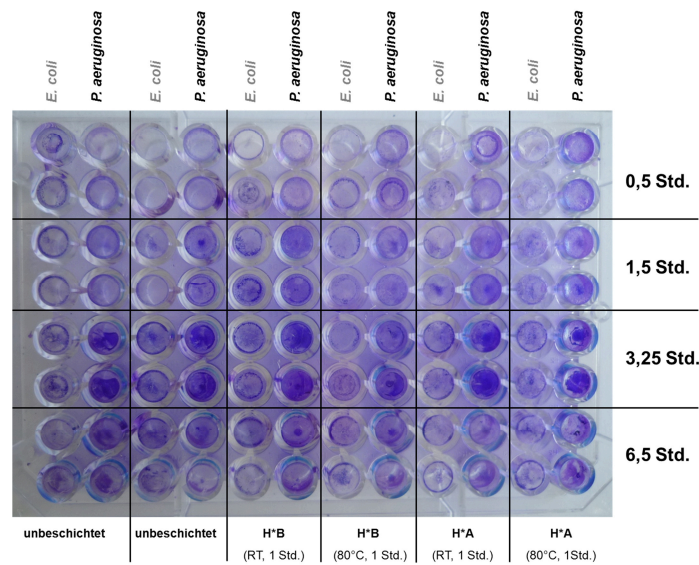


Abbildung 32. Unterschiede in der primären Adhäsion von *E. coli* BW3110 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 in unmodifizierten und Hydrophobin-modifizierten Kavitäten einer Mikrotiterplatte. Die Bakterien wurden in BHI Medium angezogen und die Adhäsion nach 0,5, 1,5, 3,25 und 6,5 Std. untersucht. Die adhärenierten Bakterien wurden mit Kristallviolett angefärbt. Unterschiedlich stark gefärbte Kavitäten zeigen Unterschiede in der primären Adhäsion.

Die quantitative Auswertung anhand der gemessenen OD-Werte bestätigte die makroskopischen Beobachtungen. Sowohl bei *P. aeruginosa* (Abbildung 33) als auch bei *E. coli* konnte eine deutlich vermehrte Adhäsion auf Hydrophobin-beschichteten Oberflächen im Vergleich zu den unbeschichteten Oberflächen der Mikrotiterplatte detektiert werden. Die Unterschiede in der Adhäsion waren bei *E. coli* und *P. aeruginosa* nach 0,5 Std. deutlich ausgeprägt und nahmen mit steigender Inkubationszeit ab.

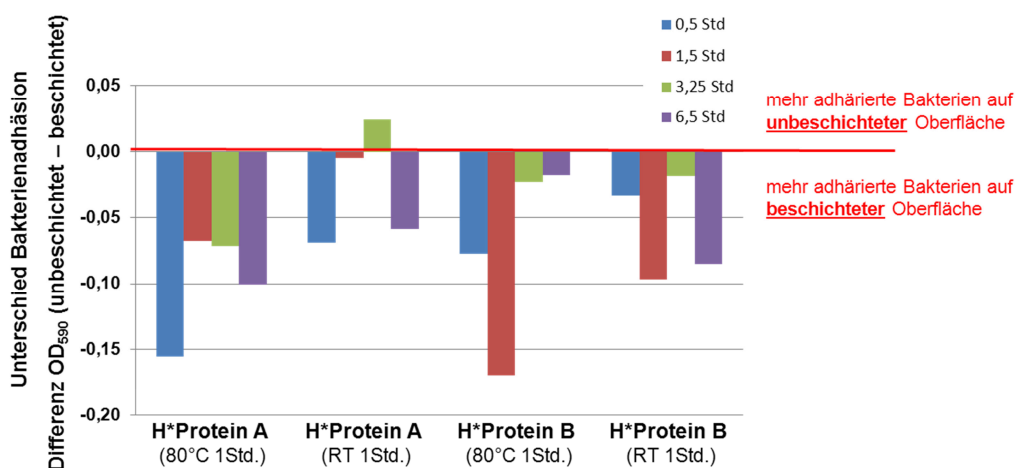


Abbildung 33. Unterschiede in der primären Adhäsion von *P. aeruginosa* ATCC 27853 in BHI Medium in unmodifizierten und Hydrophobin-modifizierten Kavitäten einer Mikrotiterplatte nach 0,5, 1,5, 3,25 und 6,5 Std. Die adhärenierten Bakterien wurden mit Kristallviolett gefärbt und anschließend die OD_{590} der zur Entfärbung verwendeten Essigsäurelösung gemessen. Dargestellt sind die Differenzen in der OD_{590} zwischen der Bakterienanlagerung auf den Hydrophobin-beschichteten und unbeschichteten Oberflächen.

Einfluss des Wachstumsmediums auf die Adhäsion verschiedener Referenzbakterien

Neben dem zeitlichen Verlauf der primären Adhäsion, wurde auch der Einfluss des eingesetzten Wachstumsmediums auf die Adhäsion und frühe Biofilmbildung verschiedener Referenzbakterien auf unmodifizierten im Vergleich zu Hydrophobin-modifizierten Oberflächen untersucht. Hierzu wurden Gram-negative (*E. coli* K12, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* Pa49R) und Gram-positive Referenzbakterien (*S. aureus*, *E. faecalis*) und die Wachstumsmedien BHI, MH und BM2 eingesetzt. Zusätzlich zu den Referenzkulturen wurde als gemischte Bakterienpopulation natürlicher Kläranlagenzu- lauf verwendet. Die mit H*Protein B für 16 Std. bei 80°C in α -helikaler und β -Faltblatt Konformation beschichteten Mikrotiterplatten wurden mit den unterschiedlichen Bakteriensuspensionen für 21 Std. bei 37°C inkubiert. Der Nachweis der jungen Biofilme erfolgte über die Anfärbung mit Kristallviolett zur Bestimmung der Gesamtbio- masse und mit Resazurin zur Detektion der atmungsaktiven Bakterien.

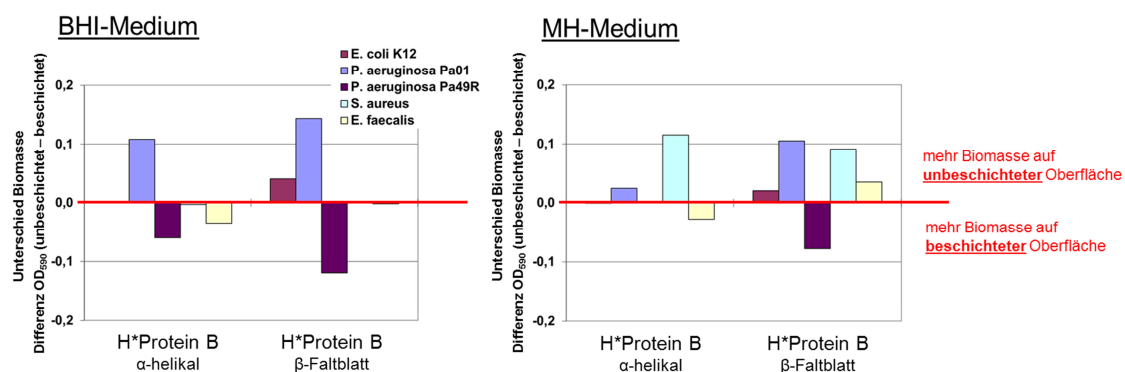


Abbildung 34. Unterschiede in der Biofilmbildung verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien in unmodifizierten und Hydrophobin-modifizierten Kavitäten einer Mikrotiterplatte nach 21 Std.. Als Wachstumsmedium wurden BHI Medium (links) und MH Medium (rechts) verwendet. Die adhärirten Bakterien wurden mit Kristallviolett gefärbt und anschließend die OD₅₉₀ der zur Entfärbung verwendeten Essigsäurelösung gemessen. Dargestellt sind die Differenzen in der OD₅₉₀ zwischen der angelagerten Biomasse auf den unbeschichteten und Hydrophobin-beschichteten Oberflächen.

Die Bestimmung der bakteriellen Biomasse auf den mit H*Protein B beschichteten Oberflächen und den unbeschichteten Referenzoberflächen ergab ein sehr diverses Bild der Biofilmbildung. Abhängig von den verwendeten Nährmedien zeigten die Bakterien ein stärkeres oder schwächeres Biofilmwachstum. *P. aeruginosa* PA01 bildete den meisten Biofilm in MH Medium, wohingegen ein stärkeres Biofilmwachstum von *P. aeruginosa* Pa49R in BM2 Medium detektierbar war. Auch das Verhalten der Bakterien gegenüber der Hydrophobinbeschichtung war sehr divers. So bildete *P. aeruginosa* Pa49R deutlich mehr Biofilm auf den Hydrophobin-beschichteten Oberflächen, wohingegen *P. aeruginosa* PA01 die Adhäsion auf den unbeschichteten Oberflächen bevorzugte (Abbildung 34). *S. aureus*, als Vertreter der Gram-positiven Bakterien, adhärirte ebenfalls verstärkt auf den unbeschichteten Oberflächen und

E. coli und *E. faecalis* zeigten in den verschiedenen Wachstumsmedien ein unterschiedliches Verhalten. Die gemischte Abwasserpopulation adhärierte verstärkt auf den Hydrophobin-beschichteten Oberfläche (Abbildung 35).

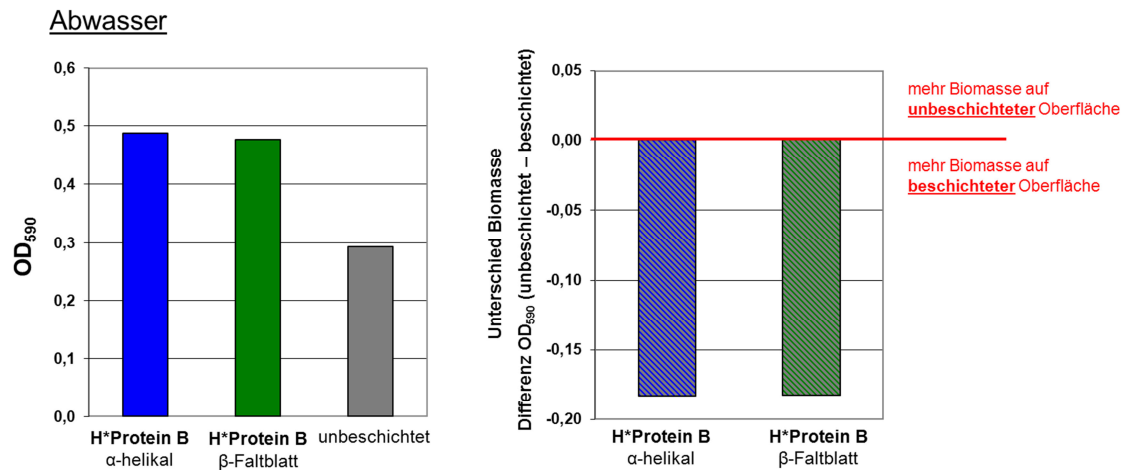


Abbildung 35. Unterschiede in der Adhäsion einer natürlichen gemischten Abwasserpopulation in unmodifizierten und Hydrophobin-modifizierten Kavitäten einer Mikrotiterplatte nach 21 Std.. Die adhärerten Bakterien wurden mit Kristallviolett gefärbt und anschließend die OD₅₉₀ der zur Entfärbung verwendete Essigsäurelösung gemessen (linke Seite). Auf der rechten Seite sind die Differenzen in der OD₅₉₀ zwischen der angelagerten Biomasse auf den unbeschichteten und Hydrophobin-beschichteten Oberflächen dargestellt.

Neben der bakteriellen Biomasse auf den H*Protein B beschichteten Oberflächen und den unbeschichteten Referenzoberflächen, wurde auch die Atmungsaktivität der Bakterien auf diesen Oberflächen untersucht (Abbildung 36) (Kapitel 4.5.6).

Die Bestimmungen der Biomasse und der Atmungsaktivität lieferten sehr unterschiedliche Ergebnisse. So war teilweise die bakterielle Atmungsaktivität in den Kavitäten am höchsten, in denen auch die meiste Biomasse detektiert worden war. Teilweise zeigte sich aber auch ein genau gegenteiliges Bild, und die Kavitäten mit der geringsten Biomasse wiesen die höchste Atmungsaktivität auf. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass schnell proliferierende Zellen pro Zeiteinheit mehr Nährstoffe verbrauchen und mehr toxische Stoffwechselprodukte anhäufen. Die Bedingungen hinsichtlich des Nährstoffangebots und der Ausdehnungsmöglichkeiten in der Kavität einer 96-well Mikrotiterplatte sind somit mit zunehmender Zellzahl ein limitierender Faktor. Ist dieses Limit erreicht, verlangsamen die Zellen ihre Wachstumsgeschwindigkeit bis hin zum Wachstumsstillstand. In dieser sogenannten Verzögerungsphase sinken auch die wachstumsbedingten Stoffwechselprozesse. Da anhand von Resazurin die Stoffwechselaktivität der Zellen durch die Reduktion von Resazurin zu Resorufin gemessen wird, ist die Menge an Resorufin in Kavitäten mit hoher Zellzahl häufig geringer als in Kavitäten mit niedriger Zellzahl.

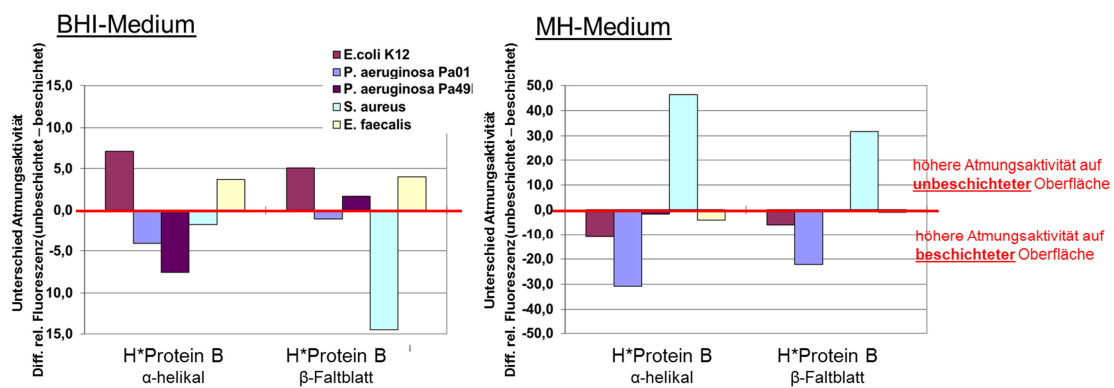


Abbildung 36. Unterschiede in der Atmungsaktivität verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien in unmodifizierten und Hydrophobin-modifizierten Kavitäten einer Mikrotiterplatte nach 21 Std.. Als Wachstumsmedium wurden BHI Medium (links) und MH Medium (rechts) verwendet. Die adhärenierten Bakterien wurden mit Resazurin behandelt und nach 2 Std. die bakterielle Reduktion von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin gemessen. Dargestellt sind die Differenzen in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen unbeschichteten und Hydrophobin-beschichteten Oberflächen.

Die Untersuchungen in der Mikrotiterplatte als statischem System zeigten eine Veränderung in der Adhäsion der untersuchten Gram-positiven und Gram-negativen Referenzbakterien durch die Hydrophobinbeschichtung. Es war jedoch keine eindeutige Tendenz in Bezug auf die Adhäsion und die Atmungsaktivität auf den unterschiedlichen Oberflächen erkennbar. Abhängig vom verwendeten Wachstumsmedium und dem verwendeten Bakterium wurde eine stärkere Adhäsion und Atmungsaktivität auf den Hydrophobin-modifizierten oder den unbehandelten Oberflächen detektiert.

Analyse der primären Biofilmbildung im Biofilm-Röhrenreaktor (Durchflusssystem)

Zur weiteren Untersuchung der primären Stadien der Biofilmbildung auf unmodifizierten und Hydrophobin-modifizierten Glasoberflächen in einem Durchflusssystem wurde als Referenzstamm ein GFP-markierter *E. coli* Stamm (BW3110, pJOE 4056.2 His e-GFP) verwendet (Wilms *et al.* 1999; Wegerer *et al.* 2008). Nach Induktion des Promotors durch 0,2% Rhamnose wird hier das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP) stabil intrazellulär exprimiert und erlaubt so eine spezifische Detektion der Bakterien mit dem Epifluoreszenzmikroskop ohne zusätzliche Markierungsschritte.

Der verwendete *E. coli* Stamm wurde in einem Durchflusssystem in BHI Medium mit 0,2% L(+) Rhamnose angezogen. Die Adhäsion der Bakterien auf mit H*Protein A und H*Protein B beschichteten und unmodifizierten Glasoberflächen wurde nach 5, 17 und 26 Std. analysiert. Vor der mikroskopischen Kontrolle der adhärenierten Bakterien wurden die Oberflächen in Zellwaschpuffer gewaschen, um lose angelagerte Bakterien zu entfernen. Die Biofilme wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop untersucht und die Adhäsion der Bakterien anhand der Oberflächenbedeckung quantifiziert. Hierfür wurde

die Software Bioflux 200 (Kapitel 4.7.2) verwendet. Zusätzlich wurde die Anzahl der kultivierbaren Bakterien pro cm² über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten ermittelt.

Tabelle 2. Oberflächenbedeckung der *E. coli* Biofilme auf unbehandelten und mit Fusionshydrophobin H*Protein B modifizierten Glasoberflächen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten im Biofilm-Röhrenreaktor.

Inkubation (Std.)	Oberfläche	Oberflächenbedeckung (%)
5	Kontrolle (Glasoberfläche)	n.b.
	H*Protein B, ohne SDS Behandlung (α -helikal)	0,06
	H*Protein B, mit SDS Behandlung (β -Faltblatt)	0,07
17	Kontrolle (Glasoberfläche)	0,15
	H*Protein B, ohne SDS Behandlung (α -helikal)	0,39
	H*Protein B, mit SDS Behandlung (β -Faltblatt)	0,41
26	Kontrolle (Glasoberfläche)	0,26
	H*Protein B, ohne SDS Behandlung (α -helikal)	0,33
	H*Protein B, mit SDS Behandlung (β -Faltblatt)	0,51

Nur wenige *E. coli* Zellen hatten sich nach 5-stündiger Inkubation auf den Oberflächen angelagert. Die Zellen waren sehr inhomogen verteilt und in vielen Bereichen waren keine Bakterien detektierbar. Nach 17 Std. war die unbeschichtete Glasoberfläche zu 0,15% mit Bakterien bedeckt (Tabelle 2) was $3,3 \times 10^3$ Zellen pro cm² entspricht. Die Oberflächenbedeckung auf den H*Protein B modifizierten Oberflächen war mit 0,39% für Oberflächen vor SDS Behandlung (α -helikale Konformation) und 0,41% für Oberflächen nach SDS Behandlung (β -Faltblatt Konformation) deutlich höher ($14,5 - 15,4 \times 10^3$ Zellen pro cm²). Die Oberflächenbedeckung nahm mit steigender Inkubationszeit deutlich zu und nach 26 Std. waren 0,26% der reinen Glasoberfläche und 0,33% bzw. 0,51% der Hydrophobin-beschichteten Oberfläche mit Bakterien bedeckt. Auf den Hydrophobin-modifizierten Oberflächen konnte im Vergleich zu unbeschichteten Glasoberflächen eine verstärkte Bakterienadhäsion detektiert werden. Die Bakterien adhärten vorzugsweise auf mit H*Protein B in β -Faltblatt Endform beschichteten Oberflächen (Abbildung 37).

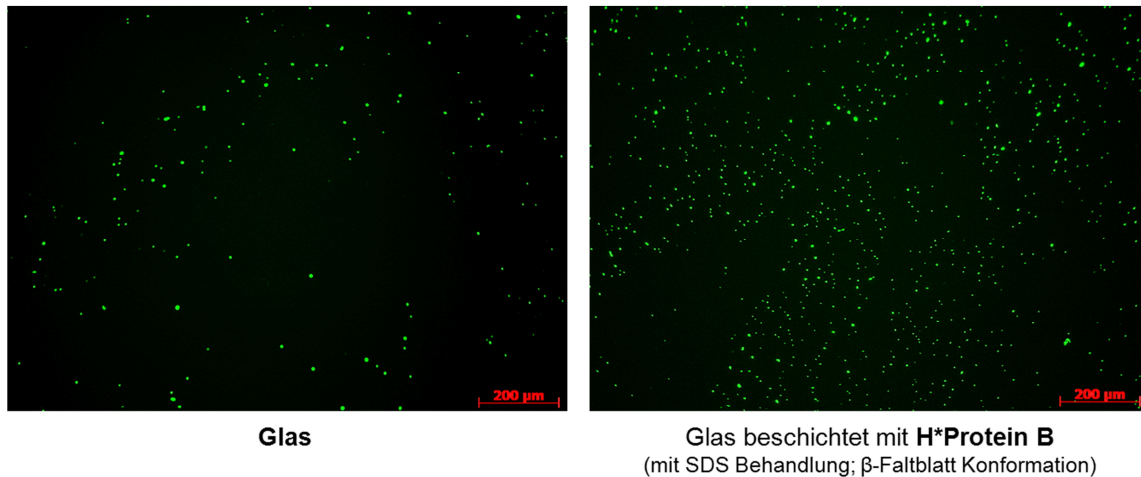


Abbildung 37. Mikroskopische Aufnahmen der adhärenenten GFP-markierten *E. coli* Zellen auf unbeschichteten (links) und mit H*Protein B (rechts) beschichteten Glasoberflächen. Die Oberflächen wurden für 26 Std. im Röhrenreaktor im Durchfluss in Bakteriensuspension inkubiert.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass sowohl im statischen System als auch im Durchfluss-System eine verstärkte primäre Bakterienadhäsion und Biofilmbildung von *E. coli* BW3110 auf Hydrophobin-modifizierten Oberflächen stattfindet.

2.4.2 Ausgereifte Biofilme

Biomimetische Oberflächenmodifikationen mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B hatten einen Einfluss auf die primäre bakterielle Adhäsion und frühe Stadien der Biofilmbildung. Abhängig von der Bakterienart und dem Wachstumsmedium war eine verstärkte oder verminderte Adhäsion auf Hydrophobin-beschichteten Oberflächen detektierbar (Abbildung 34). Eine natürliche gemischte Abwasserpopulation adhärierte verstärkt auf den Hydrophobin-beschichteten Oberflächen (Abbildung 35). Um zu untersuchen, ob sich diese Effekte auf die weitere Entwicklung des Biofilms auswirken, wurden neben der primären Adhäsion und frühen Stadien der Biofilmentwicklung auch ausgereifte Biofilme untersucht.

Da in Biofilmen die Interaktionen zwischen den Mikroorganismen eine entscheidende Rolle spielen, wurde hier eine natürliche Bakterienpopulation den Referenzkulturen vorgezogen. Es wurde der Ablauf einer kommunalen Kläranlage mit einer aus vorherigen Untersuchungen bekannten hohen Bakteriendichte und Diversität als Start suspension für das Biofilmwachstum verwendet. Die hier natürlich vorkommenden Bakterien sind bereits gut an die gegebenen Milieubedingungen adaptiert. Das Biofilmwachstum erfolgte auf unbehandelten und Hydrophobin-modifizierten Glasoberflächen in einem Biofilm-Röhrenreaktor. Um natürliche, aber auch reproduzierbare und konstante Milieubedingungen für das Biofilmwachstum zu simulieren, wurde als Wachstumsmedium synthetisches Abwasser, zusammengesetzt nach DIN EN ISO 11733 (Kapitel

4.5.2), eingesetzt Die Biofilme wurden nach einer 4-wöchigen Inkubation in Bezug auf ihre räumliche Verteilung und Struktur, sowie die Anzahl der kultivierbaren Bakterien und die Populationszusammensetzung charakterisiert.

Räumliche Verteilung und Struktur der Biofilme

Nach der Inkubation wurden die Bakterien direkt auf den Oberflächen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Syto9 gefärbt und die räumliche Verteilung und die Struktur des Biofilms mit Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Biofilmstruktur und räumlichen Verteilung auf den unbehandelten und mit H*Protein A und H*Protein B modifizierten Glasoberflächen festgestellt werden. Alle Oberflächen waren mit einem mehrschichtigen dreidimensionalen Biofilm bedeckt (Abbildung 38).

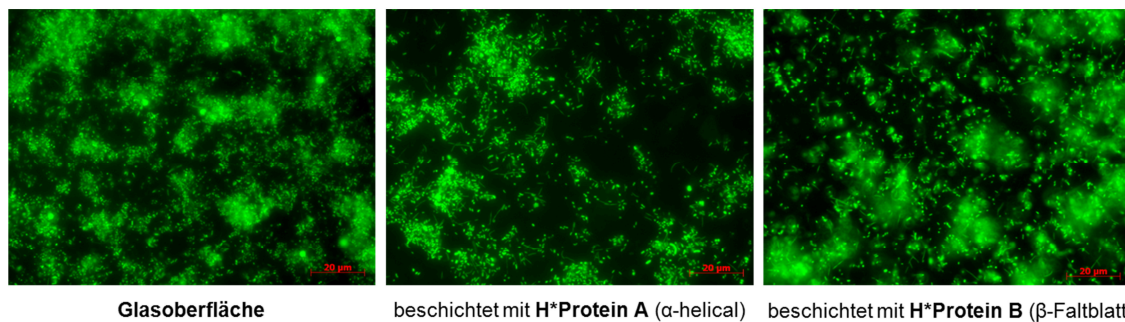


Abbildung 38. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines ausgereiften Biofilms auf unbehandelten und mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B modifizierten Glasoberflächen. Für die Biofilmkultivierung in einem Durchflussreaktor wurde natürliches Abwasser als Inokulum und synthetisches Abwasser als Nährstoffquelle verwendet. Die Biofilme wurden nach 4-wöchiger Inkubation direkt auf den Oberflächen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Syto9 gefärbt und mit Epifluoreszenzmikroskopie analysiert.

Anzahl der kultivierbaren Bakterien auf den unterschiedlichen Oberflächen

Neben der Biofilmstruktur wurde auch die Anzahl der kultivierbaren Bakterien auf den unterschiedlichen Oberflächen bestimmt.

Die koloniebildenden Einheiten wurden im Plattengussverfahren auf Nährmedium (R2A-Agar) für heterotrophe Bakterien bestimmt (Reasoner und Geldreich 1985). Auf unbeschichteten Glasoberflächen wurden 6×10^4 kultivierbare Bakterien pro cm^2 nachgewiesen (Tabelle 3). Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien lag auf den Hydrophobin-modifizierten Oberflächen in derselben Größenordnung und reichte von 1×10^4 Zellen pro cm^2 auf Oberflächen modifiziert mit H*Protein B vor SDS Behandlung (α -helikal) bis zu 6×10^4 Zellen pro cm^2 auf Oberflächen modifiziert mit H*Protein A (α -helikal).

Parallel zu den adhärenen Bakterien wurde auch die Anzahl der Bakterien in der planktonischen Phase kontrolliert. Der Biofilmreaktor wurde mit einer Konzentration von

9×10^2 Bakterien /mL gestartet. Nach vier Wochen waren 3×10^5 kultivierbare Bakterien in der planktonischen Phase detektierbar.

Tabelle 3. Anzahl der kultivierbaren Bakterien (KBE) pro cm^2 auf unbehandelten und Hydrophobin-modifizierten Glasoberflächen nach 4-wöchiger Inkubation in einem Biofilm-Röhrenreaktor. Für die Biofilmkultivierung wurde natürliches Abwasser als Inokulum und synthetisches Abwasser als Nährstoffquelle verwendet.

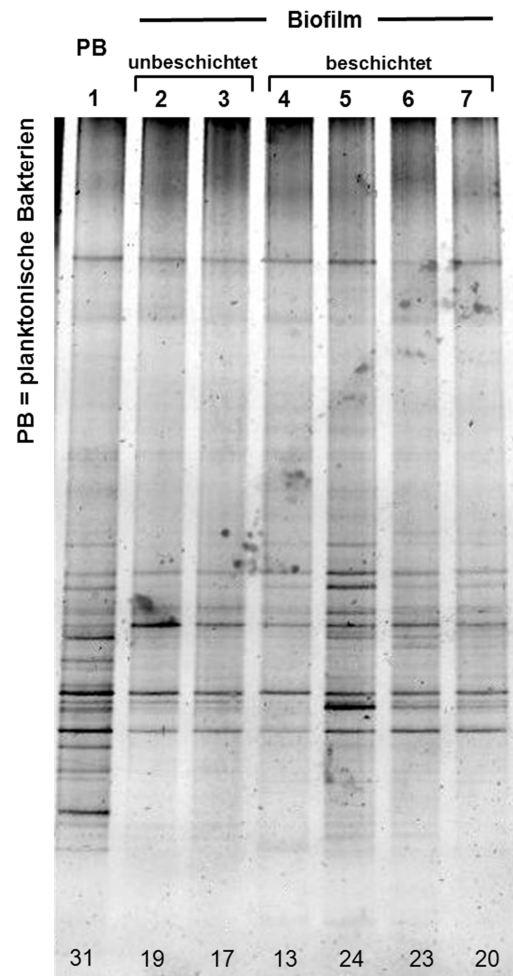
Oberflächenmodifikation	KBE / cm^2
Kontrolle (Glasoberfläche)	5.6×10^4
H*Protein A, ohne SDS Behandlung (α -helikal)	6.4×10^4
H*Protein A, mit SDS Behandlung (β -Faltblatt)	2.8×10^4
H*Protein B, ohne SDS Behandlung (α -helikal)	1.3×10^4
H*Protein B, mit SDS Behandlung (β -Faltblatt)	2.8×10^4

Populationszusammensetzung der planktonischen Phase und der Biofilme

In Bezug auf die räumlichen Verteilung und der Anzahl der kultivierbaren Bakterien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Biofilmen auf unbehandelten und Hydrophobin-modifizierten Oberflächen festgestellt werden. Darüber hinaus wurden die Biofilme qualitativ mit einer molekularbiologischen Fingerabdruck-Methode untersucht (Muyzer *et al.* 1993; Emtiazi *et al.* 2003). Die mit einer Polymerase-Ketten-Reaktion gekoppelte Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (PCR-DGGE) ermöglicht es, einen rDNA basierten Fingerabdruck von Bakterienpopulationen zu erzeugen, wobei jede Bande des erhaltenen Musters einer Bakterienspezies entspricht. Die Anzahl der Banden zeigt somit die Biodiversität eines Biofilms (Muyzer *et al.* 1993; Rieder *et al.* 2008). Die PCR-DGGE wurde eingesetzt, um Unterschiede in der Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaften auf den unbehandelten und Hydrophobin-modifizierten Glasoberflächen zu detektieren. Zusätzlich wurde neben den Biofilmpopulationen auch die planktonische Phase analysiert. Für die initiale PCR-Reaktion wurde das Primerpaar 27F und 517R, das auf der eubakteriellen 16S rDNA bindet, verwendet. Die 526 bp PCR Produkte wurden mit DGGE aufgetrennt.

