

Aus dem Bereich Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Infektionsmedizin
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Rasterkraftmikroskopie zur Untersuchung der Adhäsion
opportunistisch-pathogener Mikroorganismen auf authentischen,
klinisch-relevanten Oberflächen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2022

vorgelegt von: Gubesh Gunaratnam
geb. am: 03.11.1989 in Soest

Dargestellte Abbildungen und Texte dieser Dissertation sind in Teilen eine Reproduktion der Inhalte aus den unten aufgeführten drei Publikationen. Eine vollständige Publikationsübersicht des Verfassers dieser Arbeit findet sich im Abschnitt „Publikationen und Kongressbeiträge“.

- **Gunaratnam, G.**, Tuscherr, L., Elhawy, M.I., Bertram, R., Eisenbeis, J., Spengler, C., Tschernig, T., Löffler, B., Somerville, G.A., Jacobs, K., Herrmann, M., Bischoff, M., 2019. ClpC affects the intracellular survival capacity of *Staphylococcus aureus* in non-professional phagocytic cells. **Sci. Rep. 9, 16267**

- **Gunaratnam, G.**, Spengler, C., Trautmann, S., Jung, P., Mischo, J., Wieland, B., Metz, C., Becker, S.L., Hannig, M., Jacobs, K., Bischoff, M., 2020. Human blood plasma factors affect the adhesion kinetics of *Staphylococcus aureus* to central venous catheters. **Sci. Rep. 10, 20992**

- **Gunaratnam, G.***, Dudek, J.*, Jung, P., Becker, S.L., Jacobs, K., Bischoff, M., Hannig, M., 2021. Quantification of the Adhesion Strength of *Candida albicans* to Tooth Enamel. **Microorganisms 9, 2213**
* Geteilte Autorenschaft

Die folgende Liste enthält Abbildungen und Tabellen dieser Dissertation, die aus den o. g. Publikationen reproduziert und zur Einhaltung eines einheitlichen Stils der Dissertation teilweise adaptiert wurden.

<u>Abbildung/ Tabelle in der Dissertation</u>	<u>Publikation</u>
Abb. 11: Topografien der ZVK-Typen I bis III.	Gunaratnam <i>et al.</i> , 2020
Abb. 12: AFM-Rückzugskurven von individuellen von <i>S. aureus</i> -Bakterienzellen der Stämme HOM 6 und HOM 433 auf den ZVK-Typen I-III	Gunaratnam <i>et al.</i> , 2020
Abb. 13: Positionsabhängige und zellindividuelle Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> auf ZVK-Oberflächen	Gunaratnam <i>et al.</i> , 2020
Abb. 14: Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> HOM 6 und HOM 433 auf den ZVK-Typen I-III.	Gunaratnam <i>et al.</i> , 2020
Abb. 20: Einfluss von humanen Blutplasmakomponenten auf die Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> auf ZVK-Oberflächen.	Gunaratnam <i>et al.</i> , 2020
Abb. 21 A: Die Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> HOM 6 und HOM 433 auf explantierten ZVKs.	Gunaratnam <i>et al.</i> , 2020
Abb. 22 A: Einfluss von HSA und HFg auf die Adhäsionskraft von <i>S. aureus</i> auf ZVKs und Modulation des <i>Snap-in</i> -Events durch HSA.	Gunaratnam <i>et al.</i> , 2020
Abb. 23: Untersuchung der Adhäsionskraft und Abreißlänge von <i>S. aureus</i> HOM 415 und der homologen $\Delta clpC$ -Mutante HOM 416 auf humanen Endothelzellen.	Gunaratnam <i>et al.</i> , 2019
Abb. 24: Adhäsionskräfte von unbehandelten <i>C. albicans</i> -Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern mit oder ohne Speichelpellikel	Gunaratnam <i>et al.</i> , 2021