Zuerst wurde das DGGE Muster der planktonischen Phase analysiert (Abbildung 39). 31 DNA Banden, die jeweils einer eubakterielle Spezies entsprechen, waren vorhanden und bestätigten die hohe bakterielle Diversität des verwendeten natürlichen Abwassers. Die verschiedenen Biofilmgemeinschaften waren nicht so divers wie die planktonische Phase. 13 bis 24 DNA Banden wurden in den Biofilmproben der unbehandelten und Hydrophobin-modifizierten Oberflächen detektiert. Nicht alle DNA Banden, die im DGGE Bandenmuster der planktonischen Phase vorhanden waren, waren auch in den Biofilmgemeinschaften zu finden, d.h. nicht alle Bakterien waren an der Biofilmbildung beteiligt.

Abbildung 39. PCR-DGGE Analyse der Biofilmproben von unbehandelten und Hydrophobin-modifizierten Glasoberflächen nach 4-wöchiger Inkubation im Biofilm-Röhrenreaktor. Die PCR Fragmente der planktonischen Bakterien sind in Spur 1 aufgetragen. Spur 2 und 3 = Biofilme von unbehandelten Glasoberflächen; Spur 4 und 5 = Biofilme von Glasoberflächen modifiziert mit H*Protein A ohne und mit SDS Behandlung; Spur 6 und 7 = Biofilme von Glasoberflächen modifiziert mit H*Protein B ohne und mit SDS Behandlung. Die Anzahl der vorhandenen DNA-Banden ist am Ende jeder Spur aufgeführt.



Der Dice Koeffizient (Kapitel 4.8.1) für den paarweisen Vergleich von bakteriellen Gemeinschaften gibt die prozentuale Ähnlichkeit an (Tabelle 4). Die Ähnlichkeit der planktonischen Phase und der verschiedenen Biofilmproben lag zwischen 59% und 76% und bestätigte die selektive Besiedlung. Die prozentuale Ähnlichkeit stieg beim Vergleich der Biofilmpopulationen der unbehandelten und Hydrophobin-beschichteten Glasoberflächen an. Eine Ähnlichkeit zwischen 75% und 85% konnte bestimmt werden, was bestätigte, dass die Hydrophobin-Modifikation keinen Einfluss auf die Biofilmentwicklung und damit ausgereifte Biofilme hatte.

Tabelle 4. Vergleich der PCR-DGGE Bandenmuster der verschiedenen bakteriellen Populationen mit dem Dice Koeffizienten. 1 = planktonische Bakterien; 2 und 3 = Biofilme von unbehandelten Glasoberflächen; 4 = Biofilm von Glasoberflächen modifiziert mit H*Protein A ohne SDS Behandlung; 5 = Biofilm von Glasoberflächen modifiziert mit H*Protein A mit SDS Behandlung; 6 = Biofilm von Glasoberflächen modifiziert mit H*Protein B ohne SDS Behandlung. 7 = Biofilm von Glasoberflächen modifiziert mit H*Protein B mit SDS Behandlung.

Probe	1	2	3	4	5	6	7
1	1.00						
2	0.76	1.00					
3	0.71	0.94	1.00				
4	0.59	0.75	0.80	1.00			
5	0.76	0.79	0.78	0.65	1.00		
6	0.74	0.81	0.85	0.67	0.89	1.00	
7	0.67	0.81	0.76	0.73	0.86	0.93	1.00

2.4.3 Zusammenfassung des Einflusses der Oberflächenmodifikation mit H*Protein A und H*Protein B auf die bakterielle Biofilmbildung

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B wirkten in Lösung antibakteriell gegen verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterien und auch die eukaryotische Hefe *P. pastoris*. Sie sind zudem sehr gut für großflächige Oberflächenbeschichtungen geeignet und veränderten die Oberflächenhydrophobizität. Biomimetische Oberflächenmodifikationen mit H*Protein A und H*Protein B hatten einen Einfluss auf die primäre bakterielle Adhäsion. Abhängig von der Bakterienart und dem Wachstumsmedium führten sie zu einer verstärkten oder verminderten primären Adhäsion und frühen Biofilmbildung. Gemischte Abwasserpopulationen adhärten verstärkt auf Hydrophobin-beschichteten Oberflächen; dieser Effekt wirkte sich jedoch nicht auf die weitere Entwicklung des Biofilms aus. In ausgereiften Abwasserbiofilmen konnten keine Unterschiede in der Biofilmstruktur, der Anzahl der kultivierbaren Bakterien oder der Populationszusammensetzung detektiert werden.

Um die positiven Eigenschaften der Hydrophobinbeschichtung auszunutzen und eine gezielte Manipulation der Biofilmbildung zu erreichen, wurde eine Funktionalisierung der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen durchgeführt (Kapitel 2.5).

2.5 Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B können durch das von der BASF-SE etablierte rekombinante Herstellungsverfahren industriell im Kilogramm Maßstab produziert werden. Sie sind sehr gut für großflächige Oberflächen-

beschichtungen verschiedener Materialien geeignet. Für die biomimetische Oberflächenmodifikation wurden nur 14-17 mg pro Quadratmeter benötigt. Die Fusionshydrophobine assemblierten auf unterschiedlichen (vorzugsweise hydrophilen) Oberflächen in stabile Proteinschichten, die sich auch durch die Behandlung mit Detergenzien oder konzentrierten Säuren nicht ablösen ließen. Die in Suspension vorhandene antibakterielle Wirkung und die Veränderung der Oberflächeneigenschaften, wie der Oberflächenhydrophobizität, durch die Oberflächenmodifikation führte dennoch zu keiner signifikanten Beeinflussung der bakteriellen Biofilmbildung.

Die positiven Eigenschaften der rekombinanten Fusionshydrophobine können jedoch ausgenutzt werden und die Proteinschichten als universelle Grundlage für spezifische Funktionalisierungen verwendet werden. Die Funktionalisierung einer Oberfläche wird somit durch die Hydrophobinbeschichtung unabhängig von den Eigenschaften der jeweiligen Oberfläche.

Proteine, wie die Fusionshydrophobine, bieten verschiedene Möglichkeiten zur Modifikation mit z.B. antimikrobiellen Substanzen, um eine gezielte Beeinflussung des Biofilmwachstums zu erreichen. Hierbei ist eine rekombinante Modifikation oder die chemische Modifikation der beschichteten Oberflächen über verschiedene funktionelle Gruppen der Hydrophobine möglich. Im Folgenden wurde die Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung über eine Streptavidin-Brücke als mögliches Konzept untersucht.

2.5.1 Strategie: Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung über eine Streptavidin-Brücke

Zur spezifischen Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung wurde Streptavidin als Haftvermittler für die Bindung verschiedener antimikrobieller Substanzen eingesetzt. Die Funktionalisierung wurde schrittweise aufgebaut (Abbildung 40). Zuerst wurde die Hydrophobinbeschichtung biotinyliert und anschließend über Self-Assembly eine Streptavidin-Monolage auf dieser Oberfläche generiert. Zur Biotinylierung, d.h. der Anbindung von Biotin an funktionelle Gruppen eines Proteins, wurde das kommerziell erhältliche Sulfo-NHS-Biotin verwendet. Dieses besitzt einen N-Hydroxysuccinimidrest und ermöglicht dadurch die Bindung von Biotin an primäre Amine, welche z.B. in Proteinseitenketten (Lysin) und am N-Terminus von Proteinen vorhanden sind. Streptavidin ist ein aus vier Untereinheiten aufgebautes Protein, wobei jede der Untereinheiten mit sehr hoher Affinität jeweils ein Molekül Biotin binden kann (Chaiet und Wolf 1964). Aufgrund seiner symmetrischen Struktur kann Streptavidin maximal zwei Oberflächenbiotine binden. Somit bleiben zwei weitere Biotin-Bindungstaschen pro Streptavidin unbesetzt. Diese sind aufgrund der tetrameren Anordnung des Proteins nicht zur Oberfläche, sondern nach „oben“ orientiert und können weitere biotinylierte Moleküle, Proteine oder Nanopartikeln binden (Lehnert 2011). Zur Funktionalisierung

der Hydrophobinbeschichtung wurden die antimikrobiellen Substanzen Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin mit Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert und über Streptavidin auf den Oberflächen immobilisiert.

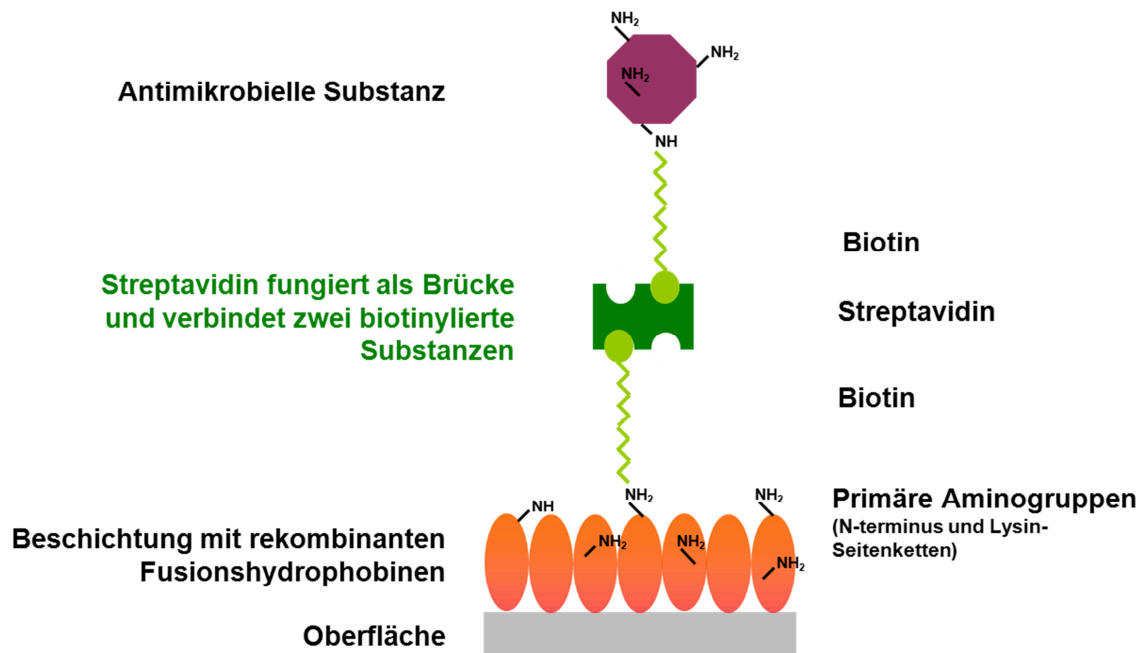


Abbildung 40. Schematische Darstellung der Strategie der Funktionalisierung von Hydrophobin-beschichteten Oberflächen über eine Streptavidin-Brücke. Mit Hilfe von Streptavidin können zwei biotinylierte Substanzen miteinander verbunden und somit z.B. antimikrobielle Substanzen auf der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen immobilisiert werden. Die Funktionalisierung der Oberfläche wird durch die Hydrophobinbeschichtung unabhängig von den spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Oberfläche.

2.5.2 1. Schritt: Biotinylierung der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen

Im ersten Schritt der sequentiellen Funktionalisierung wurden die Hydrophobin-beschichteten Oberflächen mit Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert. H*Protein A enthält 25 primäre Amine als mögliche Angriffspunkte für die Bindung von Biotin und H*Protein B 10. Die Effizienz der Biotinylierung ist abhängig von der Verteilung der Biotinylierungsstellen im Protein, der Proteinkonzentration und der verwendeten Menge an Sulfo-NHS-Biotin. Die Biotinylierung der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen wurde in Anlehnung an die Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen mit einer 1 mM Biotin-Lösung durchgeführt (Kapitel 4.3.4).

Der spezifische Nachweis der erfolgreichen Biotinylierung der Hydrophobinbeschichtung erfolgte immunologisch mit einem mit alkalischer Phosphatase funktionalisierten Anti-Biotin Antikörper.

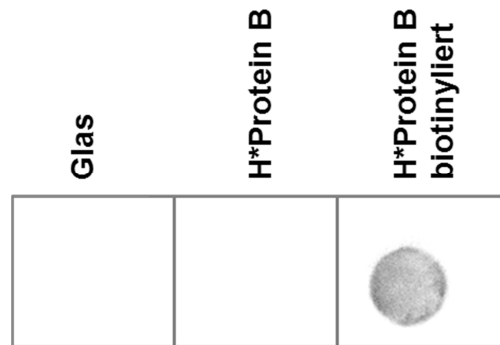


Abbildung 41. Immunologischer Nachweis der erfolgreichen Biotinylierung der H*Protein B Beschichtung. Es wurde ein mit alkalischer Phosphatase funktionalisierter Anti-Biotin Antikörper verwendet. Das Chemilumineszenzsignal wurde nach Zugabe des Substrates detektiert.

Die biotinylierte Hydrophobinbeschichtung zeigte im Gegensatz zur nicht biotinylierten Hydrophobinbeschichtung und einer unbeschichteten Glasoberfläche ein deutliches Chemilumineszenzsignal (Abbildung 41). Der erste Schritt der sequentiellen Funktionalisierung konnte erfolgreich durchgeführt werden.

2.5.3 2. Schritt: Bindung von Streptavidin an die biotinylierte Hydrophobinbeschichtung

Im zweiten Schritt der sequentiellen Funktionalisierung wurde Streptavidin an die biotinylierten Hydrophobin-beschichteten Oberflächen gebunden. Für die Anlagerung einer Streptavidin-Monolage wurden die biotinylierten Oberflächen für 2 Std. in einer 0,4 μM Streptavidin-Lösung inkubiert (Kapitel 4.3.4).

Zur Kontrolle der erfolgreichen Streptavidin-Bindung wurde fluoreszenzmarkiertes Streptavidin eingesetzt und die Anlagerung mit Epifluoreszenzmikroskopie kontrolliert.

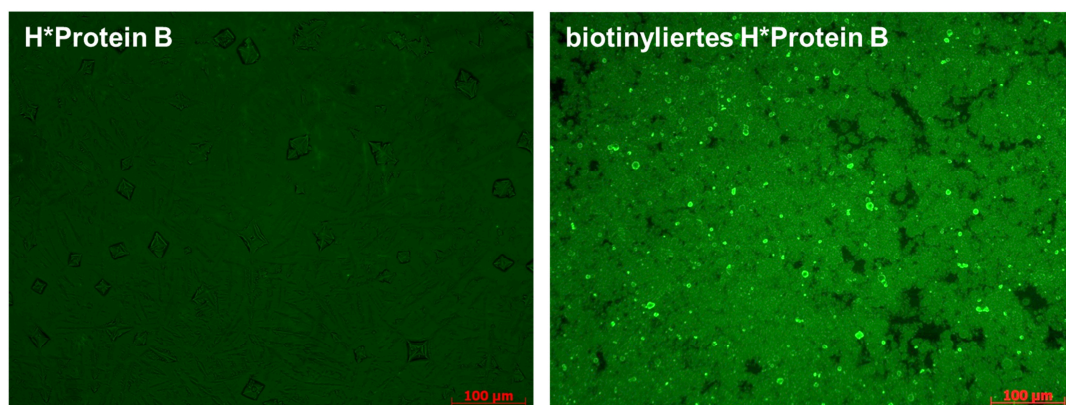


Abbildung 42. Kontrolle der spezifischen Streptavidin-Anlagerung auf einer nicht biotinylierten (rechts) und biotinylierten (links) H*Protein B Beschichtung. Die Oberflächen wurden für 2 Std. in einer 0,4 μM Lösung aus fluoreszenzmarkiertem Streptavidin inkubiert und anschließend mit Epifluoreszenzmikroskopie analysiert.

Es konnte eine deutliche Bindung des fluoreszenzmarkierten Streptavidins an die biotinylierte Hydrophobin-beschichtete Oberfläche detektiert werden (Abbildung 42).

2.5.4 3. Schritt: Immobilisierung von antimikrobiellen Substanzen

Im dritten Schritt der sequentiellen Funktionalisierung wurden die biotinylierten antimikrobiellen Substanzen auf den Oberflächen immobilisiert. Die Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung mit Hilfe von Streptavidin als Haftvermittler ermöglicht die Immobilisierung einer Vielzahl von Substanzen auf der Oberfläche. Als Referenzsubstanzen wurden hier Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin eingesetzt.

Lysozym ist ein in der Natur weitverbreitetes 14,3 kDa großes Enzym zur Zerstörung von Bakterien und zur Abwehr bakterieller Infektionen. Es hydrolysiert die β -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure- (NAM) und N-Acetylglucosaminresten (NAG) in den Zuckerketten des Peptidoglycangerüsts der Bakterienzellwand. Hierdurch kommt es zur Lyse der Bakterien. Lysozym wirkt verstärkt bei Gram-positiven Bakterien, da hier durch den unterschiedlichen Zellwandaufbau die dickere Peptidoglycanschicht direkt zugänglich und nicht von einer äußeren Membran umgeben ist. Lysozym hat 7 primäre Amine als mögliche Angriffspunkte für die Biotinylierung.

Polymyxin B ist ein 1,4 kDa großes Polypeptid-Antibiotikum aus *Bacillus polymyxa*. Es wirkt hauptsächlich gegen Gram-negative Bakterien, indem es die Permeabilität der äußeren Zellmembran verändert und diese destabilisiert. Polymyxin hat 5 primäre Amine als mögliche Angriffspunkte für die Biotinylierung.

Vancomycin ist ein 1,4 kDa großes Glycopeptidantibiotikum. Es hemmt den Aufbau der Bakterienzellwand, indem es mit den endständigen L-Lysin-D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen des bakteriellen Zellwandbestandteils Murein einen Komplex bildet. Damit blockiert es die Quervernetzung der Zellwand Gram-positiver Bakterien. Vancomycin wird als wirksame Alternative bzw. Reserveantibiotikum gegen multiresistente Staphylokokken eingesetzt. Vancomycin hat 2 primäre Amine als mögliche Angriffspunkte für die Biotinylierung.

Die antimikrobiellen Substanzen wurden in Bezug auf ihre Wirksamkeit gegenüber dem klinisch-relevanten multiresistenten Referenzbakterium *S. aureus* charakterisiert. Nach der Biotinylierung der antimikrobiellen Substanzen wurde die Effektivität der Biotinylierung quantifiziert und ihre Wirksamkeit in biotinylierter Form getestet. Die Immobilisierung der Substanzen, als letztem Schritt der Funktionalisierung der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen, wurde immunologisch detektiert.

Bestimmung der Effektivität der antimikrobiellen Substanzen gegenüber *S. aureus*

Zur quantitativen Beurteilung der Empfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber den ausgewählten antimikrobiellen Substanzen wurde das Bouillon-Mikrodilutionsverfahren eingesetzt (Kapitel 4.6.1), um die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin zu ermitteln. Es wurde das für Empfindlichkeitstests standardisierte MH Medium zur Bestimmung der MHK von planktonischen *S. aureus* Zellen und Biofilmen bei 37°C verwendet. Darüber hinaus wurde die Empfindlichkeit von *S. aureus* unter den später verwendeten Wachstumsbedingungen im Biofilmreaktor in BHI Medium bei Raumtemperatur bestimmt.

S. aureus zeigte eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den antimikrobiellen Substanzen unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen (Tabelle 5). In MH Medium waren vor allem bei Lysozym deutlich höhere Konzentrationen notwendig, um *S. aureus* abzutöten bzw. das Wachstum zu inhibieren. Die Biofilme zeigten, wie zu erwarten, eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber den antimikrobiellen Substanzen als die planktonischen Zellen. Unter den in späteren Experimenten im Biofilmreaktor verwendeten Wachstumsbedingungen (BHI, Raumtemperatur) zeigten die untersuchten antimikrobiellen Substanzen eine gute Wirksamkeit.

Tabelle 5. MHK-Werte für Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin bei *S. aureus*. Es wurde die Empfindlichkeit von planktonischen Zellen und Biofilmen in MH Medium bei 37°C und von planktonischen Zellen in BHI Medium bei Raumtemperatur (RT) bestimmt.

	MHK (mg/mL) MH Medium, 37°C		MHK (mg/mL) BHI Medium, RT
	planktonisch	Biofilm	planktonisch
Lysozym	> 10	> 10	0,50
Polymyxin B	0,02	1,10	0,02
Vancomycin	< 0,01	0,16	0,02

Biotinylierung der antimikrobiellen Substanzen

Die antimikrobiellen Substanzen wurden für die Immobilisierung auf den Hydrophobin-modifizierten Oberflächen über die Streptavidin-Brücke biotinyliert. Die Biotinylierung von Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin wurde mit einem 20-fachen molaren Überschuss an Sulfo-NHS-Biotin durchgeführt, was laut Herstellerangaben zu einer Bindung von 4-6 Biotin-Gruppen pro Molekül führt. Die antimikrobiellen Substanzen wurden zusammen mit der entsprechenden Menge Sulfo-NHS-Biotin unter leichtem Schwenken für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend aufgereinigt (Kapitel 4.3.4).

Quantifizierung der Effektivität der Biotinylierung

Die Effektivität der erfolgreichen Biotinylierung wurde mit dem FluoReporter Biotin Quantitation Assay bestimmt. Mit Hilfe dieses fluorometrischen Nachweises ist die genaue Bestimmung der Anzahl der Biotin-Markierungen pro Protein möglich. Der Nachweis basiert auf der Verdrängung eines mit einem Quencher-Farbstoff markierten Liganden aus den Biotin-Bindungsstellen von der Substanz Biotective Green durch Biotin (Kapitel 4.3.6).

Bei Lysozym konnten im Durchschnitt 4,3, bei Polymyxin B 0,8 und bei Vancomycin 1,3 Biotinmarkierungen pro Molekül nachgewiesen werden.

Untersuchung der Aktivität der antimikrobiellen Substanzen in biotinylierter Form

Durch die Biotinylierung, d.h. die Anbindung von Biotin an funktionelle Gruppen der antimikrobiellen Substanzen, kann ihre Wirksamkeit verändert werden. Es wurde die Wirksamkeit von biotinyliertem im Vergleich zu nicht biotinyliertem Lysozym gegenüber dem Referenzbakterium *Micrococcus luteus* untersucht. Die Aktivität von Lysozym wurde hierbei über eine Trübungsmessung (Turbidity Assay) bestimmt. Lysozym und biotinyliertes Lysozym wurde in einer Mikrotiterplatte seriell verdünnt und mit einer *M. luteus* Suspension in PBS-Puffer inkubiert (Kapitel 4.6.4). Die Lyse wurde bei 37°C über 18 Std. bei OD₅₉₅ detektiert.

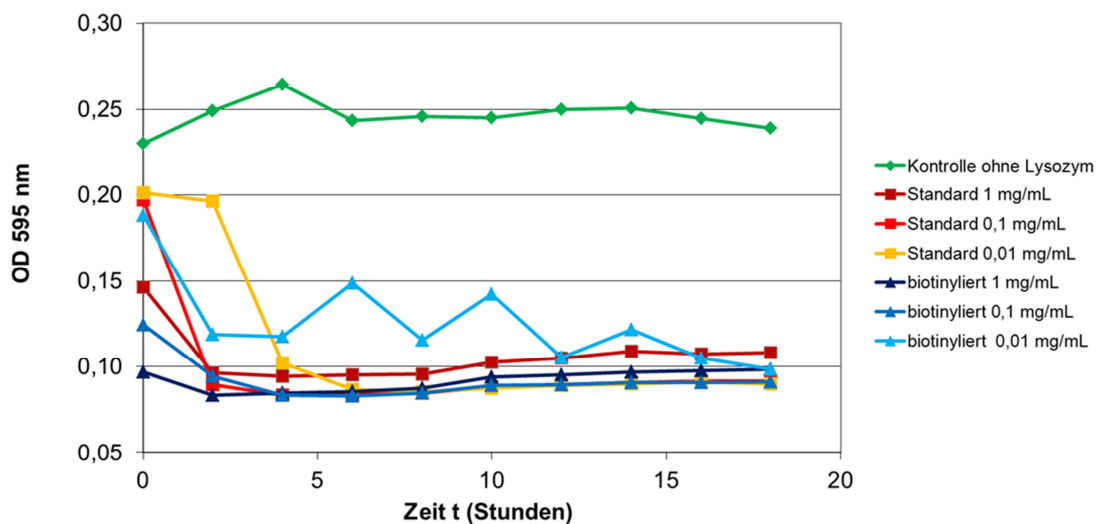


Abbildung 43. Untersuchung der Wirksamkeit von biotinyliertem Lysozym im Vergleich zu nicht biotinyliertem Lysozym gegenüber *M. luteus* mit einem Turbidity Assay. Es wurden verschiedene Konzentrationen von biotinyliertem (blaue Graphen) und nicht biotinyliertem (Standard, rote Graphen) Lysozym eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Lysozym verwendet (grüner Graph). Die Abnahme der OD₅₉₅ der *M. luteus* Suspension bedingt durch die Lyse der Bakterien wurde über 18 Std. detektiert.

Die Biotinylierung von Lysozym hatte keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität gegenüber *M. luteus* (Abbildung 43). Auch bei niedrigen Konzentrationen des biotiny-

lierten Lysozyms (0,01 mg/mL) konnte analog zu nicht biotinyliertem Lysozym eine Lyse von *M. luteus* beobachtet werden.

Nachweis der Immobilisierung der antimikrobiellen Substanzen

Im letzten Schritt der sequentiellen Funktionalisierung wurden die biotinylierten antimikrobiellen Substanzen auf den Hydrophobin-beschichteten Oberflächen immobilisiert. Der spezifische Nachweis der erfolgreichen Funktionalisierung der Hydrophobin-beschichtung erfolgte exemplarisch anhand der Immobilisation von Lysozym. Dieses wurde auf den Oberflächen immunologisch mit einem primären Anti-Lysozym Antikörper und einem sekundären HRP funktionalisierten Antikörper nachgewiesen. Die Detektion erfolgte nach der Zugabe des Substrats ECL Plus über die emittierte Chemilumineszenz (Kapitel 4.4.3).

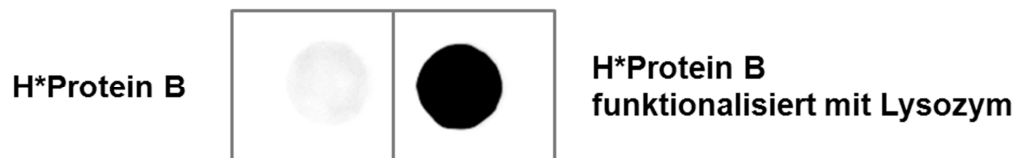


Abbildung 44. Die Immobilisierung von biotinyliertem Lysozym auf der schrittweise funktionalisierten Hydrophobinbeschichtung wurde immunologisch mit einem primären Anti-Lysozym und einem sekundären HRP funktionalisierten Antikörper nachgewiesen. Die Detektion erfolgte über die nach der Zugabe des Substrates emittierte Chemilumineszenz.

Biotinylierte H*Protein B beschichtete Oberflächen mit gebundenem Streptavidin und immobilisiertem Lysozym zeigten ein deutliches Chemilumineszenzsignal (Abbildung 44, rechts). Auf H*Protein B beschichteten Oberflächen ohne immobilisiertes Lysozym war dahingegen nur ein sehr schwaches Chemilumineszenzsignal detektierbar (Abbildung 44, links). Die Lysozymimmobilisierung und damit der letzte Schritt der sequentiellen Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung wurde erfolgreich durchgeführt.

2.5.5 Proof of Principle: Nachweis und Quantifizierung der erfolgreichen Oberflächenfunktionalisierung

Die einzelnen Schritte des sequentiellen Aufbaus der Funktionalisierung der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen wurden mit Hilfe von immunologischen bzw. fluoreszenzmikroskopischen Methoden qualitativ nachgewiesen. Für den online-Nachweis der Funktionalisierung und eine Quantifizierung wurde die QCM-D Technik eingesetzt.

Online-Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung

Für das online-Monitoring der sequentiellen Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung wurden QCM-D Messungen durchgeführt. Diese ermöglichten ohne zusätzliche Markierungsschritte die Echtzeitmessung der molekularen Adsorptions- und/oder Interaktionsprozesse.

Als Ausgangsmaterial wurden SiO₂-beschichtete Schwingquarze verwendet. Diese wurden nach dem etablierten Standardprotokoll für 16 Std. bei 80°C mit dem rekombinanten Fusionshydrophobin H*Protein B beschichtet, für 10 min. bei 80°C mit 2% SDS behandelt (β -Faltblatt-Verschiebung) und anschließend für die QCM-D Messungen verwendet. Die QCM-D Messungen wurden bei einer konstanten Flussrate von 50 μ L/min bei 20°C durchgeführt. Nach dem Spülen der Schwingquarze mit PBS-Puffer erfolgte für 30 min. die Biotinylierung mit einer 1 mM Biotin-Lösung. Nach 20-minütigem Spülen der Oberflächen mit PBS-Puffer wurde im zweiten Schritt der Funktionalisierung Streptavidin (gelöst 25 μ g/mL in PBS) an die Oberflächen gebunden. Die Oberflächen wurden erneut für 20 min. gespült und die biotinylierten antimikrobiellen Substanzen auf den Oberflächen immobilisiert. Schließlich wurden die Oberflächen gründlich mit PBS-Puffer gespült, um die Stabilität der Funktionalisierung zu überprüfen.

Die einzelnen Schritte der sequentiellen Funktionalisierung des H*Protein B beschichteten Schwingquarzes waren im QCM-D Sensogramm deutlich detektierbar (Abbildung 45). Die Biotinylierung der Hydrophobinbeschichtung war nach 30 min. noch nicht vollständig abgeschlossen. Die an die primären Amine von H*Protein B gebundenen Biotinmoleküle waren stabil gebunden, und durch das anschließende Spülen mit PBS-Puffer kam es zu keiner detektierbaren Frequenz- oder Dissipationsänderung. Streptavidin ist mit einer molekularen Masse von 60 kDa ein sehr großes Molekül, und durch die Ausbildung der Streptavidin-Monolage im nächsten Schritt kam es zu einer deutlichen Änderung der Resonanzfrequenz. Die Änderung der Dissipation war gering, was auf eine sehr feste Bindung zwischen Biotin und Streptavidin und die Ausbildung einer starren Schicht hindeutet. Streptavidin war ebenfalls irreversibel an die Oberfläche gebunden und wurde nicht durch den nachfolgenden Spülschritt mit PBS-Puffer abgelöst. Die Bindung von biotinyliertem Lysozym führte zu einer Frequenz- und Dissipationsänderung. Die Immobilisierung war jedoch nicht vollständig stabil, und ein Großteil des gebundenen Proteins wurde durch anschließendes Spülen mit PBS-Puffer wieder gelöst.

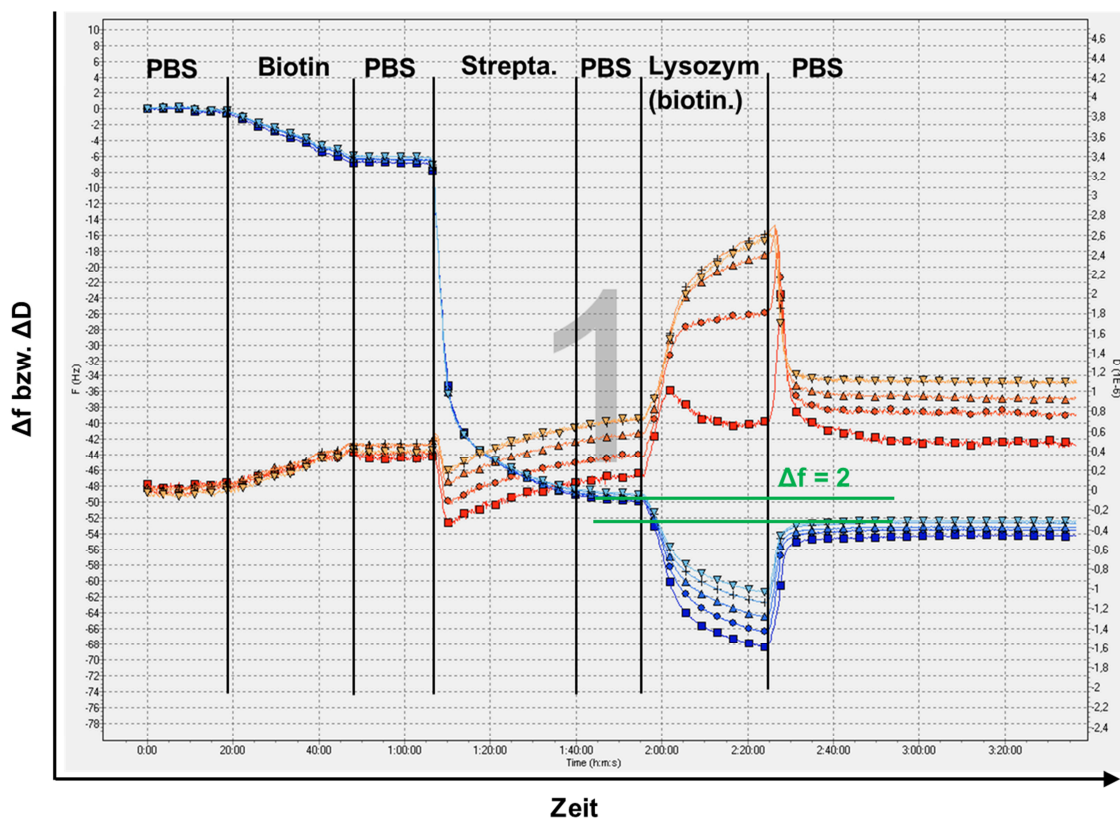


Abbildung 45. Repräsentatives QCM-D Sensogramm der online-Funktionalisierung eines H*Protein B beschichteten SiO₂-Schwinquarzes. Es sind die Änderung der Resonanzfrequenz (blaue Graphen) und der Dissipation (rote Graphen) über die Zeit während der einzelnen aufeinanderfolgenden Schritte der sequentiellen Funktionalisierung bei einer konstanten Flussrate von 50 µL/min und 20°C dargestellt. Es wurden die Daten der 3. bis 11. Obertöne verwendet.

Um zu kontrollieren, ob bei der Lysozymimmobilisierung die Detektionsgrenzen des QCM-D erreicht wurden, oder ob alles zuvor gebundene Lysozym durch das Waschen mit PBS-Puffer wieder gelöst worden war, wurde ein Antikörperrnachweis direkt auf den QCM-D Sensorkristallen durchgeführt. Hierbei wurde als primärer Antikörper ein Anti-Lysozym Antikörper und als sekundärer Antikörper ein mit HRP funktionalisierter Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte über die emittierte Chemilumineszenz nach Zugabe des Substrats ECL Plus.

Mit Hilfe des immunologischen Nachweises konnte auf den QCM-D Sensorkristallen trotz einer sehr geringen (oder fehlenden) Änderung in der Resonanzfrequenz Δf durch die Lysozymanlagerung nach dem Spülen mit PBS-Puffer, Lysozym nachgewiesen werden (Abbildung 46, Probe 3). Als Kontrolle der Spezifität des Nachweises wurde ein H*Protein B beschichteter SiO₂-Sensorkristall verwendet. Hier konnte kein Chemilumineszenzsignal detektiert werden (Abbildung 46, Probe 1). Auf H*Protein B beschichteten SiO₂-Sensoren, die nicht biotinyliert und nicht mit Streptavidin inkubiert wurden, konnte keine unspezifische Bindung von biotinyliertem Lysozym nachgewiesen werden (Abbildung 46, Probe 2).

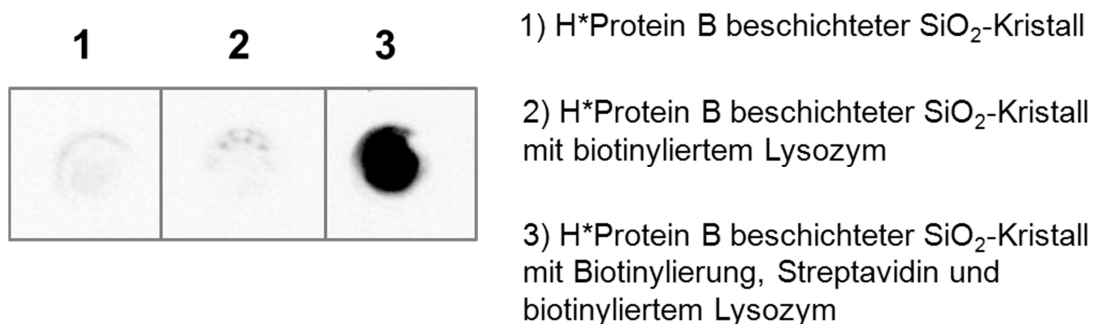


Abbildung 46. Immunologischer Nachweis der Lysozymimmobilisierung während der online-Funktionalisierung auf QCM-D Sensorkristallen. Als primärer Antikörper wurde ein Anti-Lysozym und als sekundärer Antikörper ein mit HRP funktionalisierter Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte über die emittierte Chemilumineszenz nach der Zugabe des Substrates. Als Kontrollen wurde ein SiO₂-Kristall ohne immobilisiertes Lysozym (1) und ein SiO₂-Kristall ohne vorherige Biotinylierung und Streptavidin-Bindung (2) verwendet.

Bei der online-Funktionalisierung wurde mit der Lysozym-Immobilisierung die Detektionsgrenze des QCM-D erreicht. Auch wenn mit dem QCM-D auf den Sensorkristallen nach dem Spülen mit PBS-Puffer kein oder nur ein sehr geringes Δf detektierbar war, konnte das immobilisierte Lysozym eindeutig über Antikörper nachgewiesen werden.

Quantifizierung der immobilisierten antimikrobiellen Substanzen.

Eine Quantifizierung der auf den Oberflächen immobilisierten Substanzen war aufgrund der Unterschreitung der Nachweisgrenze der Quarzkristall-Mikrowaage nicht möglich. Alternativ wurde daher eine Abschätzung der pro Flächeneinheit gebundenen Lysozymmenge im Mikrotiterplattenformat durchgeführt.

Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte nach dem etablierten Standardprotokoll mit H*Protein B beschichtet. Die Hydrophobinbeschichtung wurde anschließend biotinyliert, Streptavidin wurde gebunden und biotinyliertes Lysozym immobilisiert. Das verwendete Lysozym war im Durchschnitt mit 4,3 Biotinmolekülen pro Proteinmolekül markiert und wurde in Konzentrationen von 50 $\mu\text{g/mL}$ und 500 $\mu\text{g/mL}$ eingesetzt. Zur Abschätzung der auf den funktionalisierten Oberflächen gebundenen Lysozymmenge wurde eine Eichgerade mit bekannten Lysozymkonzentrationen verwendet. Der Lysozym Nachweis wurde immunologisch mit einem primären Anti-Lysozym und einem sekundären HRP funktionalisierten Antikörper durchgeführt. Die Detektion erfolgte anhand der nach der Substratzugabe emittierten Chemilumineszenz. Ausgehend von den Signalintensitäten der Lysozym-Eichgerade im linearen Bereich wurde die maximal immobilisierte Lysozymmenge auf den funktionalisierten Oberflächen bestimmt.

Die auf den funktionalisierten Oberflächen immobilisierte Lysozymmenge ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten Lysozymlösung (Tabelle 6). Aus einer Lösung mit einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ wurden 1,6 pg Lysozym pro cm^2 immobilisiert. Dieser Wert stieg auf 4,6 pg/cm^2 für eine Ausgangslösung mit einer Konzentration von

500 µg/mL. Die Nachweisgrenze der Quarzkristall-Mikrowaage liegt laut Herstellerangaben bei 0,5 ng/cm² und damit deutlich über den hier für Lysozym bestimmten Werten. Auf Kontrolloberflächen ohne immobilisiertes Lysozym konnten keine unspezifischen Signale detektiert werden.

Tabelle 6. Quantifizierung der Menge an immobilisiertem biotinylierten Lysozym. Der Lysozym Nachweis wurde immunologisch mit einen primären Anti-Lysozym und einen sekundären HRP funktionalisierten Antikörper durchgeführt im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Die Detektion erfolgte anhand der nach der Substratzugabe emittierten Chemilumineszenz. Die maximal immobilisierte Lysozymmenge wurde anhand der Chemilumineszenzintensität einer Eichgeraden mit bekannten Lysozymkonzentrationen abgeschätzt. Die Kavität einer 96-well Mikrotiterplatte hat eine Fläche von 30 mm².

Konzentration eingesetzte Lysozymlösung	Lysozym gebunden/30mm ²	Lysozym gebunden/cm ²
50 µg/mL	0,5 pg	1,6 pg
500 µg/mL	1,4 pg	4,6 pg

2.5.6 Zusammenfassung Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein A eignen sich sehr gut für biomimetische Oberflächenmodifikationen. Um den Einfluss dieser universell einsetzbaren Beschichtung auf die bakterielle Biofilmbildung zu erhöhen, wurde eine Funktionalisierung der Hydrophobinschicht mit antimikrobiellen Substanzen durchgeführt. Streptavidin wurde hierbei als Haftvermittler für die Bindung von Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin eingesetzt. Die Funktionalisierung wurde schrittweise aufgebaut. Zuerst wurde die Hydrophobinbeschichtung biotinyliert, anschließend über Self-Assembly eine Streptavidin-Monolage auf dieser Oberfläche generiert und als letzter Schritt die biotinylierten antimikrobiellen Substanzen gebunden. Die einzelnen Schritte der sequentiellen Funktionalisierung konnten immunologisch bzw. fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen und online mit der Quarzkristall-Mikrowaage detektiert werden. Exemplarisch wurde die Menge an immobilisiertem Lysozym quantifiziert. Pro cm² wurden abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration 1,6–4,6 pg Lysozym stabil gebunden.

Das untersuchte Konzept der Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtungen über eine Streptavidin-Brücke kann für gezielte Oberflächenfunktionalisierungen mit unterschiedlichen antibakteriellen oder antifouling Substanzen eingesetzt werden. Es eröffnet die Möglichkeit einer anwendungsorientierten Funktionalisierung von unterschiedlichen Oberflächen und einer spezifischen Manipulation des Biofilmwachstums. In Kapitel 2.6 wird der antimikrobielle Effekt der funktionalisierten Oberflächen und ihr Einfluss auf die bakterielle Biofilmbildung untersucht.

2.6 Einfluss der Funktionalisierung auf das Bakterienwachstum

Die biomimetische Oberflächenbeschichtung mit dem rekombinanten Fusionshydrophobin H*Protein B wurde mit den antimikrobiellen Substanzen Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin funktionalisiert. Im Folgenden wurde zuerst die antimikrobielle Aktivität der funktionalisierten Oberflächen untersucht. Anschließend wurde der Einfluss der Funktionalisierung auf das bakterielle Biofilmwachstum im statischen System und unter definierten Scherkräften in einem kommerziellen Biofilmreaktor (CDC-Biofilmreaktor) analysiert. Als Referenzkeim wurde das Methicillin resistente Gram-positive Bakterium *S. aureus* eingesetzt.

2.6.1 Charakterisierung der antimikrobiellen Aktivität der funktionalisierten Oberflächen

Kirby-Bauer Diffusionstest

Um eine mögliche Freisetzung (Leaching) der immobilisierten Substanzen von den funktionalisierten Hydrophobin-beschichteten Oberflächen zu detektieren, wurde die Kirby-Bauer Diffusionsmethode angewendet (Kapitel 4.6.2). Dieser Agardiffusionstest wird standardmäßig in der Routinediagnostik verwendet, um die Empfindlichkeit von Bakterienstämmen gegenüber Antibiotika zu bestimmen. Eine Inhibitionszone (ZOI = zone of inhibition) in der mikrobielles Wachstum verhindert wird, zeigt die Effizienz bzw. die Freisetzung der antimikrobiellen Substanzen an.

Als Referenzkeim wurde *S. aureus* auf einer MH Agar-Platte ausgestrichen. Glascoupons, beschichtet mit dem rekombinanten Fusionshydrophobin H*Protein B nach Standardprotokoll und funktionalisiert mit den antimikrobiellen Substanzen Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin, wurden auf den Agar aufgelegt und die Platte für 24 Std. bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden Filterpapierplättchen, getränkt mit unterschiedlichen Konzentrationen der antimikrobiellen Substanzen, verwendet.

Um die getränkten Filterpapiere waren nach 24-stündiger Inkubationszeit abhängig von der Konzentration deutliche ZOIs erkennbar. Die Lösungen der antimikrobiellen Substanzen diffundierten aus dem Filterpapier in den Agar und unterdrückten das Wachstum von *S. aureus*. Im Bereich um die funktionalisierten Oberflächen waren keine ZOIs erkennbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die antimikrobiellen Substanzen fest auf den funktionalisierten Oberflächen gebunden waren und nicht freigesetzt wurden, oder dass die Konzentration der gebundenen Substanzen auf den Oberflächen zu gering war, um eine ZOI zu erzeugen.

Analyse der antibakteriellen Aktivität der funktionalisierten Oberflächen

Die Überprüfung und Bestimmung der antibakteriellen Aktivität der immobilisierten Substanzen wurde in Anlehnung an das standardisierte Testverfahren ASTM E 2149 durchgeführt (Kapitel 4.6.3). Dieser Test ermöglicht die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität immobilisierter Substanzen unter dynamischen Bedingungen. Die Voraussetzung für die Anwendung dieses Testverfahren ist, dass die gebundenen antimikrobiellen Substanzen fest auf der Oberfläche immobilisiert sind und nicht freigesetzt werden. Dies konnte mit dem zuvor durchgeführten Kirby-Bauer Diffusionstest bestätigt werden.

Als Referenzbakterien wurden *S. aureus* und, aufgrund der höheren Empfindlichkeit gegenüber Lysozym, zusätzlich *M. luteus* eingesetzt. In Zellwaschpuffer (5 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris, pH 8,0) wurden Bakteriensuspensionen auf eine OD_{600} 0,6 eingestellt. In Zellwaschpuffer wird das Bakterienwachstum gestoppt, die Bakterienzellen jedoch nicht abgetötet. Die Bakteriensuspensionen wurden zusammen mit den funktionalisierten Oberflächen bei 37°C und 100 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Als Kontrolle wurden nicht funktionalisierte Oberflächen und die antimikrobiellen Substanzen in gelöster Form eingesetzt. Die Kontrolle der Kultivierbarkeit durch die Bestimmung der KBE erfolgte zu Beginn der Inkubation, nach 3 und 24 Std.. *S. aureus* wurde mit Vancomycin funktionalisierten Hydrophobinbeschichtungen und *M. luteus* mit Lysozym funktionalisierten Oberflächen inkubiert.

Die Anzahl der kultivierbaren *M. luteus* Zellen blieb bei der Inkubation in Zellwaschpuffer über 24 Std. konstant (Abbildung 47). Auch die Inkubation der Bakterien mit Glasoberflächen und Glasoberflächen, modifiziert mit H*Protein B, führte zu keiner Abnahme der Anzahl an kultivierbaren Bakterien. Bakteriensuspensionen, die mit Lysozym behandelt und mit Lysozym funktionalisierten Oberflächen inkubiert worden waren, zeigten eine deutliche Verringerung der Zellzahl. Die mit Lysozym funktionalisierte Oberfläche zeigte nach 24 Std. eine antimikrobielle Aktivität R ($R = \log KBE \text{ (Kontrolle)} - \log KBE \text{ (Probe)}$) von 2,8. Dies entspricht einer bakteriellen Reduktion von annähernd 99,9%. Die mit Lysozym funktionalisierte Oberfläche zeigte eine eindeutige antimikrobielle Aktivität gegenüber *M. luteus*.

Bei den Vancomycin funktionalisierten Oberflächen konnte keine antimikrobielle Aktivität gegenüber *S. aureus* detektiert werden.

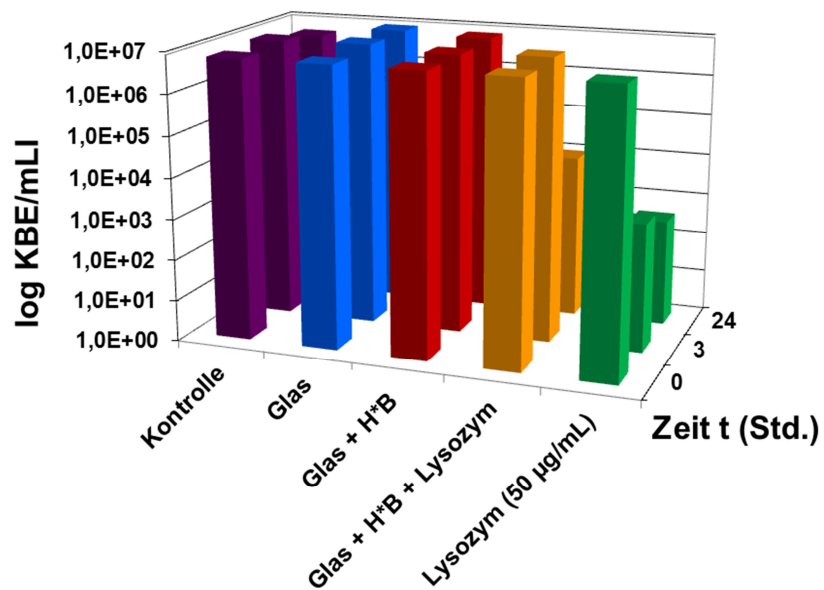


Abbildung 47. Logarithmische Darstellung der Anzahl der kultivierbaren *M. luteus* Zellen zu Beginn und nach 3- bzw. 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Oberflächen bzw. Kontrollsubstanzen in Zellwaschpuffer. In der Kontrolle (links, lila Balken) wurde die Stabilität der Kultivierbarkeit der *M. luteus* Zellen in Zellwaschpuffer über die Dauer der Inkubation überprüft. Zur Kontrolle der wirksamen Abtötung von *M. luteus* durch Lysozym wurde dieses in gelöster Form in einer Konzentration von 50 µg/mL direkt zur Bakteriensuspension gegeben (rechts, grüne Balken).

Die mit Lysozym funktionalisierten Hydrophobin-beschichteten Oberflächen zeigten eine antibakterielle Aktivität gegenüber *M. luteus*. Bei den Vancomycin funktionalisierten Oberflächen konnte mit den angewendeten Testmethoden keine antibakterielle Aktivität gegenüber *S. aureus* detektiert werden. Die Frage, ob die funktionalisierten Oberflächen mit und ohne nachgewiesene antibakterielle Aktivität einen Einfluss auf die mikrobielle Biofilmbildung haben, wurde im nächsten Abschnitt behandelt. Es wurde hierfür der Einfluss der funktionalisierten Oberflächen auf die primäre Adhäsion und frühe Biofilmbildung im statischen System und anschließend im CDC-Biofilmreaktor unter definierten Scherkräften untersucht.

2.6.2 Einfluss der funktionalisierten Hydrophobinbeschichtung auf das bakterielle Biofilmwachstum – Untersuchung im statischen System

Im statischen System wurden die Untersuchungen im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Als Referenzbakterium wurde *S. aureus* eingesetzt und als Nährstoffquelle MH Medium verwendet. Unter diesen Bedingungen findet, wie bereits gezeigt werden konnte (Kapitel 2.4.1, Abbildung 34), eine verminderte *S. aureus* Adhäsion in Hydrophobin-modifizierten Kavitäten im Vergleich zu unbehandelten Kavitäten der Mikrotiterplatte statt. Die mit H*Protein B für 16 Std. bei 80°C in β -Faltblatt Konformation beschichteten Mikrotiterplatten wurden mit Biotin und Streptavidin behandelt und die

antimikrobiellen Substanzen Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin auf den Oberflächen immobilisiert. Die Detektion der primären Adhäsion und der jungen Biofilme erfolgte über die Anfärbung mit Kristallviolett zur Bestimmung der Gesamtbioasse auf der Oberfläche (Kapitel 4.5.5) und mit Resazurin zur Detektion der atmungsaktiven Bakterien (Kapitel 4.5.6).

Primäre Adhäsion

Zur Untersuchung der primären Adhäsion wurde eine *S. aureus* Kultur mit einer OD_{600} von 0,8 verwendet. Die Mikrotiterplatte wurde für 3 Std. bei 37°C mit der Bakterien suspension inkubiert und anschließend mit Kristallviolett bzw. Resazurin behandelt.

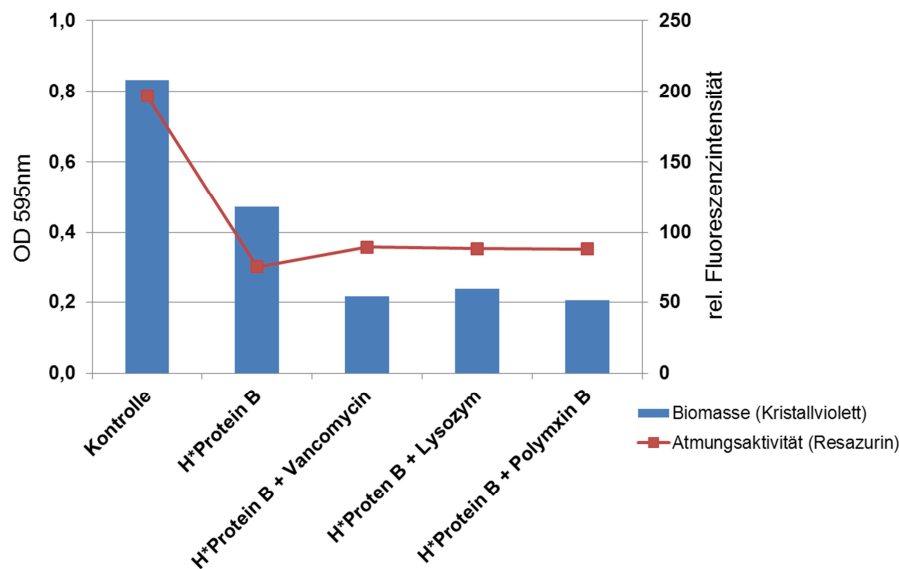


Abbildung 48. Biomasse (blau) und Atmungsaktivität (rot) von adhären *S. aureus* Zellen nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C in den unterschiedlichen unbeschichteten, H*Protein B beschichteten und mit den antimikrobiellen Substanzen Vancomycin, Lysozym und Polymyxin B funktionalisierten Kavitäten einer Mikrotiterplatte.

Nach 3-stündiger Inkubation konnte auf der unbeschichteten Kontrolloberfläche deutlich mehr Biomasse und eine höhere Atmungsaktivität detektiert werden, als auf den H*Protein B beschichteten und funktionalisierten Oberflächen (Abbildung 48). Auf den funktionalisierten Oberflächen hatten sich die wenigsten *S. aureus* Zellen angelagert. Diese zeigten eine ähnliche Atmungsaktivität wie die auf der H*Protein B Beschichtung adhären Bakterien. Die auf den antimikrobiell funktionalisierten Oberflächen adhären Bakterien wurden nicht (komplett) abgetötet. Die vorhandene Stoffwechselaktivität der adhären Bakterien zeigte, dass lebende Bakterienzellen auf der Oberfläche vorhanden sind.

Um eine möglicherweise verzögert eintretende Wirkung der antimikrobiellen Substanzen zu untersuchen, wurden im Folgenden junge Biofilme betrachtet.

Junge Biofilme

Zur Untersuchung junger *S. aureus* Biofilme wurde eine Bakterienkultur mit einer OD_{600} von 0,1 verwendet. Die Mikrotiterplatte wurde für 44 Std. bei 37°C mit der Bakterien-suspension inkubiert und anschließend mit Kristallviolett bzw. Resazurin behandelt. Auch nach 44-stündiger Inkubation wurde auf den unbehandelten Kontrolloberflächen mehr Biomasse als auf den H*Protein B beschichteten und funktionalisierten Oberflächen detektiert (Abbildung 49). Auf den mit den antimikrobiellen Substanzen Vancomycin, Lysozym und Polymyxin B funktionalisierten Oberflächen hatten sich die wenigsten *S. aureus* Zellen angelagert. Die Atmungsaktivität der adhärerten Bakterienzellen war auf allen Oberflächen vergleichbar. Wie bereits in Kapitel 2.4.1 beschrieben, lässt sich jedoch nicht direkt anhand der gemessenen relativen Fluoreszenzintensität des Resorufins auf die Anzahl der stoffwechselaktiven und damit lebenden Bakterien rückschließen. Durch eine schnellere Limitierung des Nährstoffangebotes und eine dadurch bedingte Verzögerung der wachstumsbedingten Stoffwechselprozesse kann es z.B. vorkommen, dass in Kavitäten mit hoher Zellzahl eine geringere Menge an Resorufin detektiert wird.

Die auf den funktionalisierten Oberflächen adhärerten Bakterien zeigten auch nach einer 44-stündigen Inkubation eine deutliche Stoffwechselaktivität. Es konnte keine signifikante antimikrobielle Wirkung der mit Vancomycin, Lysozym und Polymyxin B funktionalisierten Oberflächen detektiert werden.

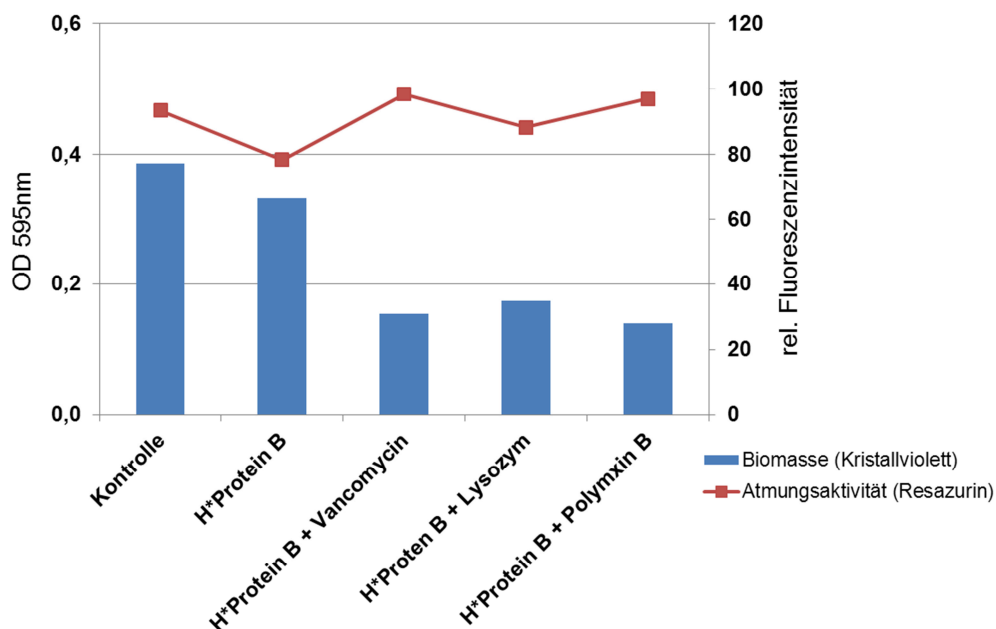


Abbildung 49. Biomasse (blau) und Atmungsaktivität (rot) von jungen *S. aureus* Biofilmen nach 44-stündiger Inkubation bei 37°C in den unterschiedlichen unbehandelten, H*Protein B beschichteten und mit den antimikrobiellen Substanzen Vancomycin, Lysozym und Polymyxin B funktionalisierten Kavitäten einer Mikrotiterplatte.

2.6.3 Einfluss der funktionalisierten Hydrophobinbeschichtung auf das bakterielle Biofilmwachstum – Untersuchungen im Durchfluss-System

Zusätzlich zu den statischen Untersuchungen des Einflusses der funktionalisierten Oberflächen auf die bakterielle Biofilmbildung wurde auch ein Durchfluss-System eingesetzt. Die Verwendung des standardisierten CDC-Biofilmreaktors ermöglichte die Charakterisierung der Biofilmbildung unter definierten Scherkräften. Dies spielt eine entscheidende Rolle zur Bewertung des Langzeitverhaltens, und liefert zusätzliche Informationen über die Adhäsionskräfte der Bakterien auf den Oberflächen.

Zur Untersuchung der Biofilmbildung auf unbehandelten, H*Protein B beschichteten und mit Lysozym und Polymyxin B funktionalisierten Oberflächen wurde *S. aureus* als Referenzkeim und BHI als Nährmedium eingesetzt. Ausgehend von der für *S. aureus* bestimmten Verdopplungszeit bei Raumtemperatur von 90 min., wurde der Reaktor mit einer Flussrate von 5 mL/min betrieben (Kapitel 4.5.3). So wurde sichergestellt, dass die Verweildauer unterhalb der Verdopplungszeit liegt und das Biofilmwachstum im Gegensatz zum planktonischen Wachstum gefördert wird. Für die *S. aureus* Biofilmkultivierung wurde eine Übernachtskultur aus einer einzelnen Bakterienkolonie in frischem Medium auf eine OD₆₀₀ 0,1 verdünnt. Die Bakterienadhäsion erfolgte im Reaktor für 1,5 Std. ohne Zufluss von frischem Nährmedium, aber bereits mit definierten Scherkräften von 0,06 dyn/cm² und einer Reynoldszahl von 680. Nach 1,5 Std wurde der Medienzufluss gestartet. Das Biofilmwachstum erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 5, 10 bzw. 26 Std. wurden die Oberflächen aus dem Reaktor entnommen und die Biofilme hinsichtlich der Anzahl der kultivierbaren Bakterien auf der Oberfläche untersucht. Die Biofilmstruktur und die Anzahl der atmungsaktiven Bakterien wurden fluoresszenzmikroskopisch analysiert.

Kultivierbarkeit der Biofilmbakterien

Zur Ermittlung der Anzahl der kultivierbaren Bakterien in den Biofilmen auf den verschiedenen Oberflächen wurden die Biofilme abgeschabt und die KBE bestimmt.

Tabelle 7. Anzahl der kultivierbaren *S. aureus* Zellen pro cm² in den Biofilmen auf den unterschiedlichen Oberflächen. Die Oberflächen wurden für 5, 10 bzw. 26 Std. im CDC-Biofilmreaktor in Bakteriensuspension inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte von zwei unabhängigen KBE-Bestimmungen und die entsprechende Standardabweichung (SD).

	5 Std.		10 Std.		26 Std.	
	KBE/cm ²	SD	KBE/cm ²	SD	KBE/cm ²	SD
Glas	2,6E+02	1,1E+01	1,1E+03	7,2E+01	6,5E+03	0,0E+00
H*Protein B (H*B)	1,9E+03	5,7E+01	5,2E+02	2,2E+01	1,4E+03	5,0E+01
H*B + Lysozym	1,1E+03	1,6E+01	1,1E+03	3,2E+01	2,4E+04	2,1E+03
H*B + Polymyxin B	1,2E+03	7,9E+01	6,4E+03	7,1E+02	1,1E+05	5,5E+03

Nach 5 Std. hatten sich auf allen Oberflächen bereits eine deutliche Anzahl Bakterien angelagert (Tabelle 7). Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien nahm mit steigender Inkubationszeit auf allen Oberflächen zu. Nach 26-stündiger Inkubation konnten auf der mit Polymyxin B funktionalisierten Oberfläche mit 1×10^5 KBE/cm² die meisten kultivierbaren Bakterien detektiert werden.

Zur genaueren Analyse der bakteriellen Besiedlung wurde die Anzahl der kultivierbaren Bakterien auf den Hydrophobin-beschichteten und funktionalisierten Oberflächen mit der Anzahl der kultivierbaren Bakterien auf der unbehandelten Glasoberfläche verglichen. Es wurde die Besiedlungsrate, d.h. der prozentuale Anteil der kultivierbaren Bakterien auf den modifizierten und funktionalisierten Oberflächen im Vergleich zur Kontrolloberfläche (Glas) berechnet. Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien auf der Glasoberfläche wurde als 100% betrachtet.

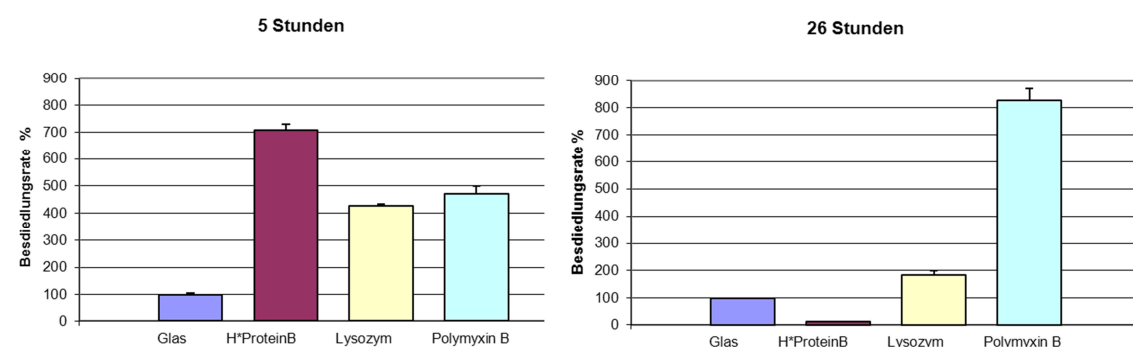


Abbildung 50. Prozentuale Besiedlung der verschiedenen Oberflächen mit *S. aureus* Zellen nach 5 Std. (rechts) bzw. 26 Std. (links) Inkubation. Die Besiedlungsrate wurde als der prozentuale Anteil der kultivierbaren Bakterien auf den modifizierten und funktionalisierten Oberflächen im Vergleich zur Kontrolloberfläche (Glas) berechnet. Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien auf der Glasoberfläche wurde als 100% betrachtet.

Nach 5-stündiger Inkubation war die Besiedlung der Glasoberfläche im Vergleich zu den modifizierten und funktionalisierten Oberflächen am geringsten (Abbildung 50). Auf der H*Protein B beschichteten Oberfläche konnten 7-mal mehr kultivierbare Bakterien als auf der unbehandelten Glasoberfläche nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist gegenläufig zu den Daten der Biofilmbildung von *S. aureus* im statischen System (Kapitel 2.6.2). In der Mikrotiterplatte lagerten sich mehr Bakterien auf den unbehandelten Kontrolloberflächen an. Dies könnte auf die andere Kontrolloberfläche (Glas statt Polystyrol), das andere verwendete Wachstumsmedium (BHI statt MH) und die anderen Wachstumsbedingungen (Scherkräfte statt statisch) und zurückzuführen sein.

Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien auf den antimikrobiell funktionalisierten Oberflächen war zwar etwa 4-mal höher als auf der unbehandelten Glasoberfläche, jedoch niedriger als auf der H*Protein B beschichteten Oberfläche

Nach 26-stündiger Inkubation waren auf der H*Protein B beschichteten Oberfläche weniger Bakterien als auf der Kontrolloberfläche detektierbar. Die antibakteriell funktionalisierten Oberflächen zeigten dahingegen eine sehr starke Bakterienbesiedlung. Auf der Polymyxin B funktionalisierten Oberfläche konnten 8-mal mehr kultivierbare Bakterien nachgewiesen werden als auf der Glasoberfläche.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Biofilme

Die Untersuchung der Kultivierbarkeit der Biofilmbakterien der unterschiedlichen Oberflächen zeigte keine eindeutige antibakterielle Wirkung der funktionalisierten Oberflächen. Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Biofilme wurde zur Detektion von atmungsaktiven Bakterien CTC (5-Cyano-2,3-ditolychlorid) verwendet (Kapitel 4.7.1). CTC ist ein Tetrazoliumsalz, das durch die Dehydrogenase Aktivität der Bakterien zu einem wasserunlöslichen, rot fluoreszierenden Formazan reduziert wird. Metabolisch aktive Bakterien erscheinen unter dem Epifluoreszenzmikroskop rot. Zusätzlich wurde zur Anfärbung aller Bakterien der DNA interkalierende Farbstoff Syto9 verwendet.

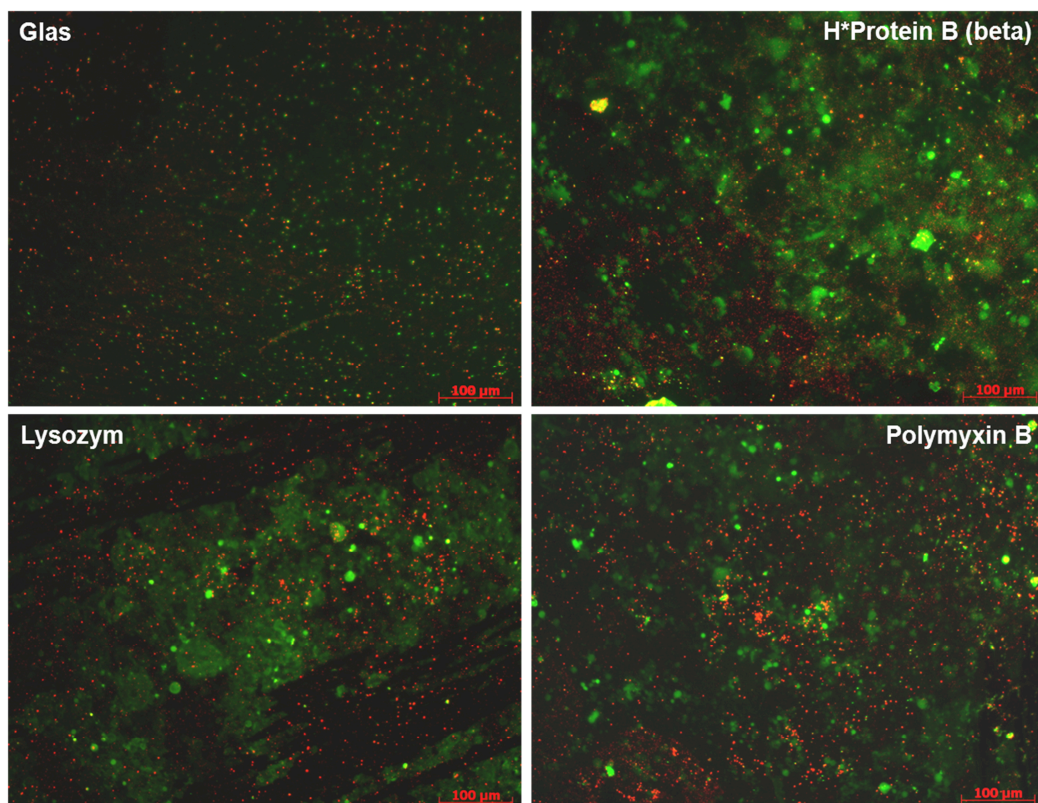


Abbildung 51. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Biofilme auf Glas, Glas beschichtet mit H*Protein B und Oberflächen funktionalisiert mit Lysozym bzw. Polymyxin B. Die Oberflächen wurden für 5 Std. in *S. aureus* Bakteriensuspension im CDC-Biofilmreaktor in BHI inkubiert. Zur Detektion von metabolisch aktiven Bakterien wurde CTC (rot) und zur Anfärbung aller adhärenen Bakterien Syto9 (grün) verwendet.

Nach 5-stündiger Inkubation im CDC-Biofilmreaktor waren alle Oberflächen mit einem homogenen Bakterienrasen aus atmungsaktiven Bakterien (rot) bedeckt (Abbildung 51). Neben Bakterien wurde auch die Hydrophobinbeschichtung durch Syto9 angefärbt und bildete eine unspezifische grüne Hintergrundfärbung.

Nach 26 Std. war auf der Glasoberfläche und der H*Protein B beschichteten Oberfläche immer noch eine sehr homogene Verteilung der atmungsaktiven Bakterien erkennbar (Abbildung 52). Auf den Lysozym und Polymyxin B funktionalisierten Oberflächen hatten sich die Bakterien zu Agglomeraten zusammengelagert

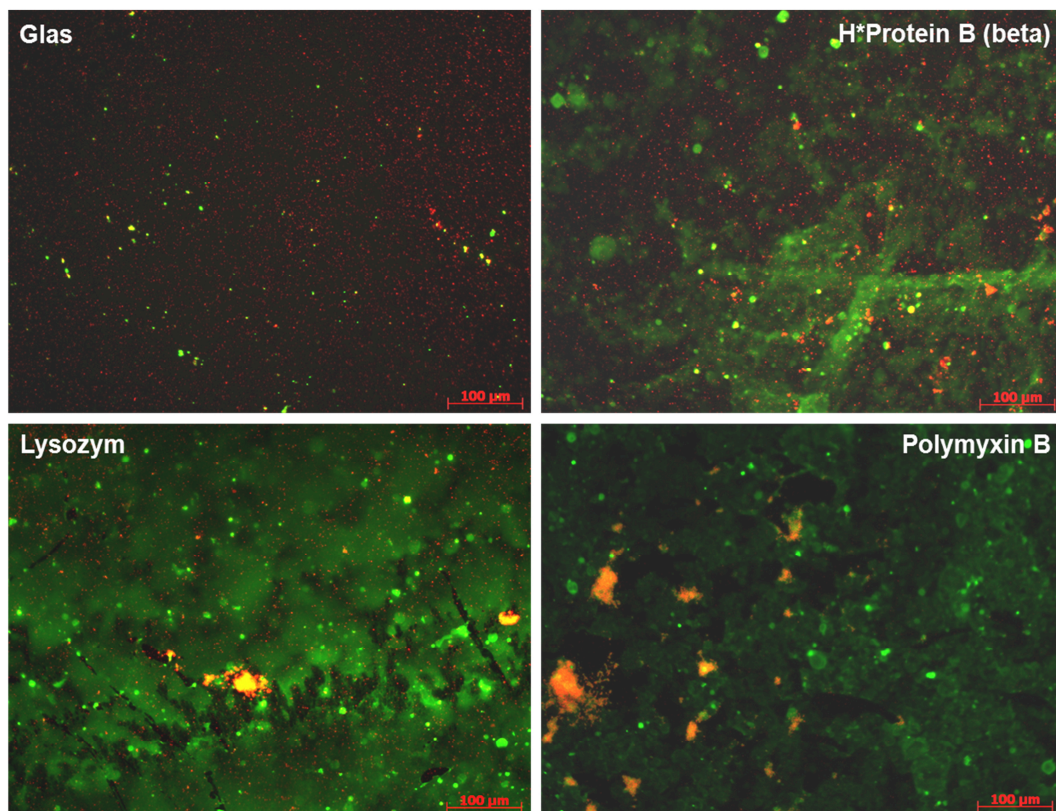


Abbildung 52. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Biofilme auf Glas, Glas beschichtet mit H*Protein B und Oberflächen funktionalisiert mit Lysozym bzw. Polymyxin B. Die Oberflächen wurden für 26 Std. in *S. aureus* Bakteriensuspension im CDC-Biofilmreaktor in BHI inkubiert. Zur Detektion von metabolisch aktiven Bakterien wurde CTC (rot) und zur Anfärbung aller adhärenenten Bakterien Syto9 (grün) verwendet.

Neben der qualitativen optischen Auswertung der Struktur und räumlichen Verteilung der Biofilme auf den verschiedenen Oberflächen wurde auch die prozentuale Oberflächenbedeckung der untersuchten Materialien mit atmungsaktiven Bakterien quantifiziert. Hierfür wurde die Software Bioflux 200 (Kapitel 4.7.2) verwendet und pro Oberfläche jeweils 10 Bilder mit 200-facher Vergrößerung ausgewertet.

Die Oberflächenbedeckung mit atmungsaktiven Bakterien ist nach 5 Std. auf den Glasoberflächen mit 1% am niedrigsten und auf H*Protein B beschichteten Oberflächen

mit 4,5% am höchsten (Abbildung 50). Die Oberflächenbedeckung der antimikrobiell funktionalisierten Hydrophobinbeschichtung mit atmungsaktiven Bakterien ist mit 2% deutlich niedriger als auf der H*Protein B Beschichtung ohne Funktionalisierung. Auch nach 26 Std. ist die prozentuale Oberflächenbedeckung auf den H*Protein B beschichteten Oberflächen am höchsten. Die mit Lysozym und Polymyxin B funktionalisierten Oberflächen weisen eine geringere prozentuale Bedeckung mit atmungsaktiven Bakterien auf.

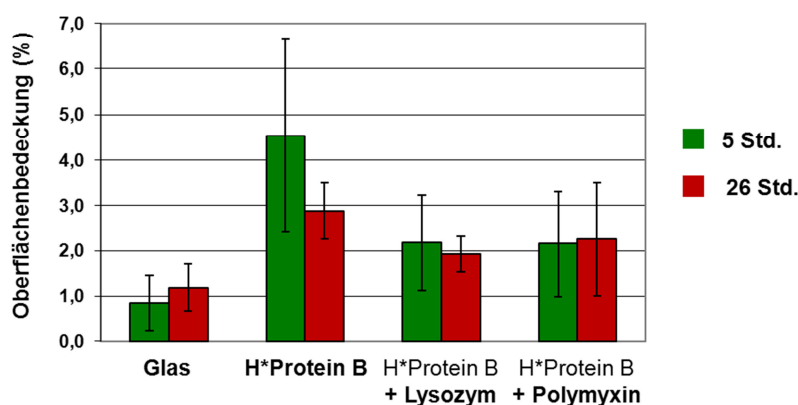


Abbildung 53. Darstellung der prozentualen Oberflächenbedeckung der unterschiedlichen Oberflächen mit atmungsaktiven Bakterien nach 5 Std. (grün) und 26 Std. (rot) Inkubation in *S. aureus* Bakteriensuspension im CDC-Biofilmreaktor. Die atmungsaktiven Bakterien wurden durch ihre Umsetzung von CTC zum rot fluoreszierenden Formazan detektiert. Zur Quantifizierung der Oberflächenbedeckung wurde die Software Bioflux 200 verwendet und pro Oberfläche jeweils 10 Bilder mit 200-facher Vergrößerung ausgewertet.

Auf den mit Lysozym und Polymyxin funktionalisierten Oberflächen wurden im Gegensatz dazu nach 26-stündiger Inkubation mehr kultivierbare Bakterien detektiert als auf der nicht funktionalisierten H*Protein B Beschichtung (Tabelle 7). Wie auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen ist (Abbildung 52), lagerten sich die atmungsaktiven Bakterien auf den funktionalisierten Oberflächen im Gegensatz zu den nicht funktionalisierten Oberflächen in Agglomeraten zusammen. Die Bestimmung der Oberflächenbedeckung mit atmungsaktiven Bakterien lässt daher keine direkten Rückschlüsse auf die Anzahl der adhärenierten atmungsaktiven Bakterien zu. Durch die Zusammenlagerung in Agglomeraten kann die prozentuale Oberflächenbedeckung trotz gleicher (oder sogar höherer Zellzahl) niedriger sein als bei einer homogenen Verteilung.

Die mit Lysozym und Polymyxin funktionalisierten Oberflächen zeigten im Vergleich zur nicht funktionalisierten H*Protein B Beschichtung keine antibakterielle Aktivität und damit verbundene Reduktion von kultivierbaren oder atmungsaktiven Bakterien. Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien auf den funktionalisierten Oberflächen war höher

und die Oberflächenbedeckung mit atmungsaktiven Bakterien ähnlich wie auf der nicht funktionalisierten H*Protein B Beschichtung.

2.6.4 Zusammenfassung des Einflusses der mit antimikrobiellen Substanzen funktionalisierten Hydrophobinbeschichtungen auf die Biofilmbildung

Die mit den antimikrobiellen Substanzen Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin funktionalisierten Hydrophobinbeschichtungen wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die bakterielle Biofilmbildung charakterisiert. Eine antibakterielle Aktivität der Lysozym funktionalisierten Oberfläche gegenüber dem Referenzbakterium *M. luteus* konnte nachgewiesen werden. Im statischen System wurde eine verminderte Anlagerung von *S. aureus* Zellen auf den funktionalisierten Oberflächen detektiert. Die angelagerten Bakterien waren jedoch metabolisch aktiv und zeigten eine zu den auf der H*Protein B beschichteten Oberfläche angelagerten Bakterien vergleichbare Atmungsaktivität. Im CDC-Biofilmreaktor kam es unter dem Einfluss von Scherkräften im Gegensatz zum statischen System zu einer vermehrten Bakterienanlagerung auf den funktionalisierten Oberflächen. Auf den mit Lysozym und Polymyxin B funktionalisierten Oberflächen konnten im Vergleich zur H*Protein B beschichteten Oberfläche nach 26-stündiger Inkubation mehr kultivierbare und ähnlich viele atmungsaktive Bakterien nachgewiesen werden. *S. aureus* bildete auf funktionalisierten Oberflächen Makrokolonien und lagerte sich in größeren Agglomerate zusammen. Die antibakterielle Funktionalisierung führte nicht zu einer verminderten Biofilmbildung auf den Oberflächen.

3. DISKUSSION

Hydrophobine sind sehr oberflächenaktive pilzliche Proteine, die weder immunogen noch toxisch wirken. Sie können aus natürlichen Quellen, wie z.B. *S. commune* Kulturen in Milligrammengen in einem zeitaufwändigen Prozess gewonnen werden (Scholtmeijer *et al.* 2011). Der BASF-SE ist es kürzlich gelungen, ein Expressionssystem für Hydrophobine in *E. coli* zu etablieren (Wohlleben *et al.* 2010). Die rekombinante Produktion basiert hierbei auf der Herstellung von zwei Fusionshydrophobinen (H*Protein A und H*Protein B). Diese bestehen aus dem Klasse I Hydrophobin DewA aus *A. nidulans*, der Synthase YaaD aus *B. subtilis* in kompletter bzw. verkürzter Form und einem C-terminalen His-Tag. Der Fusionspartner YaaD war essentiell für die erfolgreiche rekombinante Produktion. Die Fermentation und die anschließende Aufreinigung waren im Kilogramm Maßstab möglich. Die Zusammenlagerung und Grenzflächenaktivität der rekombinant produzierten Hydrophobine H*Protein A und H*Protein B wurden durch den angehängten Fusionspartner nicht beeinträchtigt (Wohlleben *et al.* 2010).

In dieser Arbeit wurden die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B für biomimetische Oberflächenbeschichtungen eingesetzt und im Hinblick auf ihren Einfluss auf das Bakterienwachstum und die Biofilmbildung untersucht. Es wurde zum einen ein Standardprotokoll zur Verwendung der rekombinanten Fusionshydrophobine für (großflächige) Oberflächenbeschichtungen etabliert und die veränderten Oberflächeneigenschaften charakterisiert. Darüber hinaus wurde eine Möglichkeit zur Funktionalisierung der universell einsetzbaren Hydrophobinbeschichtung aufgezeigt und die beschichteten Oberflächen zur Immobilisierung von antibakteriellen Substanzen verwendet. Die modifizierten und funktionalisierten Oberflächen wurden im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Biofilmbildung charakterisiert.

Zuerst wurde der Einfluss der rekombinanten Fusionshydrophobine auf das Bakterienwachstum untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass H*Protein A und H*Protein B antibakterielle Eigenschaften besitzen. Sie wirkten bakteriostatisch gegenüber verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Referenzbakterien und der eukaryotischen Hefe *P. pastoris*. Die minimale Hemmkonzentration, d.h. die Hydrophobinkonzentration, die das Bakterienwachstum inhibiert, lag in Abhängigkeit von der verwendeten Bakterien- bzw. Hefeart, dem Fusionshydrophobin und dem Wachstumsmedium zwischen 0,63 und 5 mg/mL. Die bakteriostatische Wirkung könnte

auf eine Anlagerung der Hydrophobine an die Bakterienzellwand oder in Porenkanäle zurückzuführen sein. Durch diese Anlagerung und die Ausbildung eines stabilen Films verhindern die Hydrophobine essentielle zur Vermehrung notwendige Stoffwechselprozesse. Ihre antibakterielle Wirksamkeit und die für natürliche Hydrophobine beschriebenen Eigenschaften machte die rekombinanten Fusionshydrophobine zu sehr interessanten und vielversprechenden Kandidaten für biomimetische Oberflächenmodifikationen zur Beeinflussung der bakteriellen Biofilmbildung.

Im nächsten Schritt wurde daher der Einsatz von H*Protein A und H*Protein B für großflächige Oberflächenbeschichtungen getestet. Zuerst wurden die qualitativen und quantitativen Adsorptionseigenschaften der Hydrophobine mit Hilfe von QCM-D Messungen bestimmt. Die Adsorption von H*Protein A und H*Protein B an eine SiO₂-beschichtete Sensoroberfläche induzierte eine Dissipationsänderung (ΔD) von 1×10^{-6} bei einer Veränderung der Frequenz (Δf) um 10-12 Hz. Normalerweise verursachen globuläre Proteine ein ΔD von 1×10^{-6} bei einer Frequenzänderung von 20-40 Hz, wenn sie als eine starre Proteinschicht auf der Oberfläche adsorbieren (Hook *et al.* 1998a, 1998b, 1998c; Linder *et al.* 2002). Das Verhältnis von ΔD zu Δf war bei den rekombinanten Fusionshydrophobinen höher und implizierte, dass die Proteine eine eher weiche Schicht auf den hydrophilen SiO₂-Oberflächen bilden. Im Gegensatz dazu bilden natürliche Hydrophobine wie HFBI oder HFBII aus *Trichoderma reesei* auf SiO₂-Oberflächen starre Schichten. Sie verursachen eine Veränderung in der Frequenz von bis zu 75 Hz, während die Dissipationsänderung $1,5 \times 10^{-6}$ nicht übersteigt (Linder *et al.* 2002). Unterschiede in der Steifheit der Proteinschichten der rekombinanten und der natürlichen Hydrophobine könnten auf den Fusionspartner YaaD zurückzuführen sein, der in die Lösung exponiert ist.

Die QCM-D Messungen zeigten, dass die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B effizient auf hydrophilem SiO₂ adsorbieren und 14-17 nm dicke Schichten bilden. Diese Daten stimmten sehr gut mit AFM-Messungen von H*Protein B Schichten überein, in denen eine Schichtdicke von 12 nm bei einer Anlagerung bei 70°C bestimmt werden konnte (Santhiya *et al.* 2010). Darüber hinaus wurde mit Hilfe des viscoelastischen Modells nach Voigt berechnet, dass 14-17 mg der rekombinanten Fusionshydrophobine notwendig sind, um 1 m² zu beschichten. Von den kleineren natürlichen Hydrophobinen HFBI und HFBII (7,5 bzw. 7,2 kDa) sind nur 2,9 bis 4,4 mg notwendig, um 1 m² mit einer Monolage zu beschichten. Dieser Unterschied zwischen den natürlichen und den rekombinanten Hydrophobinen ist auf den Fusionspartner, der 50-80% der Gesamtproteinmasse ausmacht, zurückzuführen.

H*Protein A und H*Protein B lagerten sich auf hydrophilen Glasoberflächen temperatur- und zeitabhängig an und veränderten die Oberflächenhydrophobizität. Es ist bekannt, dass sich natürliche Hydrophobine an Grenzflächen zuerst in einer α -helikalen Übergangsform anlagern. Diese Konformation und der ausgebildete Proteinfilm sind nicht sehr stabil und die Hydrophobine können von den Oberflächen mit verdünnten Deter-

genzien bei Raumtemperatur gelöst werden (De Vocht *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu induzieren Detergenzien bei erhöhten Temperaturen die Umwandlung der Proteinkonformation der Hydrophobine in eine sogenannte β -Faltblatt Endform, die stabil auf den Oberflächen adsorbiert bleibt (Janssen *et al.* 2004). Die Detergenzien und die erhöhte Temperatur verleihen dem Protein Flexibilität und/oder Mobilität und ermöglichen den Übergang in die β -Faltblatt Form (De Vocht *et al.* 2002). Hydrophobine, die in der stabilen β -Faltblatt Konformation auf der Oberfläche angelagert sind, halten Behandlungen mit verdünnten Detergenzien bei Raumtemperatur stand, was darauf hinweist, dass diese Konformation stabiler mit der Oberfläche interagiert als die α -helikale Zwischenform (Janssen *et al.* 2004). Die β -Faltblatt Endform ist aus technologischer Sicht wichtig, da für viele Anwendungen der Hydrophobine eine stabile Interaktion mit der Oberfläche notwendig ist.

Um die postulierte stabile β -Faltblatt Konformation zu induzieren, wurden die Beschichtungen der Fusionshydrophobine auf den Oberflächen mit 2% SDS bei 80°C behandelt. Aufgrund dieser Behandlung gingen Teile der Beschichtung und der korrespondierenden Oberflächenhydrophobizität verloren. Ein partieller Verlust der Hydrophobinschicht aufgrund einer Behandlung mit heißem SDS wurde auch für natürliche Hydrophobine beschrieben. Die Behandlung von Teflon-Oberflächen, die mit den *S. commune* Hydrophobinen SC3 und SC4 bei 20°C beschichtet worden waren, resultierte in einem 21%igen bzw. 28%igen Verlust der Hydrophobinschicht. Bei Beschichtungen, die mit einer Inkubationstemperatur von 80°C durchgeführt worden waren, wurden nur 15% bzw. 7% der Hydrophobine durch die SDS Behandlung abgelöst (Janssen *et al.* 2004). In dieser Arbeit konnte dieses Verhalten auch für die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B mit dem funktionellen Teil DewA aus *A. nidulans* bestätigt werden. Beschichtungen die bei 80°C für 16 Std. durchgeführt worden waren, waren stabil und auch nach der SDS Behandlung noch homogen.

Eine wesentliche Eigenschaft von Hydrophobinen ist ihre Fähigkeit sich in amphiphilen Proteinfilmern an Oberflächen anzulagern und die Oberflächenhydrophobizität zu verändern. Auch andere Proteine wie z.B. Rinder Serum Albumin (engl. bovine serum albumin, BSA) lagern sich an verschiedenen Oberflächen an und verändern die Oberflächenhydrophobizität und die Oberflächenspannung. Nach der Anlagerung von BSA an hydrophobem Teflon sank sowohl die Oberflächenspannung als auch die Oberflächenhydrophobizität. Dahingegen konnte nach der Adsorption von Hydrophobin SC3 aus *S. commune* eine stärkere Abnahme der Oberflächenspannung und eine Zunahme im Kontaktwinkel beobachtet werden (Van der Vegt *et al.* 1996). Auf Glasoberflächen, die mit dem in dieser Arbeit etablierten Standardprotokoll für die rekombinanten Fusionshydrophobine mit BSA für 1, 6 und 16 Std. bei 20°C beschichtet worden waren, wurden Kontaktwinkel von 40-42° gemessen. Im Gegensatz zu den Oberflächenmodifikationen mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen ging die Oberflächenhydrophobizität der BSA beschichteten Oberflächen durch die Behandlung mit 2%

SDS jedoch komplett verloren. Oberflächenbeschichtungen mit anderen Proteinen wie Fibrinogen oder γ -Globulin wurden durch die Behandlung mit heißem SDS ebenfalls komplett von der Oberfläche gelöst (Wösten *et al.* 1994). Ein herausragendes Merkmal der Hydrophobinanlagerungen ist ihre hohe Stabilität. Diese konnte auch für Beschichtungen mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen bestätigt werden. Die Fusionshydrophobinschichten ließen sich nicht durch eine Behandlung mit Puffern, Detergenzien oder Säuren ablösen.

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B assemblierten auf hydrophilen Glasoberflächen und erhöhten den Kontaktwinkel von 11° auf 73° bzw. 71° vor und 71° bzw. 42° nach SDS Behandlung. Auf hydrophilen Oberflächen, die mit natürlichen Hydrophobinen beschichtet worden waren, wurden sehr viel höhere Kontaktwinkel von 113° bis 120° gemessen (Zampieri *et al.* 2010). Kürzlich konnte das Hydrophobin DewA im Pilz *Hypocrea jecorina* als rekombinantes Hydrophobin ohne zusätzliches N-terminales Fusionsprotein exprimiert werden. Die Anlagerung dieses rekombinant exprimierten DewA (10 kDa) wurde auf Glas als hydrophiler Referenzoberfläche getestet. Aufgrund der Hydrophobinbeschichtung erhöhte sich der Kontaktwinkel der Glasoberfläche auf 73° vor und 70° nach SDS Behandlung (Schmoll *et al.* 2010). Diese Daten stimmen sehr gut mit den hier für die Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B bestimmten Werten überein (Kapitel 2.3.2). Die Spanne der Veränderung der Oberflächenhydrophobizität ist eine Spezies-spezifische Eigenschaft der Hydrophobine.

Die Untersuchung der Beschichtungshomogenität mit Immunfluoreszenzmikroskopie und AFM bestätigte die temperatur- und zeitabhängige Anlagerung der Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B. Für eine homogene Beschichtung nach SDS Behandlung (in postulierter β -Faltblatt Konformation) war eine lange Inkubation bei einer erhöhten Temperatur notwendig. REM Aufnahmen von Teflonoberflächen, beschichtet mit den natürlichen Hydrophobinen SC3 und SC4 aus *S. commune*, zeigten ebenfalls einen Einfluss der Beschichtungstemperatur auf die Beschichtungshomogenität (Janssen *et al.* 2004). Bei Oberflächenbeschichtungen, die bei 80°C durchgeführt worden waren, wurde die Oberflächenmorphologie nicht durch eine heiße SDS Behandlung beeinflusst. Dahingegen bildeten sich in Oberflächenbeschichtungen, die bei 20°C durchgeführt worden waren, durch die SDS Behandlung kleine Löcher.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die rekombinanten Fusionshydrophobine sehr gut für großflächige Oberflächenbeschichtungen geeignet sind und darüber hinaus in gelöster Form antibakterielle Eigenschaften aufweisen (Kapitel 2.2). H*Protein A und H*Protein B bildeten auf hydrophilen Ausgangsmaterialien homogene und stabile Proteinlagen und veränderten dadurch die Oberflächenhydrophobizität. Die physikochemischen Eigenschaften eines Materials beeinflussen die Adhäsion von Bakterien an die Oberfläche (Rosenhahn *et al.* 2008). Bisher ist nichts über den Einfluss von biomimetischen Oberflächenmodifikationen mit Hydrophobinen auf

mikrobielle Systeme bekannt. Daher konzentrierte sich diese Arbeit auch auf den Einfluss der Hydrophobinbeschichtung auf die Biofilmbildung in Bezug auf deren Verzögerung, Verhinderung oder Anziehung. Es wurde der Einfluss der Beschichtung mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen auf die primäre bakterielle Adhäsion, frühe und späte Stadien der Biofilmbildung untersucht. Hierzu wurden einzelne Referenzbakterien, aber auch natürliche gemischte Bakterienpopulationen verwendet. Die primäre bakterielle Adhäsion und Linking Film Bildung ist der kritischste Schritt der Biofilmbildung (Busscher und Van der Mei 1997). Die meisten Bakterien innerhalb der Biofilmstruktur verlassen sich auf diese Interaktion zwischen der Oberfläche und den Bakterienzellen für ihr Überleben (Palmer *et al.* 2007). Oberflächeneigenschaften wie Hydrophobizität, Rauigkeit und eine Neigung zur Proteinanlagerung werden als wichtig für die Bakterien angesehen, um eine Oberfläche zu besiedeln (Donlan 2002; Palmer *et al.* 2007). Bisher ist der dominierende Faktor, der an der primären Adhäsion der Bakterien beteiligt ist, jedoch nicht bekannt. Es wird aber angenommen, dass physiko-chemische Wechselwirkungen und hier besonders hydrophobe Interaktionen eine entscheidende Rolle bei der Anhaftung an die Oberflächen spielen (Hood und Zottola 1995). Viele Studien schlagen eine Korrelation zwischen Oberflächenhydrophobizität und Zellanlagerung an Oberflächen vor (Van Loosdrecht *et al.* 1987; Gilbert *et al.* 1991; Peng *et al.* 2001; Iwabuchi *et al.* 2003; Liu *et al.* 2004). Jedoch variiert der spezifische Einfluss der Oberflächenhydrophobizität und anderer Parameter unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (Tang *et al.* 2001), da auch externe Faktoren wie Scherkräfte, Nährstoffzufuhr und der Bakterienstamm an sich einen Einfluss auf die Ergebnisse haben können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Oberflächenhydrophobizität durch die Beschichtung von Glasoberflächen mit rekombinanten Fusionshydrophobinen, die primäre Adhäsion der verschiedenen untersuchten Referenzbakterien teilweise erhöhte, teilweise aber auch verminderte. Dementsprechend zeigten Untersuchungen in der Literatur, dass eine erhöhte Oberflächenhydrophobizität die Adsorption von organischen Molekülen verstärken kann und die bakterielle Adhäsion erhöht (MacEachran und O'Toole 2007). Es wurde auch diskutiert, dass die Anwesenheit von Proteinen auf einer Oberfläche die Biofilmbildung begünstigt, da angelagerte Proteine als Nährstoffquelle für die Bakterien dienen können (Jeong und Frank 1994). Im Gegensatz dazu zeigten *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen in der Mundhöhle, dass Mikroorganismen von hydrophilen Oberflächen verstärkt angezogen werden (Van Pelt *et al.* 1985; Quirynen *et al.* 1989). Der Einfluss der Hydrophobinbeschichtung auf die primäre Adhäsion war abhängig vom untersuchten Bakterienstamm und den Wachstumsbedingungen. Es war keine eindeutige Tendenz detektierbar.

Für die Untersuchung des Einflusses von Hydrophobin-beschichteten Oberflächen auf gemischte ausgereifte Biofilme wurde eine natürliche Abwasserpopulation verwendet. Es wird angenommen, dass durch die Interaktion verschiedener Bakterien Synergien

ausgebildet werden können, die einen Einfluss auf die Biofilmbildung haben (Moons *et al.* 2009). Einige Bakterienspezies besitzen Zelloberflächeneigenschaften wie Fimbrien, Flagellen oder oberflächenassoziierte Polysaccharide oder Proteine, die einen Vorteil in der Besiedlung von Oberflächen mit bestimmten Eigenschaften darstellen können (Donlan 2002). Diese Bakterien können die Anlagerung und das Wachstum von anderen Bakterien im Biofilm unterstützen. In diesem Projekt wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie die gleiche räumliche Verteilung der Biofilme auf Hydrophobin-modifizierten und unmodifizierten Glasoberflächen detektiert. Darüber hinaus konnte auch die gleiche Anzahl an kultivierbaren Bakterien auf den verschiedenen Oberflächen bestimmt werden. Zusätzlich zu den Bindungskräften zwischen den Bakterien und den Oberflächen spielt auch die Selektivität der bakteriellen Adhäsion an Oberflächen eine Rolle in der Biofilmbildung. Busscher *et al.* (1984) konnten zeigen, dass Bakterien mit einer niedrigen Oberflächenenergie am stärksten an Oberflächen mit einer niedrigen Oberflächenenergie adhärten. Wohingegen Bakterien mit einer hohen Oberflächenenergie sich besser an Oberflächen mit einer hohen Oberflächenenergie anlagerten. Darüber hinaus zeigten Weerkamp *et al.* (1989), dass es zu einer Selektion der hydrophoberen Bakterienstämme innerhalb derselben Bakterienspezies bei der Adhäsion an hydrophobe Oberflächen im Vergleich zu hydrophilen Oberflächen kommt. Im Hinblick auf diese Ergebnisse wurde die Populationszusammensetzung der Biofilme auf unmodifizierten und Hydrophobin-modifizierten Oberflächen mit einer molekularbiologischen Fingerabdruck-Methode, der PCR-DGGE, auf der Basis der ribosomalen DNA untersucht. Mit dieser Technik konnte keine Selektion von verschiedenen Subpopulationen identifiziert werden. Die Oberflächenhydrophobizität hatte hier keinen Einfluss auf die Biofilmbildung einzelner Bakterien innerhalb der gemischten Abwasserpopulation.

Zusammenfassend kann zum Einfluss der biomimetischen Oberflächenmodifikationen mit H*Protein A und H*Protein B auf das mikrobielle Biofilmwachstum festgehalten werden, dass die Beschichtungen an sich und die Veränderung der Oberflächeneigenschaften, wie der Oberflächenhydrophobizität, nur einen geringen Einfluss auf die primäre Adhäsion von einzelnen Referenzbakterien unter Laborbedingungen hatten. Abhängig von der Bakterienart und dem Wachstumsmedium führten die Oberflächenbeschichtung zu einer verstärkten oder verminderten primären Adhäsion und frühen Biofilmbildung. Gemischte Abwasserpopulationen adhärten verstärkt auf Hydrophobin-beschichteten Oberflächen; dieser Effekt wirkte sich jedoch nicht auf die weitere Entwicklung des Biofilms aus. In ausgereiften Abwasserbiofilmen konnten keine Unterschiede in der Biofilmstruktur, der Anzahl der kultivierbaren Bakterien oder der Populationszusammensetzung detektiert werden. Die in Lösung festgestellte antibakterielle Aktivität der rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B konnte in gebundenem Zustand, d.h. bei den Hydrophobin-beschichteten Oberflächen, nicht detektiert werden.

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B sind sehr gut für großflächige biomimetische Oberflächenbeschichtungen verschiedener Materialien geeignet. Die positiven Eigenschaften der rekombinanten Fusionshydrophobine, wie das effektive Self-Assembly Verhalten und die Ausbildung stabiler Proteinschichten, können weiterführend ausgenutzt und die Proteinschichten als universelle Grundlage für spezifische Funktionalisierungen eingesetzt werden. Im nächsten Schritt wurde daher der Einsatz von Hydrophobin-beschichteten Oberflächen zur Immobilisierung von antimikrobiellen Substanzen getestet. Die Verwendung einer Hydrophobinbeschichtung zur Immobilisierung von unterschiedlichen Substanzen macht die Oberflächenfunktionalisierung unabhängig von den auf den Ausgangsmaterialien vorhandenen funktionellen Gruppen. Durch die anwendungsorientierte Funktionalisierung kann eine spezifische Manipulation des Biofilmwachstums eingeführt und gleichzeitig ein breites Anwendungsspektrum abgedeckt werden.

Die Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung mit verschiedenen antimikrobiellen Substanzen wurde über eine Streptavidin Brücke durchgeführt. Streptavidin wurde als Haftvermittler für die Bindung von Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin eingesetzt. Die Funktionalisierung wurde schrittweise aufgebaut. Zuerst wurde die Hydrophobinbeschichtung biotinyliert, anschließend über Self-Assembly eine Streptavidin-Monolage auf dieser Oberfläche generiert und als letzter Schritt die biotinylierten antimikrobiellen Substanzen gebunden. Durch diesen Ansatz ist es möglich, in Zukunft unterschiedliche Substanzen auf den Hydrophobin-beschichteten Oberflächen zu immobilisieren. Die einzelnen Schritte der sequentiellen Funktionalisierung konnten erfolgreich immunologisch bzw. fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen und online mit der Quarzkristall-Mikrowaage detektiert werden.

Eine antibakterielle Aktivität der Lysozym funktionalisierten Oberfläche gegenüber dem Referenzbakterium *M. luteus* konnte nachgewiesen werden. Bei Vancomycin funktionalisierten Oberflächen konnte jedoch keine antimikrobielle Wirkung gegenüber *S. aureus* detektiert werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass eine zu geringe Menge Vancomycin pro Flächeneinheit stabil auf der Hydrophobinbeschichtung immobilisiert worden ist, um *S. aureus* effektiv abzutöten. Zum anderen kann durch die Biotinylierung, d.h. die Anbindung von Biotin an funktionelle Gruppen der antimikrobiellen Substanzen, ihre Wirksamkeit verändert und auch beeinträchtigt werden. Darüberhinaus könnte die Effektivität der antimikrobiellen Substanzen auch durch die Immobilisierung gehemmt werden.

Im statischen System wurde nach 3- und 44-stündiger Inkubation eine verminderte Anlagerung von *S. aureus* Zellen auf den unterschiedlichen antimikrobiell funktionalisierten Oberflächen im Vergleich zu nicht funktionalisierten Oberflächen detektiert. Die angelagerten Bakterien waren jedoch metabolisch aktiv und die Umsetzung von Resazurin zu Resorufin als einem Indikator der Atmungsaktivität konnte detektiert werden.

Die relative Fluoreszenzintensität des umgesetzten Resorufins war nach 44-stündiger Inkubation in allen untersuchten Proben trotz einer unterschiedlichen Anzahl an adhärenierten Bakterien auf den funktionalisierten und nicht funktionalisierten Oberflächen ähnlich. Anhand der Fluoreszenzintensität des Resorufins lässt sich jedoch nicht auf die Anzahl an atmungsaktiven und damit lebenden Bakterienzellen rückschließen. Durch eine Limitierung des Nährstoffangebotes kommt es in schnellwachsenden, großen Bakterienpopulationen häufig zu einer Verzögerung der wachstumsbedingten Stoffwechselprozesse und damit auch der Umsetzung von Reszurin. So kann es vorkommen, dass in Kavitäten mit einer hohen Anzahl an lebenden, aber nicht sehr aktiven Zellen eine sehr viel geringere Menge an Resorufin gebildet wird, als in einer sehr kleinen schnell wachsenden Population. Die Umsetzung des Resazurins erfolgt zudem über einen Zeitraum von 3 Std. und gibt daher keine Momentaufnahme sondern einen Prozess wieder. Anhand der detektierten Atmungsaktivität kann hier keine quantitative Aussage über eine mögliche Abtötung von adhärenierten Bakterien auf den antimikrobiell funktionalisierten Oberflächen getroffen werden. Für einen genaueren Vergleich der Anzahl an lebenden Bakterien auf funktionalisierten und nicht funktionalisierten Oberflächen müssen in folgenden Untersuchungen weitere Methoden herangezogen werden.

Im CDC-Biofilmreaktor kam es unter dem Einfluss von Scherkräften im Gegensatz zum statischen System zu einer vermehrten Anlagerung von *S. aureus* auf den funktionalisierten Oberflächen. Dies kann an den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (statisch im Vergleich zu Scherkräften) und/oder dem verwendeten Wachstumsmedium (MH im Vergleich zu BHI) liegen. Auf den mit Lysozym und Polymyxin B funktionalisierten Oberflächen konnten im Vergleich zur H*Protein B beschichteten Oberfläche nach einer 26-stündigen Inkubation mehr kultivierbare und ähnlich viele atmungsaktive Bakterien nachgewiesen werden. Die antibakterielle Funktionalisierung führte nicht zu einer verminderten, sondern einer verstärkten Biofilmbildung auf den Oberflächen. *S. aureus* bildete auf den funktionalisierten Oberflächen Makrokolonien und lagerte sich in größeren Agglomeraten zusammen. Dies kann auf eine punktuelle Wirksamkeit der immobilisierten antimikrobiellen Substanzen zurückzuführen sein. Die ersten Bakterien, die auf der Oberfläche adhärenieren, werden durch die antimikrobiellen Substanzen abgetötet und bilden, da sie auf der Oberfläche verbleiben, einen Anlagerungspunkt für nachfolgende Bakterien. Terada *et al.* (2011) beschreibt ebenfalls diesen Effekt der verstärkten Biofilmbildung auf bakteriziden Oberflächen. Die Rolle dieses „Conditioning Films“ ist Gegenstand nachfolgender Untersuchungen.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Herstellung von Hydrophobinlösungen

Die BASF-SE hat kürzlich ein Verfahren zur Expression von Hydrophobinen etabliert, das die biotechnologische Produktion dieser amphiphilen Proteine im Kilogramm Maßstab ermöglicht. Hierbei werden die Hydrophobine als Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B bestehen aus dem Klasse I Hydrophobin DewA aus *A. nidulans*, dem N-terminalen Fusionsprotein YaaD aus *B. subtilis* in kompletter bzw. verkürzter Form und einem C-terminalen His-Tag (Wohlleben *et al.* 2010) (Abbildung 11). Während der rekombinanten Expression werden die Fusionshydrophobine durch den Fusionspartner in die Einschlusskörper geleitet. Nach der Fermentation und dem Zellaufschluss werden die Einschlusskörper durch Zentrifugation separiert und die Proteine durch Zugabe von Natriumhydroxid gelöst. Nach einer Neutralisation der Proteinlösung werden die Fusionshydrophobine durch erneute Zentrifugation abgetrennt und anschließend sprühgetrocknet.

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B wurden von der BASF-SE für diese Arbeit in sprühgetrockneter Form zur Verfügung gestellt.

Hydrophobin Lösungen wurden für jedes Experiment frisch angesetzt. Zur Herstellung einer 20-fach konzentrierten Proteinstocklösung (200 μ M; H*Protein A 9,2 mg/mL; H*Protein B 3,8 mg/mL) wurden die Hydrophobine H*Protein A und H*Protein B bei Raumtemperatur unter starkem Rühren für 2 Std. in H₂O dest. gelöst. Ausgehend von dieser Stocklösung wurden für die Beschichtungen Proteinlösungen mit einer Konzentration von 10 μ M in Beschichtungspuffer (50 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 8,0) hergestellt.

4.2 Physikalisch-chemische Oberflächenanalytik

4.2.1 Oberflächenbeschichtung mit rekombinanten Fusionshydrophobinen

Die Beschichtung wurde in Anlehnung an Janssen *et al.* (2004) durchgeführt. Zur Etablierung des Standardbeschichtungsprotokolls wurden Glasoberflächen (Kalk-Natron-Silikat Glas, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Diese

wurden mit 60% Ethanol gereinigt und für 1, 6 oder 16 Std. bei 20°C oder 80°C in der Hydrophobinlösung inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen dreimal für 10 min. mit H₂O dest. gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Charakterisierung der Stabilität der Hydrophobinbeschichtung und Induktion der stabilen β -Faltblatt Endform wurden die beschichteten Oberflächen für 10 min. mit 2% SDS-Lösung bei 80°C behandelt. Schließlich wurden die modifizierten Oberflächen erneut wie oben beschrieben gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Oberflächenbeschichtungen mit H*Protein A und H*Protein B von Glas- und Teflonoberflächen, Keramikmaterialien, QCM-D Sensorchips und Mikrotiterplatten wurden nach dem in dieser Arbeit etablierten Standardprotokoll für 16 Std. bei 80°C durchgeführt.

4.2.2 Statische Kontaktwinkelmessung

Hydrophobine lagern sich in amphipatischen Filmen an Grenzflächen an und verändern dadurch die Oberflächenbenetzbarkeit der Materialien. Die Benetzbarkeit von Festkörperoberflächen durch flüssige Tropfen hängt von der Oberflächenspannungen der festen (γ_s) und flüssigen Phase (γ_l) und von der Grenzflächenspannung (γ_{ls}) zwischen beiden ab. Am Rand eines aufsitzenden bzw. liegenden Tropfens (Abbildung 54) befindet sich ein Dreiphasenpunkt, an dem Feststoff, Flüssigkeit und Gasphase zusammentreffen. Der Kontaktwinkel θ (Randwinkel, Benetzungswinkel) des Tropfens stellt sich nach der Young-Gleichung gemäß dem Kräftegleichgewicht ein (Kwok und Neumann 1999).

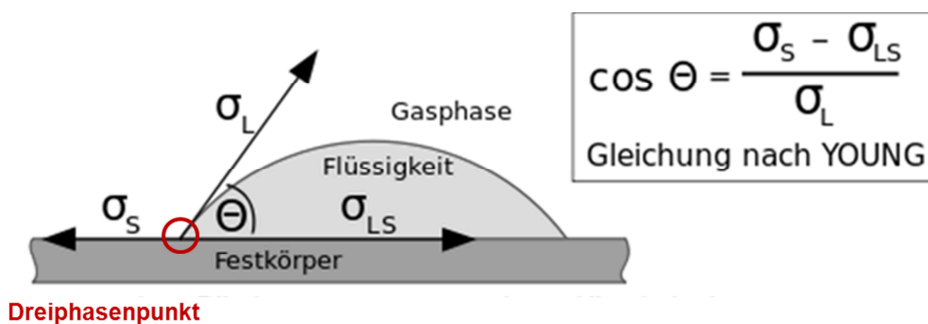


Abbildung 54. Liegender Tropfen auf einer festen Oberfläche: Kontaktwinkel θ und Vektoren für die Oberflächenspannungen des Substrats (γ_s) und der Flüssigkeit (γ_l) und der Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Festkörper (γ_{ls}). Der Kontaktwinkel stellt sich nach der Young-Gleichung gemäß dem Kräftegleichgewicht ein. (Abbildung verändert nach Viel 2007).

In dieser Arbeit wurden alle Kontaktwinkel mit H₂O dest. bestimmt. Wasser hat eine hohe Oberflächenspannung, die gut zu vermessende Tropfenkonturen gewährleistet. Diese entstehen nur, wenn die Oberflächenspannung der Flüssigkeit die des Substrats übertrifft.

Die Oberflächenhydrophobizität der unterschiedlichen Materialien wurde jeweils vor und nach der Beschichtung mit den rekombinanten Fusionshydrophobinen bei Raumtemperatur mit einem optischen Kontaktwinkelmessgerät (DSA 100, Krüss, Hamburg, Deutschland) mit der Sessile-Drop Methode bestimmt (Van der Mei *et al.* 1991). Hierzu wurde die Kontur eines 5 μL H_2O dest. Tropfens auf der Oberflächen mit Hilfe der geräteinternen Software (DSA 3, Krüss) abgebildet und der Kontaktwinkel nach der Young-Gleichung berechnet.

Die Kontaktwinkel wurden durch Mittelwertbildung aus mindestens fünf unabhängigen Messungen auf zwei unabhängig beschichteten Oberflächen bestimmt.

4.2.3 Untersuchung der Oberflächenmorphologie

Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy, AFM*)

Bei AFM-Aufnahmen tastet eine kleine Nadel, die an einer Blattfeder, dem sogenannten Cantilever, befestigt ist, mechanisch in einem definierten Raster die Oberfläche ab (Abbildung 55). Durch die Oberflächenstruktur der Probe biegt sich hierbei die Blattfeder positionsabhängig unterschiedlich weit. Durch das punktweise Aufzeichnen dieser Auslenkungen mit Hilfe eines Lasers lässt sich eine Abbildung der Probenoberfläche erzeugen.

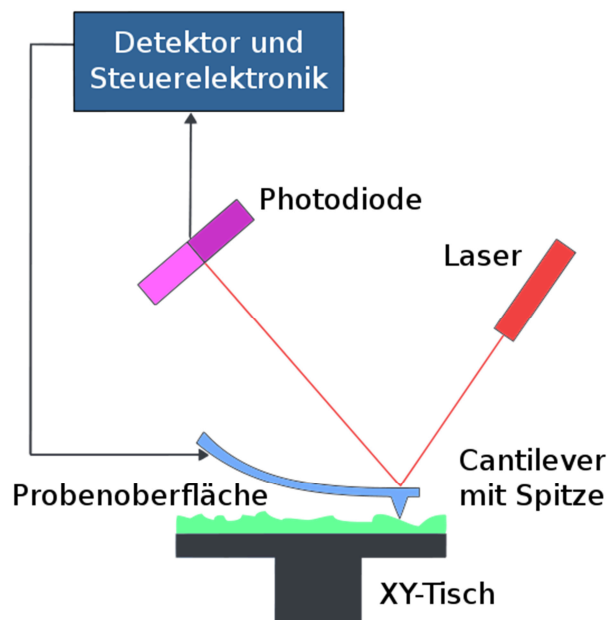


Abbildung 55. Schematische Darstellung der Funktionsweise eines AFM. Mit einem Cantilever wird die Probenoberfläche systematisch mechanisch abgetastet. Die entsprechend der Probenoberfläche entstehende Auslenkung des Cantilevers wird durch die Ablenkung eines Laserstrahls mit Hilfe einer Photodiode detektiert und zu einem Digitalfoto verarbeitet. (Abbildung verändert nach Slizskaia-Boxerman 2011).

AFM-Aufnahmen von Hydrophobin-modifizierten Glas- und Teflonoberflächen wurden mit einem MFP-3D BioAFM (Asylum Research, Mannheim, Deutschland) mit einem Si_3N_4 Cantilever mit einer Federkonstante von 0,6 N/m an Luft gemacht. Das Mikroskop wurde im AC-Modus (Tapping Modus) betrieben und die Spitze des Cantilevers tastete die Oberfläche in einem Scan-Bereich von 5 μm und 1 μm mit einem Winkel von 0° gegenüber der horizontalen Linie ab. Das AFM wurde mit einem 5 μm z-Range und einem 150 μm x- und y-Range Scanner betrieben. Die Aufnahmen wurden mittels des Programms IGOR Pro (Asylum Research) ausgewertet.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Bei REM-Aufnahmen wird die Oberfläche der Probe mit einem fokussierten Elektronenstrahl abgetastet. Die gestreuten Primär- bzw. emittierten Sekundärelektronen werden detektiert und zu einem orts aufgelösten Bild verarbeitet.

Zur Analyse der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen wurden diese, um elektrisch leitfähige Proben zu erhalten, mit einer dünnen Graphitschicht besputtert. Die Messungen wurden mit dem Leo Gemini 1530 REM (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt und mit der Software V03.01d ausgewertet.

4.2.4 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)

IRRAS ist eine Methode zur Untersuchung und Charakterisierung von dünnen Proteinschichten auf Oberflächen. Bei dieser Form der Schwingungsspektroskopie werden Molekülschwingungen durch Infrarot-Strahlung angeregt. Im Gegensatz zur konventionellen IR-Spektroskopie wird bei IRRAS nicht in Transmission, sondern in Reflexion gemessen: die Infrarot-Strahlung trifft in streifendem Einfall auf eine Substratoberfläche, auf der sich die zu untersuchende Schicht befindet, und wird von dort in Richtung Detektor reflektiert. Hierbei wird ein Teil der Strahlung spezifisch durch die Molekülschwingungen absorbiert. IRRAS liefert zerstörungsfrei Informationen zu schwingungsspezifischen Gruppen und Strukturelementen von Oberflächen und es können Aussagen zum Ordnungsgrad und zum chemischen Zustand der Moleküle auf der Oberfläche getroffen werden. Das Substrat muss eine hohe Reflektivität besitzen, daher werden meist Metalle wie z.B. Gold eingesetzt.

Für IRRAS-Messungen wurden Goldoberflächen für 16 Std. bei 80°C mit H*Protein A und H*Protein B beschichtet. Die Messungen wurden mit einem Equinox 55 S (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt.

4.2.5 Quarzkristall-Mikrowaage (engl. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D))

Die Quarzkristall-Mikrowaage wird seit vielen Jahren als hochsensibler Massedetektor besonders in der Umwelt- und Prozessanalytik eingesetzt. QCM-D Messungen ermöglichen ohne zusätzliche Markierungsschritte die Echtzeitmessung von molekularen Adsorptions- und/oder Interaktionsprozesse von z.B. Proteinen auf verschiedenen Oberflächen wie Metallen, Polymeren oder funktionalisierten Oberflächen. Als Messprinzip wird die Änderung der Schwingungseigenschaften von oszillierenden Quarzsensoren durch eine Masseanlagerung an der Quarzoberfläche genutzt. Neben der adsorbierten Masse, gemessen als Änderungen in der Resonanzfrequenz (Δf), geben Änderungen in der Dissipation (ΔD , Dämpfung) Einblick in strukturelle (viskoelastische) Eigenschaften der adsorbierten Filme. Es lassen sich verschiedenste Informationen zu z.B. Masse, Schichtdicke und Struktur erhalten.

Durch die Adsorption von Molekülen an die Oberfläche des Quarzsensors sinkt die Resonanzfrequenz. Die Dissipation ist die Zeit, die der oszillierende Schwingquarz nach der Anregung benötigt, um wieder in Ruhe zu kommen; je weicher die adsorbierte Moleküllage, desto größer ist die resultierende Dissipationsänderung. Der Zusammenhang der QCM-D Signale und der Eigenschaften des adsorbierten Films ist schematisch in Abbildung 56 dargestellt.

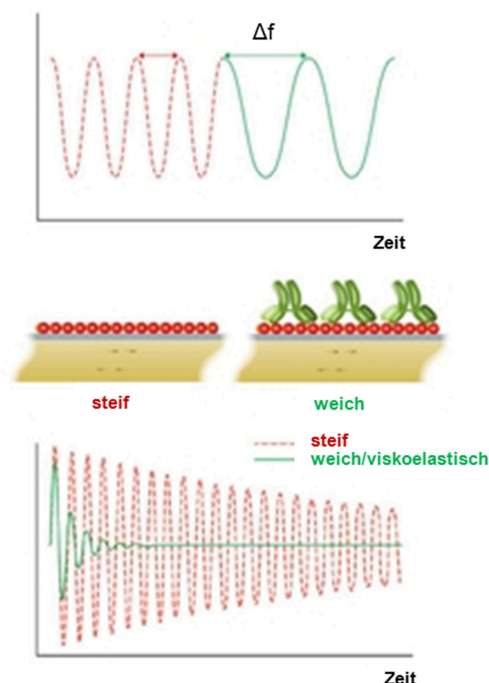


Abbildung 56. Schematische Darstellung der QCM-D Signale für steife (rot) und weiche (grün) Filme. Durch die Anlagerung von Molekülen an die Oberfläche des Schwingquarzes ändert sich die Resonanzfrequenz (obere Abbildung). Bei weichen Molekülfilmen stoppt die Oszillation des Quarzkristalls nach der Anregung sehr schnell. Die Dissipationsänderung ist höher als bei steifen Filmen (untere Abbildung). (Abbildung verändert nach Slizskaia-Boxerman 2011).

Ein Q-Sense E4 Instrument (LOT-Oriel, Darmstadt, Deutschland) mit vier parallelen Flusszellen wurde für die Analyse des Adsorptionsverhaltens von H*Protein A und H*Protein B auf SiO₂-beschichteten Quarzsensoren (QSX 303, LOT-Oriel) verwendet. Laut Herstellerangaben misst das Gerät die Resonanzfrequenz mit einer Genauigkeit <0,1 ppm. Das entspricht einer Massenempfindlichkeit in Wasser (25°C) von 0,5 ng/cm².

Die Veränderung in der Frequenz (Δf) und der Dissipation (ΔD) wurde als eine Funktion der Zeit während der Messung mit der Software QSoft 401 (Version 2.5.8.527) aufgenommen. Die Quarzsensoren wurden direkt vor Gebrauch in einer UV-Ozon Kammer (UV/Ozone Pro Cleaner, BioForce Nanosciences, Ames, USA) für 20 min. gereinigt. Alle Experimente wurden mit einer konstanten Flussrate von 50 μ L/min bei 20°C durchgeführt. Messungen zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der Hydrophobine wurden mit einer Basislinie, die der Beladung des Kristalls mit Beschichtungspuffer (50 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 8,0) entspricht, durchgeführt. Die Hydrophobinadsorption wurde für bis zu 16 Std. beobachtet, bevor die Kristalle mit Beschichtungspuffer gespült wurden.

QCM-D Messungen zur online-Detektion der sequentiellen Funktionalisierung wurden mit PBS-Puffer als Basislinie durchgeführt. Mindestens drei unabhängige Wiederholungen wurden für jeden experimentellen Ansatz durchgeführt.

Zur Datenauswertung wurde die QTools Software (Version 3.0.11.512) verwendet. Sauerbrey zeigte bereits 1959 (Sauerbrey 1959) in der Theorie und Praxis, dass die Frequenzänderung des oszillierenden Quarzkristalls proportional zu der darauf adsorbierten Masse ist. Das von Sauerbrey beschriebene Verhältnis erlaubt eine sehr gute Abschätzung der auf der Sensoroberfläche adsorbierten Masse bzw. Schichtdicke, solange die Dissipation relativ niedrig ist. Wenn die Veränderung der Dissipation höher ist als 1×10^{-6} bei einer Änderung der Frequenz von 10 Hz, ist der ausgebildete Film weich, und die von der Oberfläche entfernteren Regionen der Moleküllage tragen nicht zur Oszillation des Sensors bei. Das Sauerbrey-Verhältnis, das direkt aus der Frequenzänderung die angelagerte Masse bestimmt, würde in diesem Fall die Masse und die Schichtdicke unterschätzen. Durch die Messung der Frequenz- und Dissipationsänderungen bei verschiedenen Obertönen ist es möglich, mit Hilfe des viscoelastischen Modells nach Voigt die korrekte Masse und Schichtdicke mit der QTools Software zu bestimmen.

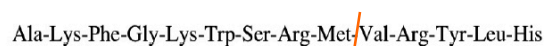
4.3 Proteinbiochemische Untersuchungen

4.3.1 Bromcyanspaltung der Fusionshydrophobine

Zur Spaltung der rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B wurde die Bromcyanspaltung verwendet. Hierbei wird die Peptidkette der Proteine an der C-terminalen Seite der Aminosäure Methionin gespalten (Abbildung 57).

Cyanogenbromid greift am Schwefel von Methionin an und unter Abspaltung von Methylthiocyanat entsteht ein Imidolactonderivat, das hydrolytisch gespalten wird. Die vorliegenden Fusionshydrophobine sollten bei dieser Spaltung aufgrund ihrer Aminosäuresequenz mehrfach im Bereich des Fusionspartners, jedoch nicht im Bereich des Hydrophobins, geschnitten werden, so dass nach der Spaltung „reines“ DewA (DewA-His) vorliegt.

Die Bromcyanspaltung wurde nach einem Protokoll der BASF-SE (C. Bollschweiler, mündliche Überlieferung) durchgeführt. 50 mg H*Protein A bzw. H*Protein B wurden in 7,5 mL 70% Ameisensäure gelöst. Nach Zugabe von zwei Mikrospateln Cyanogenbromid (10-30 mg) wurden die Proben unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für 4 Std. inkubiert. Die Neutralisation der Proben auf pH 6,5- 7,0 erfolgte durch langsame Zugabe von 15 M NaOH unter Schütteln auf Eis. Nach der Bromcyanspaltung wurden die Spaltprodukte über Nacht gegen H₂O dest. dialysiert (Zellutrans Dialysiermembran, MWCO 4000-6000, Roth, Karlsruhe), um kleine durch die Spaltung entstandene Polypeptide abzutrennen, und durch eine Umpufferung störende Lösungsmittel zu entfernen. Anschließend wurden die gespaltenen Fusionshydrophobine gefriergetrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.



Spaltung durch Cyanogenbromid

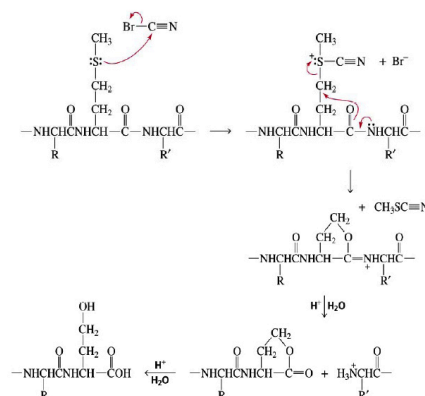


Abbildung 57. Schematische Darstellung der Bromcyanspaltung. Cyanogenbromid führt zur Hydrolyse der Amidbindung an der C-terminalen Seite eines Methioninrestes und damit zur Spaltung der Peptidkette der Proteine.

4.3.2 Aufreinigung der Fusionshydrophobine über Affinitätschromatographie

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B besitzen einen C-terminalen His-Tag. Bei der Bromcyanspaltung wurde aufgrund der Aminosäuresequenz nur der N-terminale Fusionspartner gespalten. Der His-Tag konnte daher für die spezifische Aufreinigung der gespaltenen Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B und die Entfernung größerer Spaltprodukte mittels Affinitätschromatographie verwendet werden.

Die gefriergetrockneten Spaltprodukte wurden in Phosphat-Puffer (20 mM Phosphat-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 7,4) gelöst und 1 Std. mit Nickel-NTA (GE Healthcare, München, Deutschland), das vorher im selben Puffer äquilibriert worden war, unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Suspension wurde in eine 3 mL Leersäule gegeben. Das Säulenmaterial wurde zweimal mit 4 mL Waschpuffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, 50 mM Imidazol, pH 6,3) gewaschen. Anschließend wurde das gebundene Protein mit 0,5 mL Elutionspuffer I (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, 300 mM Imidazol, pH 5,5) und Elutionspuffer II (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, 500 mM Imidazol, pH 4,5) eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und die Bromcyanspaltung und anschließende Aufreinigung mit einer SDS-PAGE kontrolliert.

4.3.3 Auftrennung der Hydrophobine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch eine Gelelektrophorese können Makromoleküle, wie Proteine, auf der Basis ihrer Wanderungsgeschwindigkeit durch ein Gel unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Hierbei wandert jedes Molekül seiner Ladung entsprechend zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Um bei allen Proteinen ein gleiches Ladungs-Masse-Verhältnis und somit eine Auftrennung nach der molekularen Masse zu erreichen, verwendet man das Detergenz SDS. SDS besitzt eine negativ geladene Sulfonsäure-Gruppe sowie einen aliphatischen C12-Rest und bindet an Proteine entweder über hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen. Die Anlagerung von 1 Molekül SDS pro 2 Aminosäuren bedingt bei allen Proteinen ein identisches Ladungs-Masse-Verhältnis. Bei angelegter Spannung wandern die negativ geladenen Proteine innerhalb des Gels in Richtung Plus-Pol (Anode) und trennen sich dabei nach der Größe auf.

Aufgrund der Eigenschaften der Hydrophobine, wie der durch Disulfidbrücken stabilisierte Tertiärstruktur und der stabilen Anlagerung an Oberflächen und Grenzflächen, mussten die SDS-PAGE Bedingungen optimiert werden, um eine Auftrennung der rekombinanten Fusionshydrophobine zu ermöglichen. Zur Spaltung der Disulfidbrücken wurden hohe Konzentrationen Reduktionsmittel (Dithiothreitol, DTT) verwendet, und die Denaturierung der Proteine, d.h. die Reduktion der Disulfidbrücken und die Anlagerung

von SDS, erfolgte nicht wie üblich bei 95°C, sondern bei 60°C, um ein Ausfallen der Proteine zu verhindern.

Die SDS-Gele bestanden aus einem 18% Trenngel (für 10 mL: 4,5 mL Acrylamid/Bis-Lösung 37.5:1 (40% w/v), 3,1 mL 1,5 M Tris pH 8,8, 2,2 mL H₂O dest., 62,5 µL 20% SDS, 125 µL 10 % APS, 12,5 µL TEMED) und einem 4% Sammelgel (für 5 mL: 0,5 mL Acrylamid/Bis-Lösung 37.5:1 (40%w/v), 1,25 mL 1 M Tris pH 6,8, 3,16 mL H₂O dest., 25 µL 20% SDS, 50 µL 10% APS, 7,5 µL TEMED). Nachdem die Gele auspolymerisiert waren, wurden diese in die Elektrophoresekammer, welche mit Reservoirpuffer (für 1 L: 145 g Glycin, 29 g Tris Base, 10 g SDS) gefüllt war, eingesetzt. Die Proben (1-14 µL) wurden mit 4 µL optimiertem Laemmliprobenpuffer (5-fach konzentriert: 25% Glycerin, 10% SDS, 55 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0,5% Bromphenolblau, 5 mM EDTA) und 2 µL DTT (10-fach konzentriert: 1 M) versetzt und mit H₂O dest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µL aufgefüllt. Die Proben wurden zur Denaturierung der Proteine für 10 min. bei 60°C inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden 7 µL Marker (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 1 Std. bei 150 V.

Zur Visualisierung der Proteinauftrennung wurden die Polyacrylamidgele für 30 min. bei Raumtemperatur mit Coomassie Brilliant Blue Färbelösung (46 mL Ethanol, 0,25g Coomassie G250, 8 mL Eisessig, auffüllllen auf 100 mL mit H₂O dest.) gefärbt. Die anschließende Inkubation in Entfärber-Lösung (30 mL Methanol, 7 mL Eisessig, auffüllen auf 100 mL mit H₂O dest.) machte die Banden im Gel sichtbar.

4.3.4 Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung

Die rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B bilden auf unterschiedlichen Oberflächen homogene und stabile Proteinschichten. Eine spezifische Funktionalisierung dieser Proteinschichten ist möglich, um den Einfluss auf die bakterielle Biofilmbildung zu verändern.

Zur spezifischen Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung wurde Streptavidin als Haftvermittler für die Bindung verschiedener antimikrobieller Substanzen eingesetzt. Zuerst wurde die Hydrophobinbeschichtung biotinyliert und anschließend über Self-Assembly eine Streptavidin-Monolage auf dieser Oberfläche generiert. Zur Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung wurden anschließend die antimikrobiellen Substanzen Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin mit Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert und über Streptavidin auf den Oberflächen immobilisiert.

Biotinylierung der antimikrobiellen Substanzen und der Hydrophobinbeschichtung

Die Biotinylierung der antimikrobiellen Substanzen und der Hydrophobinbeschichtung wurde mit Sulfo-NHS-Biotin (443,43 Da, Spacer 13,5 Å; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Direkt vor der Verwendung wurde eine 10 mM Sulfo-NHS-Biotin Stocklösung in LiChroSolv PCR Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland) hergestellt (2,2 mg Sulfo-NHS-Biotin in 500 µL PCR H₂O). Die antimikrobiellen Substanzen wurden in PBS-Puffer (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,8 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,24 g KH₂PO₄, auffüllen auf 1 Liter mit H₂O dest., pH 7,6) in einer Konzentration von 2 mg/mL (0,28 µM, Lysozym) bzw. 1 mg/mL (0,69 µM, Polymyxin B und Vancomycin) gelöst. Die Biotinylierung der antimikrobiellen Substanzen wurde mit einem 20-fachen molaren Überschuss an Sulfo-NHS-Biotin durchgeführt, was laut Herstellerangaben zu einer Bindung von 4-6 Biotin-Gruppen pro Molekül führt. Die antimikrobiellen Substanzen wurden zusammen mit der entsprechenden Menge Sulfo-NHS-Biotin Stocklösung unter leichtem Schwenken für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Zeba Desalt Spin Columns (5 mL, 7kMWCO, Thermo Scientific) bzw. durch Dialyse aufgereinigt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Biotinylierung der Hydrophobinbeschichtung, dem ersten Schritt im sequentiellen Aufbau der Funktionalisierung, wurde die 10 mM Biotin-Stocklösung mit PBS 1:10 verdünnt (Endkonzentration 1 mM). Die Hydrophobin-beschichteten Oberflächen wurden für 2 Std. bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken in der Biotin-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen zweimal 5 min. mit PBS-Puffer mit 100 mM Glycin und einmal 5 min. in PBS-Puffer gewaschen, um die Biotinylierungsreaktion zu beenden und überschüssiges Biotin und entstandene Nebenprodukte zu entfernen. Die Oberflächen wurden kurzzeitig bei 4°C in PBS gelagert oder sofort verwendet.

Bindung von Streptavidin

Der nächste Schritt im schrittweisen Aufbau der Funktionalisierung auf der Hydrophobin-beschichteten Oberfläche, war die Bindung von Streptavidin. Eine 1 mg/mL Streptavidin Stocklösung (ultrapure, AppliChem) wurde in Phosphat-Puffer (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,4) angesetzt und bei 4°C gelagert. Zur Streptavidin-Bindung wurde die Stocklösung 1:40 in PBS-Puffer verdünnt (Endkonzentration 25 µg/mL, 0,4 µM) und die biotinylierten Hydrophobin-beschichteten Oberflächen in dieser Lösung für 2 Std. bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen dreimal 5 min. mit PBS-Puffer gewaschen und kurzzeitig bei 4°C in PBS gelagert oder sofort verwendet.

Bindung der antimikrobiellen Substanzen

Der dritte Schritt im sequentiellen Aufbau der Funktionalisierung war die Immobilisierung der biotinylierten antimikrobiellen Substanzen auf der Biotin-Streptavidin modifizierten Hydrophobinbeschichtung. Nach der Aufreinigung der biotinylierten antimikrobiellen Substanzen durch Zeba Desalt Spin Columns bzw. Dialyse wurden diese 1:5 in PBS-Puffer verdünnt. Die modifizierten Oberflächen wurden für 2 Std. bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken mit den antimikrobiellen Substanzen inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen dreimal 5 min. mit PBS-Puffer gewaschen, um physisorbierte Proteine zu entfernen. Die funktionalisierten Oberflächen wurden für kurze Zeit bei 4°C in PBS gelagert oder sofort für weitere Untersuchungen eingesetzt.

4.3.5 Kontrolle der Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung

Der schrittweise Aufbau der Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung wurde zum einen online mit QCM-D Messungen (Kapitel 2.2.5) verfolgt, zum anderen wurden die einzelnen Schritte immunologisch bzw. mikroskopisch kontrolliert.

Die erfolgreiche Biotinylierung der Hydrophobinbeschichtung wurde immunologisch mit Anti-Biotin Antikörpern kontrolliert (Kapitel 2.4.1). Für die Kontrolle der Streptavidin-Bindung wurde mit Alexa Fluor 488 markiertes Streptavidin (Invitrogen) eingesetzt. Die Oberflächen wurden, wie bereits beschrieben, für 2 Std. bei Raumtemperatur in einer 25 µg/mL Streptavidin-Lösung inkubiert und anschließend dreimal 5 min. mit PBS-Puffer gewaschen. Die mikroskopische Kontrolle der Oberflächen erfolgte mit einem Axioplan 2 Imaging Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Der letzte Schritt der Funktionalisierung, die Immobilisierung der antimikrobiellen Substanzen, wurde beispielhaft an der Bindung von Lysozym kontrolliert. Die erfolgreiche Lysozymbindung wurde ebenfalls immunologisch mit Anti-Lysozym Antikörpern nachgewiesen.

4.3.6 Quantifizierung der Biotinylierung der antimikrobiellen Substanzen

Zur Quantifizierung der Biotinylierung der antimikrobiellen Substanzen wurde der Fluo Reporter Biotin Quantitation Assay Kit (Molecular Probes) verwendet. Mit Hilfe eines fluorometrischen Nachweises ist hier die genaue Bestimmung der Anzahl der Biotin-Markierungen pro Protein möglich (Abbildung 58).

Die Quantifizierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

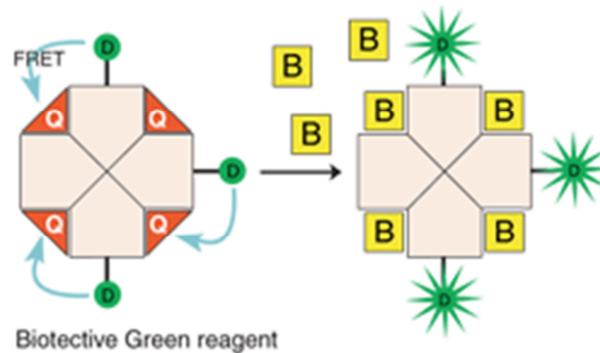


Abbildung 58. Schematische Darstellung des Fluoreporter® Biotin Quantitation Assay. Der Nachweis verwendet die Substanz Biotective Green, die aus Avidin, markiert mit einem fluoreszierenden Farbstoff (D), und einem Liganden in den Biotinbindungsstellen (Q), markiert mit einem Quencher-Farbstoff, der die Biotinbindungsstellen besetzt, besteht. Durch den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) unterdrückt der Ligand die Fluoreszenz. Biotin (B) bindet an das Protein und ersetzt den Quencher-Farbstoff, was zur einer Fluoreszenz proportional zur Menge des gebundenen Biotins führt. (Abbildung Invitrogen).

4.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

BCA-Assay

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mit Hilfe von Bicinchoninsäure (BCA) und CuSO_4 . Proteine bilden mit BCA und CuSO_4 einen Komplex, der bei 562 nm photometrisch detektiert werden kann.

Die Proteine wurden im Vergleich zu einem BSA (bovine serum albumin, Sigma) Standard quantifiziert. Die BCA-Gebrauchslösung wurde unmittelbar vor dem Versuch hergestellt. Hierzu wurden 10 mL BCA-Proteinassay-Reagenz A (Pierce) mit 200 μL 4% Kupfersulfatlösung gemischt. In eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden jeweils 10 μL des BSA-Standards (0–30 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) sowie 10 μL der zu messenden Proben mit 200 μL Gebrauchslösung gemischt und 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach weiteren 15 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Extinktionsmessung am Multiskan MS340 bei 560 nm. Durch Erstellen einer Eichgerade der BSA-Standards konnte der Proteingehalt der Extrakte ermittelt werden.

4.4 Immunologische Nachweismethoden

Immunologische Nachweismethoden wurden in dieser Arbeit für verschiedene Fragestellungen verwendet. Alle Inkubationsschritte wurden hierbei bei Raumtemperatur ausgeführt. Zuerst wurden die zu untersuchenden Oberflächen für 30 min. in Blockierungslösung (PBS-Puffer, 0,1% Tween 20, 5% Milchpulver) und anschließend für 1 Std.

in primärer Antikörperlösung (primärer Antikörper verdünnt in Blockierungslösung) inkubiert. Nach gründlichem viermaligem Waschen der Oberflächen mit Waschlösung (PBS-Puffer, 0,1% Tween 20) für jeweils 5 min. wurden die Oberflächen für 1 Std. in sekundärer Antikörperlösung (sekundärer Antikörper verdünnt in Waschlösung) inkubiert. Die Oberflächen wurden wie oben beschrieben gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet bzw. direkt zur Chemilumineszenz-Detektion eingesetzt.

4.4.1 Immunologischer Nachweis der Hydrophobinbeschichtung

Primärer AK	Anti-His Tag antibody, Clone His.H8; Millipore, Schwalbach, Deutschland Verdünnung 1:3000
Sekundärer AK (1)	Goat polyclonal secondary antibody to mouse IgG (Cy 3.5 conjugated); Abcam, Cambridge, UK Verdünnung 1:5000
Sekundärer AK (2)	Chicken secondary antibody to mouse IgG (HRP conjugated); Santa Cruz Biotechnology Verdünnung 1:3000

Der His-Tag der rekombinanten Fusionshydrophobine wurde für die spezifische Markierung und den immunologischen Nachweis der Hydrophobinbeschichtung verwendet. Zum einen wurde die Homogenität der Hydrophobinbeschichtung in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationstemperaturen und -zeiten mit Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (sekundärer AK (1)). Der Einfluss verschiedener Lösungsmittel und Detergenzien auf die Stabilität der Hydrophobinbeschichtung wurde über Chemilumineszenz detektiert (sekundärer AK (2)).

Für Immunfluoreszenzuntersuchungen der Homogenität der Hydrophobinbeschichtung wurde nach dem Trocknen der Oberflächen bei Raumtemperatur die anti-fading Lösung Citifluor (Citifluor Ltd, London, UK) auf die Oberflächen getropft und diese mit 630-facher Vergrößerung mit dem Axioplan 2 Imaging System (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit dem Filter Set BP 546/12, FT 580, LP 590 analysiert. Zehn digitale Aufnahmen wurden von jeder Oberfläche mit der Zeiss AxioCam MRm Kamera und der Axio Vision 4.6 Software aufgenommen.

Die Untersuchungen zur Stabilität der Hydrophobinbeschichtung wurden im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Einzelne Kavitäten der Hydrophobin-beschichteten Mikrotiterplatte wurden für 2 Std. bei Raumtemperatur mit 0,9% NaCl, PBS-Puffer, 2% SDS, 2% SDS + 0,1% Tween 20, 60% EtOH bzw. konzentrierte Ameisensäure behandelt. Nach gründlichem Waschen der Kavitäten mit PBS-Puffer wurde die immunologische Nachweisreaktion durchgeführt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte nach Zugabe des Substrats ECL Plus (ECL Plus Western Blotting Reagenz, GE Healthcare) am Tecan Mikrotiterplattenreader. Die HRP katalysiert die enzymatische Umsetzung

von Luminol in seine oxidierte Form. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form von Licht emittiert, das als Chemilumineszenzsignal detektiert werden kann.

4.4.2 Nachweis der Biotinylierung der Hydrophobinbeschichtung

Primärer AK	Anti-Biotin antibody (polyclonal goat; alkaline phosphatase conjugated); Rockland, Immunochemicals for Research, Gilbertsville, PA, USA Verdünnung 1:1000
-------------	---

Zum spezifischen Nachweis der erfolgreichen Biotinylierung der Hydrophobinbeschichtung, dem erstem Schritt der sequentiellen Funktionalisierung der Oberfläche, wurde ein Anti-Biotin Antikörper funktionalisiert mit Alkalischer Phosphatase verwendet. Nach der Antikörperbindung wurde die Oberfläche mit CDP-Star Substratlösung (enthält 1,2-Dioxetan-Phosphat) überschichtet und für 5 min. im Dunkeln inkubiert. Die konjugierte alkalische Phosphatase setzt während der Inkubation das Chemilumineszenz-Substrat (CDP-Star ready to use, Roche) in einer enzymkatalysierten Dephosphorylierung um. Die Dephosphorylierung des 1,2-Dioxetan-Phosphat (CDP) resultiert in einem instabilen Phenolat-Anion, das sehr schnell zerfällt. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form von Licht emittiert, das als Chemilumineszenzsignal detektiert werden kann. Dieses Lichtsignal wurde mittels CDC-Kamera im Lumilmager detektiert.

4.4.3 Immunologischer Nachweis der Lysozymimmobilisierung

Primärer AK	Anti-Lysozym antibody (Rabbit polyclonal to lysozyme); Abcam, Cambridge, UK Verdünnung 1:2500
Sekundärer AK	goat secondary antibody to rabbit IgG (HRP conjugated); Santa Cruz Biotechnology Verdünnung 1:5000

Zum spezifischen Nachweis der Lysozymimmobilisierung, beispielhaft für den letzten Schritt der sequentiellen Funktionalisierung der Hydrophobinbeschichtung, wurde als primärer Antikörper ein Anti-Lysozym Antikörper und als sekundärer Antikörper ein mit dem Enzym HRP funktionalisierter Antikörper verwendet. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte nach Zugabe des Substrats ECL Plus (ECL Plus Western Blotting Reagenz, GE Healthcare) für den Nachweis der Lysozym-Bindung auf den modifizierten Oberflächen und auf den QCM-D Kristallen nach der online-Funktionalisierung am Lumilmager. Zur Quantifizierung der gebundenen Lysozymmenge wurde zusätzlich eine Standardgerade mit definierten Mengen Lysozym erstellt und der Nachweis erfolgte im Mikrotiterplattenformat am Tecan Mikrotiterplattenreader.

4.5 Mikrobiologische Untersuchungen

4.5.1 Bakterien

Zur Untersuchung des Einflusses der rekombinanten Fusionshydrophobine auf das Bakterienwachstum und die Biofilmbildung wurden verschiedene Bakterienisolate und natürliche Bakterienpopulationen verwendet (Tabelle 8)

Tabelle 8. Überblick über die verwendeten Bakterienisolate und natürlichen Bakterienpopulationen.

Bakterienisolat / - population	Eigenschaft	Referenz bzw. Herkunft
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positiv	Patientenisolat 3a, MRSA
<i>Enterococcus faecalis</i> DSM2570	Gram-positiv	
<i>Escherichia coli</i> K12	Gram-negativ	DSM 498
<i>Escherichia coli</i> BW3110	Gram-negativ	E.coli BW3110, pJOE 4056.2 His e-GFP Wilms <i>et al.</i> 1999; Wegerer <i>et al.</i> 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	Gram-negativ	Stamm H103
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pa49R	Gram-negativ	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 1117	Gram-negativ	ATCC 27853
Kläranlagenzulauf	gemischte Pop.	Kläranlage Karlsruhe-Neureut
Kläranlagenablauf	gemischte Pop.	Kläranlage Karlsruhe-Neureut

Die verwendeten Bakterien lagen als Glycerinkultur vor. Die Abwasserproben wurden direkt vor Verwendung aus der Kläranlage entnommen.

4.5.2 Nährmedien

Die für die Anzucht und den Nachweis der Bakterien verwendeten Medien sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9. Überblick über die verwendeten flüssigen und festen Nährmedien zur Bakterienanzucht.

Nährmedium oder -agar	Zusammensetzung
Hirn-Herz-Bouillon (Brain Heart Infusion, BHI)	1:4 mit H ₂ O dest. verdünnt; Fertignährmedium (Merck)
Müller-Hinton-Bouillon (MH)	Fertignährmedium (Merck)
BM2-Medium (BM2)	62 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7, 7 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 mM MgSO ₄ , 10 µM FeSO ₄ , 0.4% (wt/vol) Glucose
BHI-Agar	1:4 mit H ₂ O dest. verdünnt; Fertignährmedium (Merck), Zugabe von 15 g/L Agar-Agar (Merck)
MH-Agar	Fertignährmedium (Merck)
R2A-Agar	Fertignährmedium (Merck)

Für die Anzucht von natürlichen Abwasser-Biofilmen wurde synthetisches Abwasser als Nährlösung verwendet (Tabelle 10). Dieses wurde als 100-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt und nach dem Autoklavieren portionsweise eingefroren.

Tabelle 10. Zusammensetzung des synthetischen Abwassers nach OECD / ISO (Methode 11733). Der Ansatz erfolgte in H₂O dest. Der pH-Wert des synthetischen Abwassers lag bei pH 7,5 ± 0,5.

	1-fach (pro Liter)	100-fach (pro Liter)
Pepton (aus Casein)	160 mg	16 g
Fleischextrakt	110 mg	11 g
Harnstoff	30 mg	3 g
Natriumchlorid (NaCl)	7 mg	0,7 g
Calciumchlorid (CaCl₂ x 2 H₂O)	4 mg	0,4 g
Magnesiumsulfat (MgSO₄ x 7 H₂O)	2 mg	0,2 g
Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄)	28 mg	2,8 g

4.5.3 Bakterienanzucht und Biofilmkultivierung

Übernachtskulturen der Bakterien wurden in BHI, MH oder BM2 in sterilen 50 mL-Röhrchen auf einem Schüttler bei 37°C und 150 Umdrehungen pro Minute angezogen. Die Übernachtskulturen wurden in frischem Medium verdünnt für das Bakterienwachstum in Mikrotiterplatten oder die Biofilmkultivierung in den Biofilmreaktoren. Agarplatten wurden bei 37°C für 24 Std. oder bei 20°C für 7 Tage inkubiert.

Mikrotiterplatte

In Mikrotiterplatten wurden die primäre bakterielle Adhäsion und ausgereifte Biofilme im statischen System untersucht. Die Charakterisierung erfolgte über den Kristallviolett- und/oder Resazurin-Assay (Kapitel 4.5.5 und 4.5.6).

Biofilm-Röhrenreaktor

Zur Untersuchung des Einflusses der Hydrophobinbeschichtung auf die bakterielle Biofilmbildung wurden Reinkultur- und natürliche Mischkultur-Biofilme auf Hydrophobinbeschichteten und unbeschichteten Glasoberflächen in einem Durchflusssystem angezogen. Der verwendete Röhrenreaktor ist eine laborinterne Eigenkonstruktion, bestehend aus einer Reaktorröhre (Länge 29 cm, Innendurchmesser 4,6 cm) und einer Halterung für die Oberflächen (Abbildung 59). Die Biofilme wurden mit einer konstanten Flussrate von 10 mL/min bei Raumtemperatur kultiviert.

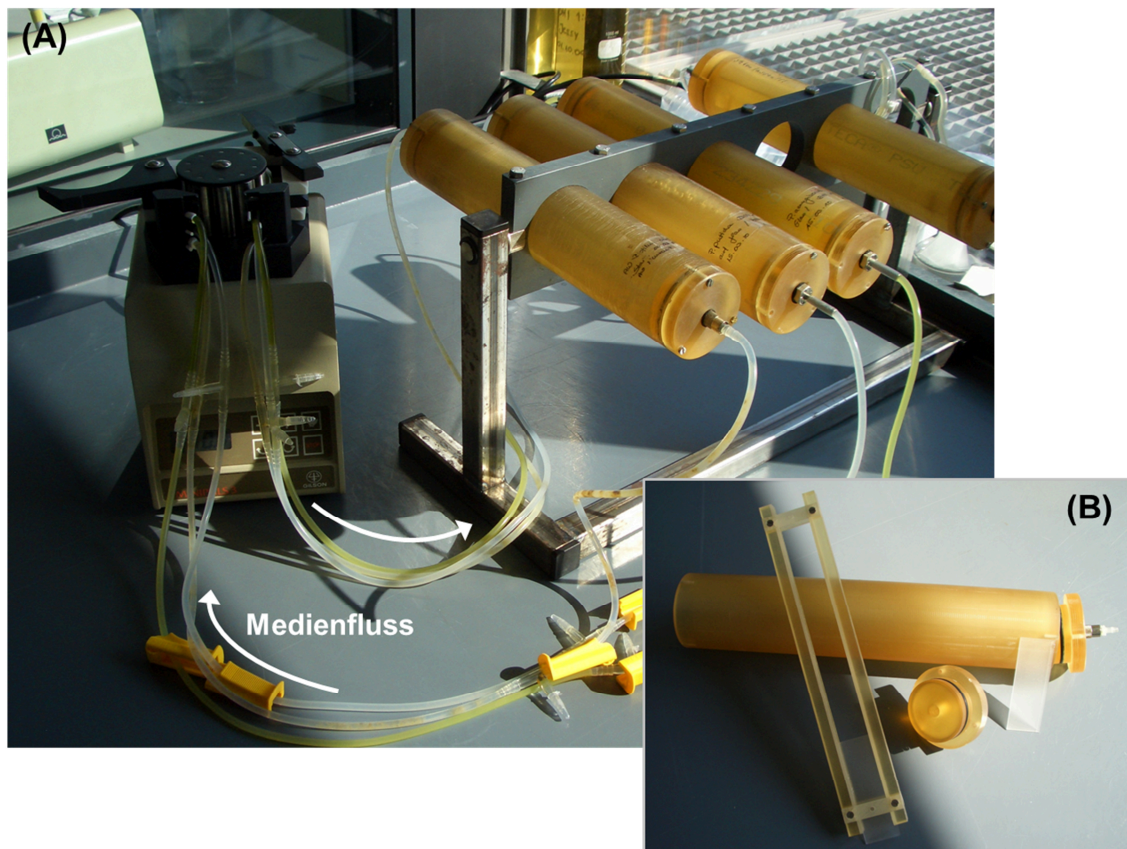


Abbildung 59. Abbildung des Röhrenreaktors. (A) Betrieb des Röhrenreaktors zur Anzucht eines Biofilms im Batch-System. (B) Reaktorröhre mit Halterung für Oberflächen in Objektträgergröße.

Für Reinkultur-Biofilme wurden Übernachtkulturen einzelner Bakterienkolonien verdünnt und bei 37°C inkubiert, bis die Bakterienzellen die exponentielle Phase (OD_{600} 0,5-0,7) erreicht hatten. Diese Bakteriensuspension wurde mit BHI auf eine OD_{600} 0,1 verdünnt und als Start suspension für das Biofilmwachstum eingesetzt. Als Nährmedium wurde BHI verwendet. Nach 5, 17 und 26 Std. wurden die Glasoberflächen aus dem Reaktor entfernt und in sterilem Zellwaschpuffer (5 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris, pH 8,0) gewaschen, um lose adhärenierte Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die Oberflächen für die mikroskopische oder mikrobiologische Charakterisierung des Biofilmwachstums verwendet.

Für natürliche Multispezies Biofilme wurde Abwasser als Inokulum und synthetisches Abwasser als Nährstofflösung verwendet.

CDC-Biofilmreaktor

Zur Analyse des Biofilmwachstums auf Oberflächen unter definierten Scherkräften wurde der CDC-Biofilmreaktor (Biosurface Technologies Corporation, Bozeman, Montana, USA) verwendet (Abbildung 60).

Der CDC-Biofilmreaktor bietet eine kontrollierbare und reproduzierbare Umgebung für das Biofilmwachstum auf verschiedenen Oberflächen. Der Reaktor besteht aus acht Polypropylen Coupon-Halterungen, die jeweils drei Coupons fassen können. Die passenden Coupons sind in verschiedenen Materialien erhältlich. Zur Untersuchung des Biofilmwachstums wurden (modifizierte) Glascoupons als Ausgangsmaterial verwendet. Der Deckel hält und stabilisiert die Coupon-Halterungen in der Bakterien-suspension. Das Glasgefäß fasst 1 Liter Flüssigkeit, wobei sich der Überlauf auf einer Höhe von 350 mL befindet. Das Medium und die Bakterien werden durch Rühren mittels eines Magnetrührers homogen im Reaktor verteilt. Abhängig von der Umdrehungsgeschwindigkeit des Magnetrührers lassen sich definierte, auf die Biofilme wirkende, Scherkräfte einstellen.

Vor der Verwendung im Biofilmreaktor (oder zur Hydrophobinbeschichtung) wurden die Glas- und Tefloncoupons für 30 min. in 2% SDS + 0,1% Tween 20 im Ultraschallbad gereinigt und anschließend gründlich mit Milli-Q H₂O gespült.

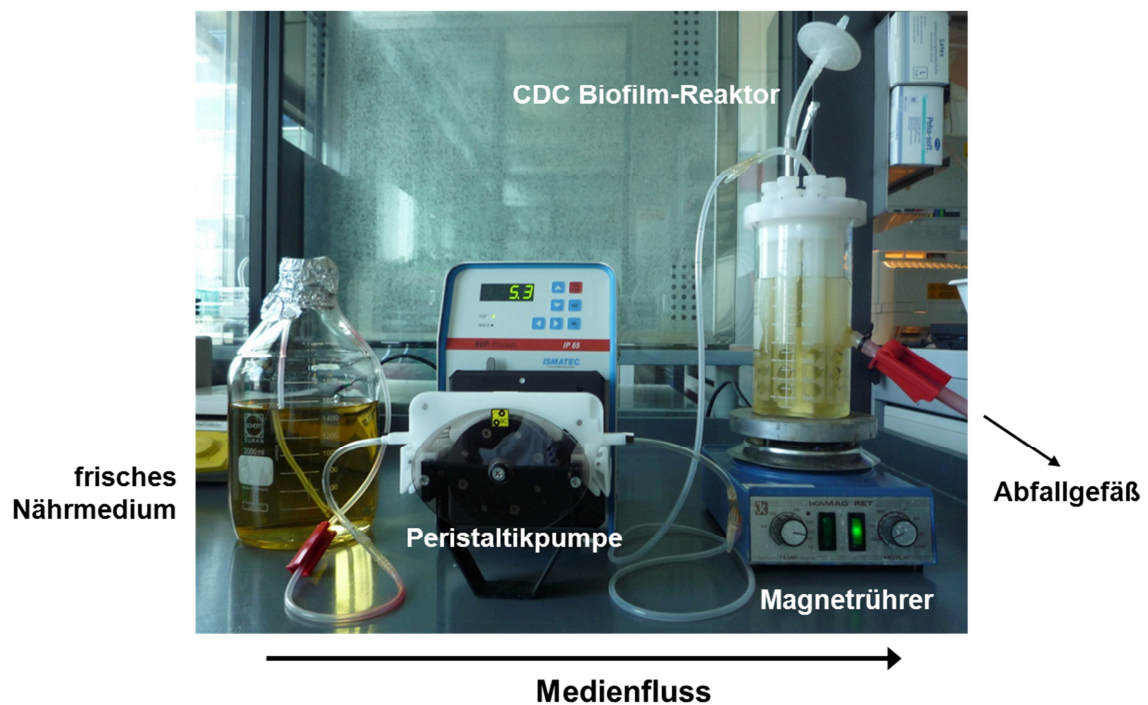


Abbildung 60. Betrieb des CDC-Biofilmreaktors im Durchfluss. Frisches Nährmedium wird mittels einer Peristaltikpumpe kontinuierlich in den CDC-Reaktor gepumpt. Die eingestellte Flussrate ist hierbei abhängig von der Verdopplungszeit der Bakterien im Reaktor. Die auf die Biofilme wirkenden Scherkräfte werden mit Hilfe eines Magnetrührers kontrolliert. Verbrauchtes Medium fließt über einen Überlauf in ein Abfallgefäß.

Bei der Biofilmanzucht von Reinkulturbiofilmen auf den modifizierten und unmodifizierten Coupons sollte die Verweildauer (RT, Residence time) der Bakterien im Reaktor

kleiner sein als ihre Verdopplungszeit t_d . So wurde ein Wachstum der Bakterien in der planktonischen Phase minimiert und das Biofilmwachstum gefördert.

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit t_d wurde von den Bakterien durch die Bestimmung der OD_{600} zu verschiedenen Zeitpunkten eine Wachstumskurve bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Verdopplungszeit t_d wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Exponentielle Wachstumsrate: } \mu = (\ln x_t - \ln x_0) / (t - t_0)$$

$$\text{Verdopplungszeit } t_d = \ln 2 / \mu$$

Da gelten sollte $RT < t_d$, wurde die gewünschte Verweildauer nach der Berechnung der Verdopplungszeit festgelegt.

Für die Bestimmung der Flussrate gilt:

$$\text{Flussrate} = \text{Reaktorvolumen} / RT$$

Für die Biofilmkultivierung wurde eine Übernachtskultur aus einer einzelnen Bakterienkolonie in frischem Medium auf eine OD_{600} 0,1 verdünnt. Die Bakterienadhäsion erfolgte im Reaktor für 1,5 Std. ohne Zufluss von frischem Nährmedium, aber bereits mit definierten Scherkräften. Nach 1,5 Std. wurde mit der zuvor bestimmten Flussrate frisches Medium in den Reaktor gepumpt. Das Biofilmwachstum erfolgte bei Raumtemperatur. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Couponhalterungen aus dem Reaktor entnommen, die Coupons aus den Halterungen entfernt und vor der weiteren Analyse des Biofilmwachstums mit sterilem Zellwaschpuffer (5 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris, pH 8,0) gewaschen.

4.5.4 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)

Zur Bestimmung der Anzahl der kultivierbaren Bakterien und Charakterisierung der antibakteriellen Wirksamkeit der Oberflächen wurden die koloniebildenden Einheiten ermittelt.

Zuerst wurden lose adhärenierte Bakterien durch Waschen mit sterilem Zellwaschpuffer entfernt. Anschließend wurde der Biofilm mit einem sterilen Zellschaber gründlich von der Oberfläche abgeschabt, in einer geringen Menge PBS-Puffer oder Zellwaschpuffer resuspendiert und mit einer Kanüle homogenisiert. Ausgehend von dieser Bakterien-suspension wurde in sterilem PBS-Puffer oder Zellwaschpuffer eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt. Die Verdünnungsstufen wurden im Plattengussverfahren oder mit der Drop-Plate Methode ausplattiert.

Plattengussverfahren

Von den ausgewählten Verdünnungsstufen wurden im Dreifachansatz je 300 μL in eine sterile Petrischale pipettiert. R2A-Agar wurde hierbei als Wachstumsmedium für heterotrophe Bakterien verwendet (Reasoner und Geldreich 1985). Der Agar wurde im

Dampftopf bei 99°C geschmolzen und anschließend im Wasserbad auf ca. 50°C abgekühlt. Der Agar wurde in die Petrischalen gegossen und durch Kreisen mit der Bakteriensuspension vermischt. Nach Aushärten der Platten bei Raumtemperatur wurden diese für 7 Tage bei 20°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. Aus den Dreifachansätzen wurde durch Bildung der Mittelwerte unter Berücksichtigung der Verdünnungen die Bakterienzahl der Ausgangssuspension und entsprechend im Biofilm auf der Oberfläche berechnet.

Drop Plate Methode

Die Drop-Plate Methode wurde nach einem Protokoll von Herigstad *et al.* (2001) durchgeführt.

Zuerst wurden die Agarplatten für 20 min. unter der Sterilbank getrocknet. Von den ausgewählten Verdünnungsstufen wurden jeweils 5 Tropfen à 10 µL auf die Oberfläche von zwei Agarplatten aufgetropft. Auf jede Agarplatte wurden vier Verdünnungsstufen aufgebracht. Anschließend wurden die Platten für 16-20 Std. bei 37°C bebrütet. Die Kolonien jedes Tropfens wurden ausgezählt und unter Berücksichtigung der Verdünnung und des ausgebrachten Volumens die Bakterienzahl der Ausgangssuspension und im Biofilm auf der Oberfläche bestimmt.

4.5.5 Kristallviolett-Assay

Mit Hilfe des Farbstoffes Kristallviolett, der die bakterielle Zellwand färbt, kann eine Detektion von Zellpopulationen adhärenter Zellen auf Oberflächen erfolgen. Hierbei wird die Gesamt-Biomasse bestimmt.

Nach der Inkubation mit Bakteriensuspension wurden alle planktonischen Zellen vorsichtig aus der 96-Well Mikrotiterplatte entfernt. Anschließend wurden die einzelnen Kavitäten mit 300 µL sterilem H₂O dest. gewaschen, um lose adhärenzte Bakterien zu entfernen. Die Bakterien wurden für 10 min. bei Raumtemperatur mit 100 µL 0,05% Kristallviolett pro Kavität gefärbt. Die Kavitäten wurden zweimal mit je 200 µL H₂O dest. gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Der von der Bakterienzellwand gebundene Farbstoff wurde anschließend 10 min. mit 200 µL 33%iger Essigsäure solubilisiert und photometrisch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

4.5.6 Resazurin-Assay

Resazurin ist ein Indikatorfarbstoff der pH-Wert Veränderungen und Redoxreaktionen anzeigt. Der ungiftige wasserlösliche blaue Farbstoff wird bei Reduktion irreversibel zu rosafarbenem fluoreszierendem Resorufin umgesetzt. Durch metabolisch aktive

Bakterien wird Resazurin zu Resorufin reduziert. Die hierbei entstehende Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen.

Nach der Inkubation mit Bakteriensuspension wurden alle planktonischen Zellen vorsichtig aus der 96-Well Mikrotiterplatte entfernt. Anschließend wurden die einzelnen Kavitäten mit 300 µL 0,89% NaCl gewaschen. In jede Kavität wurden 100 µL 0,89% NaCl und 20 µL Resazurin-Lösung pipettiert und die Mikrotiterplatte im Dunkeln unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach 3 Std. wurde die Fluoreszenz am Fluoroskan gemessen (ex 544 nm, em 612 nm).

4.6 Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften

Die antimikrobiellen Eigenschaften der rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein und der für die Funktionalisierung der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen verwendeten Substanzen Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin wurden in Suspension in Bezug auf verschiedene Referenzbakterien bestimmt. Hierfür wurde die Methode der Bouillon-Mikrodilution zur Bestimmung der Empfindlichkeit (MHK, minimale Hemmkonzentration) der Bakterien eingesetzt.

Die antibakterielle Wirkung der funktionalisierten Hydrophobinbeschichtung wurde im statischen System mit der Kirby-Bauer Diffusionsmethode (Agardiffusionstest) hinsichtlich der Freisetzung der immobilisierten Substanzen untersucht. Mit der standardisierten Testvorschrift ASTM E 2149 wurde die antimikrobielle Aktivität der immobilisierten antimikrobiellen Agenzien unter dynamischen Bedingungen bestimmt.

Mit dem Turbidity-Assay wurde die Wirksamkeit des biotinylierten Lysozyms vor und nach der Immobilisierung mit dem Referenzkeim *Micrococcus luteus* untersucht.

4.6.1 Methode der Bouillon-Mikrodilution

Das Bouillon-Dilutionsverfahren ist ein Test zur Bestimmung der Empfindlichkeit (minimale Hemmkonzentration) von Bakterien gegenüber verschiedenen (antimikrobiellen) Wirkstoffen. Der Test wird in flüssigem Medium als Reihenverdünnungstest durchgeführt, wobei eine zweifache Verdünnungsreihe des zu testenden Wirkstoffes verwendet wird. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist eine quantitative Beurteilung des Empfindlichkeitsverhaltens möglich.

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei planktonischen Zellen

Die Bestimmung der MHK bei planktonischen Zellen wurde in Anlehnung an die Vorgaben des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) durchgeführt.

Es wurde die Empfindlichkeit ausgewählter Referenzbakterien gegenüber den rekombinanten Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B in verschiedenen Nährmedien bestimmt. Als Referenzbakterien wurden *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* K12, *P. aeruginosa* PA01 und *P. aeruginosa* Pa49R (Tabelle 8) und als Nährmedien BHI, MH und BM2 (Tabelle 9) verwendet.

H*Protein A und H*Protein B wurden in den Nährmedien in einer Konzentration von 20 mg/mL gelöst und eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 mit dem jeweiligen Medium und einem Endvolumen von 50 μ L in einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Als Positivkontrolle für das Wachstum der Bakterien wurde jeweils eine Kavität nur mit Medium beschickt.

Übernachtulturen der Referenzbakterien wurden in Testmedium angezogen. Die Kulturen wurden für 10 min. bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in frischem Medium aufgenommen. Es wurde eine OD₆₀₀ 0,01 in Medium eingestellt und jeweils 50 μ L der Bakteriensuspension in die Kavitäten der vorbereiteten Mikrotiterplatte pipettiert. Die Kontrolle des Bakterienwachstums erfolgte im Tecan Mikrotiterplattenreader bei 37°C für 21 Std.. Die MHK wurde anschließend als diejenige Konzentration dokumentiert, bei der mit dem bloßen Auge kein Wachstum der Bakterien mehr erkennbar war.

Die MHK der für die Funktionalisierung der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen verwendeten Substanzen Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin wurde bei *S. aureus* bestimmt. Dieses Bakterium wurde auch für spätere Biofilmuntersuchungen auf den funktionalisierten Oberflächen eingesetzt. Es wurde das standardmäßig für MHK-Bestimmungen verwendete MH Medium eingesetzt, welches eine kationenangepasste Konzentration an Calcium- und Magnesiumionen aufweist. Zusätzlich wurde das für Biofilmuntersuchungen eingesetzte BHI Medium verwendet.

Die antimikrobiellen Substanzen wurden in einer Konzentration von 20 mg/mL (Lysozym, Vancomycin) bzw. 8,8 mg/mL im Nährmedium gelöst. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben, wobei die Inkubation in BHI Medium bei Raumtemperatur erfolgte, um die Wachstumsbedingungen an spätere Biofilmuntersuchungen anzupassen.

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei Biofilmen

Es wurde die Empfindlichkeit von *S. aureus* Biofilmen gegenüber den rekombinanten Fusionshydrophobinen H*Protein A und H*Protein B und den antimikrobiellen Substanzen Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin bestimmt. Als Nährmedium wurde MH Medium verwendet.

Eine *S. aureus* Übernachtskultur wurde in frischem MH Medium auf eine OD₆₀₀ 0,03 eingestellt. In die Kavitäten einer 96-Well Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 μ L Bakteriensuspension pipettiert und diese für die Biofilmbildung für 24 Std. bei 37°C im

Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die planktonischen Bakterien entfernt und die Biofilme einmal mit 100 µL MH Medium gewaschen. Die rekombinanten Fusionshydrophobine und die antimikrobiellen Substanzen wurden in einer Konzentration von 20 mg/mL bzw. 8,8 mg/mL (Polymyxin) in MH Medium gelöst und eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 mit MH Medium und einem Endvolumen von 100 µL in einer 96-Well Mikrotiterplatte vorbereitet. Jeweils 100 µL der verschiedenen Verdünnungsstufen wurden auf die Biofilme pipettiert und die Mikrotiterplatte für 24 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Antibiotikabehandlung wurde der Überstand entfernt, die Biofilme einmal mit 100 µL MH Medium gewaschen und nochmals für 24 Std. bei 37°C in 100 µL MH Medium inkubiert. Die MHK wurde anschließend als diejenige Konzentration dokumentiert, bei der mit dem bloßen Auge kein Bakterienwachstum erkennbar war.

4.6.2 Kirby-Bauer Diffusionstest (Agardiffusionstest)

Um die mögliche Freisetzung (Leaching) der immobilisierten Substanzen von den funktionalisierten Hydrophobin-beschichteten Oberflächen zu untersuchen, wurde die Kirby-Bauer Diffusionsmethode angewendet. Dieser Agardiffusionstest wird standardmäßig in der Routinediagnostik verwendet, um die Empfindlichkeit von Bakterienstämmen gegenüber Antibiotika zu bestimmen. Eine Inhibitionszone (ZOI = zone of inhibition) in der mikrobielles Wachstum verhindert wird, zeigt die Effizienz bzw. die Freisetzung der antimikrobiellen Substanzen an.

Als Referenzkeim wurde *S. aureus* verwendet. Eine Übernachtskultur wurde 1:1000 mit MH Medium verdünnt (OD_{600} 0,002) und 200 µL dieser Bakteriensuspension homogen auf MH-Agarplatten ausplattiert. Mit Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin nach Standardprotokoll funktionalisierte Glascoupons wurden mit der aktiven Seite auf die Agarplatten aufgelegt und diese für 24 Std. bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden auch Hydrophobin-beschichtete Glascoupons und Filterpapier getränkt mit unterschiedlichen Konzentrationen der rekombinanten Fusionshydrophobine und antimikrobiellen Substanzen verwendet.

4.6.3 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität immobilisierter Substanzen unter dynamischen Bedingungen (ASTM E 2149)

Zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität der mit Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin funktionalisierten Hydrophobinbeschichtung wurde die Standardmethode ASTM E 2149 eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methode kann die antibakterielle Aktivität unter dynamischen Bedingungen bestimmt werden, wenn kein Leaching der Testsubstanzen von der Oberfläche stattfindet.

Als Referenzbakterien wurden *S. aureus* und *M. luteus* verwendet. Übernachtskulturen der Bakterien wurden für 5 min. bei 13300 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet einmal in Zellwaschpuffer gewaschen, um Medienreste zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in Zellwaschpuffer aufgenommen und eine OD₆₀₀ 0,61-0,64 eingestellt. Jeweils 2 mL Bakteriensuspension und ein funktionalisierter Glascoupon (aktive Oberfläche 126,7 mm²) wurden bei 37°C und 100 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Zu Beginn der Inkubation, nach 3 und 24 Std., wurden jeweils 150 µl der Bakteriensuspension entnommen und die koloniebildenden Einheiten (KBE) mit der Drop-Plate Methode auf MH-Agar-Platten bestimmt.

4.6.4 Turbidity Assay zur Analyse der Lysozymaktivität

Lysozym hydrolysiert die β -1,4-glykosidische Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure- (NAM) und N-Acetylglucosaminresten (NAG) in der Peptidoglykanschicht der bakteriellen Zellwand, was zu einer Lyse der Bakterien führt. Die Aktivität von Lysozym kann über eine Trübungsmessung (Turbidity Assay) einer Bakteriensuspension bestimmt werden. Die optische Dichte der Zellsuspension bei 620 nm oder 450 nm nimmt durch die Lyse der Bakterien deutlich ab.

M. luteus wurde als Referenzbakterium zur Aktivitätsbestimmung von Lysozym vor und nach Biotinylierung und in immobilisierter Form auf funktionalisierten Oberflächen verwendet.

Zur Aktivitätsbestimmung von Lysozym vor und nach Biotinylierung wurde dieses in einer Mikrotiterplatte seriell verdünnt (Endvolumen 100 µl). Eine *M. luteus* Übernachtskultur in BHI Medium wurde für 5 min. bei 13300 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in PBS aufgenommen und eine OD₆₀₀ 0,8 eingestellt. 100 µL Bakteriensuspension wurden in die Kavitäten der vorbereiteten Mikrotiterplatte pipettiert. Die Lyse wurde bei 37°C über 18 Std. bei OD₅₉₅ im Tecan Mikrotiterplattenreader detektiert.

Zur Analyse der Aktivität von immobilisiertem Lysozym wurden die zu untersuchenden Proben mit einer *M. luteus* Suspension inkubiert. Die Trübung wurde in einer Mikrotiterplatte bei 450 nm gemessen.

4.7 Mikroskopische Methoden

4.7.1 Fluoreszenzfärbungen

Syto9

Zur Färbung von Bakterien und Biofilmen direkt auf Oberflächen wurde der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Syto9 verwendet.

Die zu untersuchenden Proben wurden in Zellwaschpuffer gewaschen, um lose adhärenierte Bakterien zu entfernen. Anschließend wurde Syto9 Arbeitslösung nach Herstellerangaben auf den Biofilm aufgetropft. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Färbelösung vorsichtig mit Zellwaschpuffer abgespült, das Anti-Fading Reagenz Citifluor aufgetropft und ein Deckglas aufgelegt. Die Oberflächen wurden mit 100 bis 1000-facher Vergrößerung mit einem Axioplan 2 Imaging Mikroskop (Carls Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit dem Filter Set BP 450-490, FT 510, LP 515-565 untersucht. Digitalbilder jeder Probe wurden mit einer Zeiss AxioCam MRm Kamera und der AxioVison 4.6 Software aufgenommen.

CTC

Zur Färbung von metabolisch aktiven Bakterien in Biofilmen wurde eine CTC-Lösung (5-Cyano-2,3-ditolychlorid, Polyscience, Inc.) verwendet. CTC ist ein Tetrazoliumsals, das durch die Dehydrogenase Aktivität der Bakterien zu einem wasserunlöslichen, rot fluoreszierenden Formazan reduziert wird.

Vor jedem Versuchsansatz wurde die CTC Lösung frisch nach Herstellerangaben angesetzt (12 mg CTC in 10 mL BHI). Die zu untersuchenden Oberflächen wurden in Zellwaschpuffer gewaschen, um lose adhärenierte Bakterien zu entfernen, und anschließend in der frisch angesetzten CTC/BHI Lösung für 2 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Schwenktisch inkubiert. Wurde zusätzlich eine Färbung der Gesamtzellzahl durchgeführt, wurde der Syto9 Farbstoff 20 min. vor Ende der Inkubationszeit direkt in die Lösung (0,5 µl Stock pro 1 mL Lösung) gegeben. Die Oberflächen wurden anschließend vorsichtig in Zellwaschpuffer gewaschen, das Anti-Fading Reagenz Citifluor aufgetropft und ein Deckglas aufgelegt. Die Präparate wurden mit 100 bis 1000-facher Vergrößerung mit einem Axioplan 2 Imaging Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit dem Filter Set BP 546, FT 580, LP 590 untersucht. Digitalbilder jeder Probe wurden mit einer Zeiss AxioCam MRm Kamera und der AxioVison 4.6 Software aufgenommen.

4.7.2 Bestimmung der Oberflächenbedeckung

Die Oberflächenbedeckung (Surface Coverage) mit Bakterien / Biofilmen wurde anhand der aufgenommenen Mikroskopiebilder mit der BioFlux 200 Software (Version 2.3.0.3; Fluxion Biosciences / IUL Instruments GmbH, Königswinter, Deutschland) bestimmt. Es wurden mindestens vier unabhängige Aufnahmen pro Probe verwendet.

4.8 Molekularbiologische Methoden

4.8.1 Populationsanalyse mittels Denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (PCR-DGGE)

Um die bakterielle Population auf den Hydrophobin-modifizierten und unmodifizierten Glasoberflächen und in der planktonischen Phase zu untersuchen, wurde zuerst die DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Lyse der Bakterienzellen wurde in Tris/EDTA Puffer (20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 1,2% Triton, pH 8,0) mit 20 mg/mL Lysozyme für 2 Std. bei 37°C und anschließender Proteinase K Behandlung für 45 min bei 56°C durchgeführt. Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde mit dem NanoDrop ND-100 Spektral Photometer (PeqLab, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Die Absorption der DNA wurde bei 260 nm gemessen und die Reinheit aus dem Absorptionsverhältnis A260/A280 bestimmt.

Zwei Mikroliter der extrahierten genomischen DNA (bis zu 80 ng) dienten als Template für die PCR Amplifikation eines Fragmentes der 16S rRNA Genregion mit den Primern GC27F und 517R (Tabelle 4).

Tabelle 11. Sequenzen der 16S rDNA Primer, die für die Populationsanalysen mittels DGGE eingesetzt wurden.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Literatur
27F*	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Muyzer <i>et al.</i> 1993
517R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Lane 1991

* mit GC-Klammer am 5'-Ende

(CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCGCCCCCGCCCC)

Der 25 µL PCR Ansatz enthielt 1,25 U Taq-DNA Polymerase (peqGold Hot Taq DNA-Polymerase; PeqLab, Erlangen, Deutschland), 20 pmol von jedem Primer, 1x PCR Puffer, 200 µM dNTPs, PCR-H₂O und DNA.

Eine GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) wurde zur Amplifikation (Tabelle 5) verwendet. Nach der Amplifikation der DNA wurden 5 µL

Aliquots auf einem 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid zur Kontrolle der Größe und Menge der Amplifikate aufgetrennt.

Tabelle 12. Temperaturprofil der PCR zur anschließenden Auftrennung der Amplifikate mittels DGGE

1x	95°C	30 sec	Aktivierung der Hot Taq DNA-Polymerase
30 x	94°C	30 sec	Denaturierung
	55°C	30 sec	Primeranlagerung
	72°C	1 min	Elongation
1x	72°C	7 min	Postamplifikation

Die DGGE-Analyse der PCR Produkte wurde mit einem D-Code System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit denaturierenden Polyacrylamidgelen mit einem Harnstoffgradienten von 40-70% durchgeführt. 8 µL der PCR-Produkte wurden auf das Gel aufgetragen. Die Gele liefen in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,5) bei 60°C und 70 V für 16 Std.. Zur Visualisierung der Bandenmuster, die sich durch die sequenzspezifische Auftrennung der PCR-Produkte ausgebildet haben, wurden die Gele mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff SYBR® Gold (0,001%; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Die gefärbten Gele wurden bei 520 nm mit einer Lumilmager Working Station (LumilmagerT1™, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) ausgewertet.

Die DGGE Fingerabdrücke wurden manuell ausgezählt bezüglich der An- oder Abwesenheit von Banden, unabhängig von deren Intensität. Die Anzahl der Banden entspricht (in etwa) der Anzahl der bakteriellen Spezies in der untersuchten Probe. Populationsähnlichkeiten wurden paarweise mit dem Dice Koeffizienten berechnet.

$$\text{Dice Koeffizient: } Cs = 2j/(x + y)$$

j = Anzahl der gemeinsamen Banden in Probe X und Y

x = Anzahl der Banden in Probe X

y = Anzahl der Banden in Probe Y

Die Analyse ergab Cs Werte zwischen 0 und 1, wobei ein Cs Wert von 0 keine Ähnlichkeit zwischen den Proben bedeutet. Ein Cs Wert von 1 steht für 100%ige Übereinstimmung (Murray *et al.* 1996).

5. LITERATURVERZEICHNIS

Absolom DR, Lamberti FV, Policova Z, Zingg W, Van Oss CJ, Neumann AW. (1983). Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl Environ Microb.* 46:90–97.

Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Srinivasa VK, Romani L, Latgé JP. (2009). Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature.* 460:1117–1121.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1997). *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage. VHC, Weinheim, Deutschland.

Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R. (2004). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials.* 25(18):4383–4391.

Askolin S, Linder M, Scholtmeijer K, Tenkanen M, Penttilä M, De Vocht M, Wösten HAB. (2006). Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules.* 7:1295–1301.

Banerjee I, Pangule RC, Kane RS. (2011). Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Adv Mater.* 23(6):690–718.

Basheva ES, Kralchevsky PA, Danov KD, Stoyanov SD, Blijdenstein TBJ, Pelan EG, Lips A. (2011). Self-assembled bilayers from the protein HFBII-hydrophobin: nature of the adhesion energy. *Langmuir.* 27:4481–4488.

Bayry J, Aimanianda V, Guijarro JI, Sunde M, Latgé JP. (2012). Hydrophobins - unique fungal proteins. *PLoS Pathog.* 8(5):e1002700.

Bhushan B. (2012). Bioinspired structured surfaces. *Langmuir.* 28(3):1698–1714.

Bixler GD and Bhushan B. (2012). Biofouling: lessons from nature. *Philos T Roy Soc A.* 370(1967):2381–2417.

- Boe-Hansen R, Martiny AC, Arvin E, Albrechtsen HJ. (2003).** Monitoring biofilm formation and activity in drinking water distribution networks under oligotrophic conditions. *Water Sci Technol.* 47(5):91–97.
- Boulangue-Petermann L, Jullien C, Dubois PE, Benezck T, Faille C. (2004).** Influence of surface chemistry on the hygienic status of industrial stainless steel. *Biofouling.* 20:25-33.
- Bunker BC, Rieke PC, Tarasevich BJ, Campbell AA, Fryxell GE, Graff GL, Song L, Liu J, Virden JW, McVay GL. (1994).** Ceramic thin film formation on functionalized interfaces through biomimetic processing. *Science.* 264:48-55.
- Busscher HJ and Van der Mei HC. (1997).** Physico-chemical interaction in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res.* 11(1):24-32.
- Busscher HJ and Weerkamp AH. (1987).** Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol Lett.* 46:165-173.
- Busscher HJ, Bos R, Van der Mei HC. (1995).** Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett.* 128:229-234.
- Busscher HJ, Weerkamp, AH, Van der Mei HC, Van Pelt AWJ, De Jong HP, Arends J. (1984).** Measurements of the free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microb.* 48:980-983.
- Carpentier B and Cerf O. (1993).** Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol.* 75:499–511.
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read R, Morck D, Buret A. (1999).** The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 37(6):1771–1776.
- Chalet L and Wolf FJ. (1964).** The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes. *Arch Biochem Biophys.* 106:1–5.
- Characklis WG and Marshall KC. (1990).** Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In: Characklis WG and Marshall KC (Eds), *Biofilms*, pp 1-16. John Wiley & Sons, New York, USA:
- Characklis WG, Necimons MJ, Picologlou BF. (1981).** Influence of fouling biofilms on heat transfer. *Heat Transfer Eng.* 3:23-37.
- Chelmowski R, Köster SD, Kerstan A, Prekelt A, Grunwald C, Winkler T, Metzler-Nolte N, Terfort A, Wöll C. (2008).** Peptide-Based SAMs that resist the adsorption of proteins. *J Am Chem Soc.* 130:14952-14953.

- Christensen BE. (1989).** The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *J Biotechnol.* 10:181–202.
- Chuang HF, Smith RC, Hammond PT. (2008).** Polyelectrolyte multilayers for tunable release of antibiotics. *Biomacromolecules.* 9:1660–1668.
- Costerton JW, Damgaard HN, Cheng KJ. (2001).** Cell envelope morphology of rumen bacteria. *J Bacteriol.* 118:1132–1143.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284(5418):1318–1322.
- Costerton, JW and Lewandowski Z. (1995).** Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol.* 49:711–745.
- Dalsin JL, Hu B-H, Lee BP, Messersmith PB. (2003).** Mussel adhesive protein mimetic polymers for the preparation of nonfouling surfaces. *J Am Chem Soc.* 125 (14):4253–4258.
- Dalton HM, Poulsen LK, Halasz P, Angles ML, Goodman AE, Marshall KC. (1994).** Substratum-induced morphological changes in a marine bacterium and their relevance to biofilm structure. *J Bacteriol.* 176:6900–6906.
- De Vocht ML, Reviakine I, Ulrich WP, Bergsma-Schutter W, Wösten HAB, Vogel H, Brisson A, Wessels JGH, Robillard GT. (2002).** Self-assembly of the hydrophobin SC3 proceeds via two structural intermediates. *Protein Sci.* 11:1199–1205.
- De Vries OMH, Fekkes MP, Wösten HAB, Wessels JGH. (1993).** Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch Microbiol.* 159:330–335.
- Derjaguin BV and Landau L. (1941).** Theory of the stability of strongly charged lyophobic soils on the adhesion of the strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Phys-chim Sin.* 14:633–662.
- Donlan RM. (2002).** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8:881–890.
- Ebbole DJ. (1997).** Hydrophobins and fungal infection of plants and animals. *Trends Microbiol.* 5(10):405–408.
- Emtiazi F, Schwartz T, Marten SM, Krolla-Sidenstein P, Obst U. (2003).** Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Res.* 38:1197–1206.
- Espeland EM and Wetzel RG. (2001).** Complexation, stabilization, and UV photolysis of extracellular and surface-bound glucosidase and alkaline phosphatase: implications for biofilm microbiota. *Microb Ecol.* 42:572–585.

- Ferreiros CM, Carballo J, Craido MT, Sainz V, Del Rio MC. (1989).** Surface free energy and interaction of *Staphylococcus epidermidis* with biomaterials. *FEMS Microbiol Lett.* 60:89-94.
- Flemming H and Wingender J. (2001).** Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biologie in unserer Zeit.* 3(31):169-180.
- Flemming H. (1991).** Biofilme und Wassertechnologie Teil 1: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. *GWF Wasser – Abwasser.* 132:197-207.
- Frant M. (2008).** Funktionalisierung von Biowerkstoffen durch biomimetische Strukturen auf der Basis von Tetraetherlipiden – ein Antifoulingkonzept. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Gilbert P, Evans DJ, Evans E, Duguid IG, Brown MRW. (1991).** Surface characteristics and adhesion of *E. coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Appl Bacteriol.* 71:72–77.
- Glantz PO. (1971).** The adhesiveness of teeth. *J Colloid Interf Sci.* 37:281–290.
- Glinel K., Jonas AM, Jouenne T, Leprince J, Galas L, Huck WTS. (2009).** Antibacterial and antifouling polymer brushes incorporating antimicrobial peptide. *Bioconjugate Chem.* 20:71-77.
- Gordon DP and Mawatari SF. (1992).** Atlas of marine-fouling Bryozoa of New Zealand ports and harbours. *Miscellaneous publications of the New Zealand Oceanographic Institute.* 107:1-52.
- Gottenbos B, Busscher HJ, Van der Mei HC, Nieuwenhuis P. (2002).** Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *J Mater Sci-Mater M.* 13:717-722.
- Gottenbos B, Van der Mei HC, Klatter F, Grijpma DW, Feijen J, Nieuwenhuis P, Busscher HJ. (2003).** Positively charged biomaterials exert antimicrobial effects on gram-negative bacilli in rats. *Biomaterials.* 24(16):2707-2710.
- Hadjiev D, Dimitrov D, Martinov M, Sire O. (2007).** Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning. *Enzyme Microb Tech.* 40:840–848.
- Hakanpää J, Paananen A, Askolin S, Nakari-Setälä T, Parkkinen T, Penttilä M, Linder MB, Rouvinen J. (2004).** Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. *J Biol Chem.* 279(1):534-539.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2(2):95-108.

- Halthur TJ, Arnebrant T, Macakova L, Feiler A. (2010).** Sequential adsorption of bovine mucin and lactoperoxidase to various substrates studied with quartz crystal microbalance with dissipation. *Langmuir*. 26:4901–4908.
- Hanawa T. (2009).** An overview of biofunctionalization of metals in Japan. *J R Soc Interface*. 6:361–369.
- Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. (2001).** How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Meth*. 44(2):121-129.
- Hermansson M. (1999).** The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloid Surface B*. 14:105-119.
- Höke H and Hempel DC. (1990).** Biologischer Abbau komplexer Gemische stickstoffhaltiger Aromaten in einem Teerraffinerieabwasser. *GWF Wasser – Abwasser*. 131:660-663.
- Hood SK and Zottola EA. (1995).** Biofilms in food processing. *Food Control*. 6(1):9–18.
- Hook F, Rodahl M, Brzezinski P, Kasemo B. (1998a).** Energy dissipation kinetics for protein and antibody-antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance. *Langmuir*. 14:729–734.
- Hook F, Rodahl M, Brzezinski P, Kasemo B. (1998b).** QCM-measurements of ferritin monolayers on methyl-thiolated gold: Dependence of energy dissipation and saturation coverage on salt concentration. *J Colloid Interf Sci*. 208:263–267.
- Hook F, Rodahl M, Kasemo B, Brzezinski P. (1998c).** Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: effects of pH, ionic strength, and ligand binding. *P Natl Acad Sci USA*. 95:12271–12276.
- Iwabuchi N, Sunairi M, Anzai H, Morisaki H, Nakajima M. (2003).** Relationships among colony morphotypes, cell surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*. *Colloid Surface B*. 30:51–60.
- Jansen B and Peters G. (1991).** Modern strategies in the prevention of polymer-associated infections. *J Hosp Infect*. 19:83-88.
- Janssen MI, Van Leeuwen MBM, Van Kooten TG, De Vries J, Dijkhuizen L, Wösten HAB. (2004).** Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the beta-sheet end state. *Biomaterials*. 25:2731–2739.
- Jenkinson HF and Lappin-Scott HM. (2001).** Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol*. 9(1):9-10.

- Jeong DK and Frank JF. (1994).** Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *J Food Protect.* 57:576–586.
- Katsikogianni M and Missirlis YF. (2004).** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cells Mater.* 8:37-57.
- Kiremitci-Gumustederelioglu M and Pesmen A. (1996).** Microbial adhesion to ionogenic PHEMA, PU and PP implants. *Biomaterials.* 17:443-449.
- Klein J, Brauckhoff S, Patalas N, Rennings-Schäfer JP, Schacht S. (1991).** Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe in Prozeßwässern durch an Aktivkohle immobilisierte Mikroorganismen. *GWF Wasser – Abwasser.* 31:654-659.
- Kodani S, Lodato MA, Durrant MC, Picart F, Willey JM. (2005).** SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes. *Mol Microbiol.* 58:1368–1380.
- Kurella AK and Dahotre NB. (2005).** Review paper: surface modification for bioimplants: the role of laser surface engineering. *J Biomater Appl.* 20:5-50.
- Kwok DY and Neumann AW. (1999).** Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv Colloid Interfac.* 81:167-249.
- Lackner S, Homberg M, Terada A, Kingshott P, Smets BF. (2009).** Enhancing the formation and shear resistance of nitrifying biofilms on membranes by surface modification. *Water Res.* 43:3469-3478.
- Lane DJ. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E and Goodfellow M (Eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp 115-175. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Le Magrex-Debar E, Lemoine J, Gelle MP, Jacquelin LF, Choisy C. (2000).** Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *Int J Food Microbiol.* 55:239-234.
- Lee W, Saito K, Furusaki S, Sugo T. (1997).** Capture of microbial cells on brush-type polymeric materials bearing different functional groups. *Biotechnol Bioeng.* 53(5):523-528.
- Lehnert M. (2001).** Biofunktionalisierung oxidischer Titanoberflächen über eine spezifische Anbindung von biotinyliertem Fibronectin für die medizinische Anwendung. Dissertation, Johannes-Gutenberg Universität Mainz.

- Linder M, Szilvay GR, Nakari-Setälä T, Söderlund H, Penttilä M. (2002).** Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBI from *Trichoderma reesei*. *Protein Sci.* 11(9):2257–2266.
- Linder MB, Szilvay GR, Nakari-Setälä T, Penttilä M. (2005).** Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 29:877-896.
- Littlejohn KA, Hooleyb P, Cox PW. (2012).** Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. *Food Hydrocolloid.* 27:503–516.
- Liu Y, Yang S, Li Y, Xu H, Qin L, Tay J. (2004).** The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J Bacteriol.* 110:251–256.
- Lugones LG, De Jong JF, De Vries OMH, Jalving R, Dijksterhuis J, Wösten HAB. (2004).** The SC15 protein of *Schizophyllum commune* mediates formation of aerial hyphae and attachment in the absence of the SC3 hydrophobin. *Mol Microbiol.* 53:707-716.
- MacEachran DP and O’Toole GA. (2007).** Do not fear commitment: the initial transition to a surface lifestyle by Pseudomonads. In: Kjelleberg S and Givskov M (Eds), *The biofilm mode of life – mechanisms and adaptations*, pp 23-35. Horizon Biosciences, Wymondham Norfolk, UK.
- Martienssen M. (2001).** Leistungen immobilisierter Mikroorganismen bei der Eliminierung von Umweltschadstoffen. Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Moons P, Michiels CW, Aertsen A. (2009).** Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 35(3):157–168.
- Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb.* 59(3):695–700.
- Palmer J, Flint S, Brooks J. (2007).** Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biot.* 34(9):577–588.
- Park DC, Kim YS, Han DK, Kim YH, Lee EH, Suh H, Choi KS. (1998).** Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces. *Biomaterials.* 19:851–859.
- Peng JS, Tsai WC, Chou CC. (2001).** Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *Int J Food Microbiol.* 65:105–111.
- Quirynen M and Bollen CM. (1995).** The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 22:1–14.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J, Darius PL, Van Steenberghe D. (1989). The influence of surface free-energy on planimetric plaque growth in man. *J Dent Res.* 68(5):796-799.

Ratner B and Hoffman AS. (2004). Physicochemical surface modification of materials used in medicine. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (Eds), *Bio-materials Science*, pp. 201–218. Elsevier, San Diego, USA.

Reasoner DJ and Geldreich EE. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microb.* 1:1–7.

Rieder A, Schwartz T, Schön-Hölz K, Marten SM, Süß J, Gusbeth C, Kohnen W, Swoboda W, Obst U, Frey W. (2008). Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field (PEF) treatment of clinical wastewater. *J Appl Microbiol.* 105:2035–2045.

Rosenhahn A, Ederth T, Pettitt ME. (2008). Advanced nanostructures for the control of biofouling: The FP6 EU Integrated Project AMBIO. *Biointerphases.* 3(1):IR1–5.

Rumpf A. (2009). Effekte elektrischer Polarisierung leitender Oberflächen auf die bakterielle Primäradhäsion und Biofilmentwicklung. Dissertation, Universität Duisburg-Essen.

Santhiya D, Burghard Z, Greiner C, Jeurgens LP, Subkowski T, Bill J. (2010). Bioinspired deposition of TiO₂ thin films induced by hydrophobins. *Langmuir.* 26(9):6494–6502.

Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.* 184(4):1140-1154.

Sauerbrey, G. (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und Mikrowägung. *Z Phys.* 155:206–222.

Schmoll M, Seibel C, Kotlowski C, Wöllert Genannt Vendt F, Liebmann B, Kubicek CP. (2010). Recombinant production of an *Aspergillus nidulans* class I hydrophobin (DewA) in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) is promoter-dependent. *Appl Microbiol Biot.* 88(1):95–103.

Scholtmeijer K, Wessels JG, Wösten HA. (2001). Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biot.* 56(1–2):1–8.

Schopf JW, Hayes JM, Walter MR. (1983). Evolution on earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems. In: Schopf JW (Ed), *Earth's earliest biosphere*, pp 361-384. Princeton University Press, New Jersey, USA.

- Schuren FHJ and Wessels JGH. (1990).** Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by matingtype genes. *Gene*. 90:199-205.
- Sigg L and Stumm W. (1994).** *Aquatische Chemie – Eine Einführung in die Chemie wässriger Lösungen und natürlicher Gewässer*, 3. Auflage. Teubner, Stuttgart, Deutschland.
- Slizskaia-Boxerman I. (2011).** Biofunktionalisierung von Gold-Nanostrukturen mit Plasma-Fibronektin. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Smeltzer MS, Nelson CL, Evans RP. (2009).** Biofilms and aseptic loosening. In: Shirtliff M and Leid JG (Eds), *The role of biofilms in device-related infections*, pp 57–74. Springer, Berlin, Deutschland.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*. 56:187-209.
- Suidan MT and Nakhla GF. (1988).** Anaerobic fluidized-bed treatment of hazardous wastes. In: Omenn GS (Ed), *Environmental biotechnology: reducing risks from environmental chemicals through biotechnology*, pp 295-306. Plenum Press, New York, USA.
- Sunde M, Kwan AH, Templeton MD, Beaver RE, Mackay JP. (2008).** Structural analysis of hydrophobins. *Micron*. 39:773–784.
- Tegoulia VA and Cooper SL. (2002).** *Staphylococcus aureus* adhesion to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and fibrinogen presence. *Colloid Surface B*. 24:217-228.
- Väisänen OM, Weber A, Bennasar A, Rainey FA, Busse HJ, Salkinoja-Salonen MS. (1998).** Microbial communities of printing paper machines. *J Appl Microbiol*. 84:1069-1084.
- Van der Mei HC, Rosenberg M, Busscher HJ. (1991).** Assessment of microbial cell surface hydrophobicity. In: Mozes N, Handley PS, Busscher HJ, Rouxhet PG (Eds), *Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods*, pp 263-287. VCH Publishers, New York, USA.
- Van der Vegt W, Van der Mei HC, Wösten HAB, Wessels JGH, Busscher HJ. (1996).** A comparison of the surface activity of the fungal hydrophobin SC3p with those of other proteins. *Biophys Chem*. 57:253-260.
- Van Loosdrecht M, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ. (1987).** The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microb*. 53:1893–1897.

- Van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ. (1989).** Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microb Ecol.* 17:1-15.
- Van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ. (1990).** Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev.* 54(1):75-87.
- Van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RC. (1988).** Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem Rev.* 88:927-941.
- Van Oss CJ, Good RJ, MK Chaudhury. (1986).** The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in "hydrophobic interactions" between biopolymers and low energy surfaces. *J Colloid Interf Sci.* 111:378-390.
- Van Oss CJ. (1995).** Hydrophobicity of biosurfaces - origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloid Surface B.* 5:91-110.
- Van Oss CJ. (1997).** Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. *Curr Opin Colloid In.* 2:503–512.
- Van Pelt AWJ, Weerkamp AH, Uyen MHW, Busscher HJ, De Jong HP, Arends J. (1985).** Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Appl Environ Microb.* 49:1270-1275.
- Viel B. (2007).** Strukturierte Kolloidpartikel für ultrahydrophobe, schmutzabweisende Oberflächen. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- Watnick P and Kolter R. (2000).** Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 182(10):2675–2679.
- Weerkamp AH, Quirynen M, Marechal M, Van der Mei HC, Van Steenberghe D, Busscher HJ. (1989).** The role of surface free energy in the early in vivo formation of dental plaque on human enamel and polymeric substrata. *Microb Ecol Health D.* 2:11-18.
- Wegerer A, Sun T, Altenbuchner J. (2008).** Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations. *BMC Biotechnol.* 8:2.
- Wessels JGH. (1994).** Developmental regulation of fungal cell-wall formation. *Annu Rev Phytopathol.* 32:413-437.
- Wessels JGH. (1997).** Hydrophobins, proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol.* 38:1–45
- Wilms B, Wiese A, Syldatk C, Mattes R, Altenbuchner J, Pietzsch M. (1999).** Cloning, nucleotide sequence and expression of a new L-N-carbamoylase gene from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 in *E. coli*. *J Biotechnol.* 68:101–113.

Wirtanen G and Salo S. (2003). Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2:293-306.

Wohlleben W, Subkowski T, Bollschweiler C, Von Vacano B, Liu Y, Schrepp W, Baus U. (2010). Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *Eur Biophys J.* 39(3):457–468.

Wösten HAB and De Vocht ML. (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim Biophys Acta.* 1469(2):79–86.

Wösten HAB and Wessels JGH. (1997). Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience.* 38:363-374.

Wösten HAB, Asgeirsdóttir SA, Krook JH, Drenth JH, Wessels JGH. (1994). The fungal hydrophobin Sc3p self-assembles at the surface of aerial hyphae as a protein membrane constituting the hydrophobic rodlet layer. *Eur J Cell Biol.* 63:122-129.

Wösten HAB, De Vries O, Wessels J. (1993). Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell.* 5(11):1567–1574.

Wösten HAB, Schuren FH, Wessels JG. (1994). Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* 13(24):5848–5854.

Wösten HAB, Van Wetter MA, Lugones SG, Van der Mey HC, Busscher HJ, Wessels JGH. (1999). How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr Biol.* 9:85-88.

Wösten HAB. (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Ann Rev Microbiol.* 55:625-646.

Zampieri F, Wösten HAB, Scholtmeijer K. (2010). Creating surface properties using a palette of hydrophobins. *Materials.* 3:4607–4625.

Zobell CE. (1943). The effect of solid surfaces on bacterial activity. *J Bacteriol.* 43:39-56.

Quellenangaben Abbildungen

Abbildung 1 (von links nach rechts)

- www.draco.de/wunden/wundstadien/ (30. Oktober 2012)
- www.checkdent.com/dental-blog/plaque-zahnplaque-zahnbelag-entfernen.html (30. Oktober 2012)
- eigene Aufnahme
- www.evu-gruppe.de/de/innovative-umwelttechnik/erweiterung-und-ertuechtigung.html (30. Oktober 2012)
- www.baulinks.de/webplugin/2008/1640.php4 (30. Oktober 2012)
- www.haustechnikdialog.de/SHKWissen/Showimage.aspx?ID=4347 (30. Oktober 2012)
- en.wikipedia.org/wiki/Biofouling (30. Oktober 2012)
- www.isb-watertec.de/anwendung1.php (30. Oktober 2012)
- seawaterfouling.wikispaces.com/What+is+Biofouling%3F (30. Oktober 2012)
- www.dbu.de/123artikel25453_.html (30. Oktober 2012)

Abbildung 7 (von links nach rechts)

- <http://www.online-utility.org/image/gallery.jsp?title=Schizophyllum+commune> (30. Oktober 2012)
- <http://www.natur-portrait.de/foto-11835-einzelgaenger.html> (30. Oktober 2012)
- Aufnahme zur Verfügung gestellt von Jörg Hucklenbroich

DANKSAGUNG

PROF. DR. REINHARD FISCHER möchte ich herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme des Gutachtens, die Koordination des BMBF-Projektes, in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist, und die fachlichen Diskussionen und das Interesse an dieser Arbeit danken.

PROF. DR. JOHANNES GESCHER danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Korreferates und das Interesse an dieser Arbeit.

Für die freundliche Aufnahme in Ihre Abteilung und die Möglichkeit meine Arbeit am Institut für Funktionelle Grenzflächen anzufertigen, möchte ich mich bei PROF. DR. URSULA OBST bedanken. Darüber hinaus danke ich Ihr für die fachlichen Diskussionen und zahlreichen Ratschläge und die Möglichkeit viele wissenschaftliche Erfahrungen, auch über das Thema der Dissertation hinaus, zu sammeln.

DR. THOMAS SCHWARTZ danke ich ganz herzlich für die fortwährende Unterstützung und die vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen im Verlauf dieser Arbeit. Ich danke Ihm für die Freiheit und Möglichkeit viele Sachen auszuprobieren, die Korrekturen und Anmerkungen bei allen schriftlichen Ausarbeitungen und vor allem die Ermutigung bei Tiefpunkten und die vielen netten Gespräche.

Ein Dank gilt auch meinen Projektpartnern: Der BASF-SE, für die Bereitstellung der rekombinanten Fusionshydrophobine H*Protein A und H*Protein B und DR. JULIO RODRIGUEZ, BEATRICE GUTT und JULIA ZOLLER für die gemeinsamen Schritte mit den Hydrophobinen.

Der VILLEROY & BOCH AG danke ich für die Bereitstellung der Keramikproben.

TATJANA LADNORG danke ich für die AFM-Aufnahmen der Hydrophobin-beschichteten Oberflächen und die vielen kleinen Projekte, die wir zusammen durchgeführt haben.

DR. MARK-OLIVER DIESNER und MARTIN SCHMUCK danke ich für die REM-Aufnahmen und die Durchführung der IRRAS-Messungen.

DR. XIA STAMMER danke ich für die umfassende Einführung in die QCM-D Messtechnik.

DR. ANDRE PETERSHANS und IMMANUEL SCHÄUFELE danke ich für die Einführung in die Kontaktwinkelmessungen.

PREETHNE NARAYANAN danke ich für Ihren Beitrag zu meiner Doktorarbeit im Rahmen Ihrer Studienarbeit.

DR. GERALD BRENNER-WEIß und DR. JÖRG OVERHAGE danke ich ganz herzlich für die fachliche (und moralische) Unterstützung bei allen Fragen.

Ein großes Dankeschön an FRANK KIRSCHHÖFER und BORIS KÜHL für die Unterstützung und fachlichen Diskussionen bei der Hydrophobin-Modifikation. SIEGFRIED HOHMANN danke ich in diesem Zusammenhang für die QCM-D und ergänzenden MALDI-ToF Messungen.

Ein ganz großer Dank an SILKE KIRCHEN und MAREIKE MARTEN für die stetige Hilfe und die immer offenen Ohren bei kleinen und großen Problemen im (Labor)alltag. Danke für die Unterstützung bei größeren Versuchsansätzen, dem Biofilmreaktordesign, am Mikroskop, bei der Populationsanalyse, ... und für die gemeinsame Zeit auch außerhalb des Labors.

TANJA KLEINTSCHEK danke ich ebenfalls für die Ihre Hilfe und Unterstützung.

Allen aktuellen und ehemaligen MITGLIEDERN DER ABTEILUNG MIKROBIOLOGIE AN NATÜRLICHEN UND TECHNISCHEN GRENZFLÄCHEN danke ich ganz herzlich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft. Danke für die vielen lustigen Stunden im Labor, beim Mittagessen im Pausenraum oder auch bei den gemeinsamen „Kreativabenden“.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei RAINER UND SIEGRID fürs Korrekturlesen und das große „Doktorarbeits-Endspurt-Packet“ bedanken.

Aufrichtig bedanken möchte ich mich bei meiner Familie - PAPA, ALEX UND KATHA. Danke für Eure fortwährende Unterstützung und Euer großes Verständnis.

Meinen beiden Ks danke ich von ganzem Herzen für Ihre Unterstützung, Motivation und Geduld und dafür, dass sie mir immer wieder die schönen Seiten des Lebens vor Augen führen :-)