- Abb. 25:** Rückzugskurven, Abreißlängen und Adhäsionsenergien von unbehandelten *C. albicans*-Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern Gunaratnam *et al.*, 2021
- Abb. 26:** Adhäsionskräfte von *C. albicans*- Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern nach einer Behandlung der Zellen in Speichel. Gunaratnam *et al.*, 2021
- Abb. 27:** Adhäsionskräfte von speichelbehandelten *C. albicans*-Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern mit oder ohne Speichelpellikel. Gunaratnam *et al.*, 2021
- Abb. 28:** Überlagerung von Kraft-Distanz-Kurven von unbehandelten oder speichelbehandelten *C. albicans*-Zellen auf *in situ*-Pellikeln des Zahnschmelzes Gunaratnam *et al.*, 2021
- Tab. 11:** Oberflächeneigenschaften der ZVK-Typen I-III. Gunaratnam *et al.*, 2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	viii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
1 Zusammenfassung	xiii
2 Einleitung	1
2.1 Kolonisierende opportunistische Krankheitserreger des Menschen.....	1
2.1.1 Das Bakterium <i>Staphylococcus aureus</i>	2
2.1.2 Der Hefepilz <i>Candida albicans</i>	4
2.2 Mikrobielle Adhäsion als Grundlage der Biofilmbildung.....	5
2.2.1 Unspezifische Adhäsionsmechanismen in Mikroorganismen.....	6
2.2.2 Spezifische Adhäsionsmechanismen in Mikroorganismen	9
2.3 Die Anhaftung von Mikroorganismen auf klinisch-relevanten Oberflächen	14
2.3.1 Oberflächenanhaftung von <i>S. aureus</i> auf Zentralen Venenkatheter (ZVK).....	14
2.3.2 Oberflächenanhaftung von <i>C. albicans</i> auf Zahnoberflächen bei Kindern	16
2.4 Adsorption von Wirtsfaktoren auf Substratoberflächen und ihre Bedeutung für die mikrobielle Adhäsion	17
2.4.1 Der Effekt von humanen Blutplasmaproteine auf die Adhäsion von <i>S. aureus</i>	18
2.4.2 Der Effekt von Speichelproteinen auf die Adhäsion von <i>C. albicans</i>	19
2.5 Traditionelle Adhäsionsassays mit Batch-Kulturen und moderne AFM-basierte Adhäsionsstudien.....	21
2.5.1 Mikrobiologische Adhäsionsstudien mit Batch-Kulturen	21
2.5.2 Adhäsionsstudien mit <i>S. aureus</i> auf Zentralen Venenkathetern.....	21
2.5.3 Adhäsionsstudien mit <i>C. albicans</i> auf Zahnschmelz.....	22
2.5.4 Bestimmung der Adhäsionsstärke einzelner pathogener Mikroorganismen mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM)	23
2.5.5 Möglichkeiten zur Anwendung des AFMs auf Medizinprodukten	25
2.6 Zielsetzung der Arbeit	26
3 Material & Methoden	27
3.1 Materialien.....	27
3.2 Humanes Probenmaterial.....	31
3.3 Mikrobiologische Methoden	32
3.3.1 Kultivierung und Kryokonservierung von <i>S. aureus</i>	32
3.3.2 Isolierung des klinischen Bakterienisolats HOM 433	32
3.3.3 Kultivierung und Kryokonservierung von Hefezellen	33

3.4	Rasterkraftmikroskopie	33
3.4.1	Einleitung zur Methodik.....	33
3.4.1.1	Modi zum Abbilden von topografischen und adhäsiven Substratoberflächen- Eigenschaften.....	36
3.4.1.2	Einzelzell-Kraftspektroskopie mit Mikroorganismen	37
3.4.2	Abbilden der Oberflächeneigenschaften von ZVKs im intermittierenden Kontaktmodus 38	
3.4.3	Einzelzell-Kraftspektroskopie mit <i>S. aureus</i> auf ZVKs	40
3.4.4	Einzelzell-Kraftspektroskopie mit <i>S. aureus</i> auf Endothelzellen.....	44
3.4.5	Einzelzell-Kraftspektroskopie mit <i>C. albicans</i> auf Zahnschmelzprüfkörpern	45
3.4.6	Auswertung von Kraft-Distanz-Kurven	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Bestimmung der Oberflächenmaterialeigenschaften von ZVK-Typ I-III mit Relevanz für die Bakterienadhäsion	49
4.2	Bestimmung der Adhäsionsstärke von <i>S. aureus</i> HOM 6 und HOM 433 auf ZVK-Typ I- III.....	52
4.3	Bakterielle <i>Snap-in</i> -Kräfte auf ZVKs und der Einfluss von humanem Blutplasma (HBP)	57
4.4	Untersuchung des Einflusses von HBP auf die Oberflächentopografie und adhäsiven Eigenschaften von ZVKs am Beispiel von ZVK-Typ II	60
4.5	Untersuchung des Einflusses von HBP auf die Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> auf ZVKs 64	
4.6	Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> auf explantierten, nicht-infektiösen ZVKs	66
4.7	Humanes Serumalbumin und Fibrinogen und ihre Einflüsse auf die Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> auf ZVKs	67
4.8	Bestimmung der Adhäsionsstärke zwischen <i>S. aureus</i> HOM 415 und der Endothelialzelllinie Ea.hy926.....	69
4.9	Bestimmung der Adhäsionsstärke von <i>C. albicans</i> auf nativem oder speichelbeschichtetem Zahnschmelz.....	71
4.10	Bestimmung der Adhäsionsstärke von speichelbehandelten <i>C. albicans</i> -Zellen auf Zahnschmelz.....	74
5	Diskussion.....	78
5.1	Die Oberflächeneigenschaften von ZVK-Typ I-III	78
5.2	Die Adhäsions- und Annäherungsstärke von <i>S. aureus</i> auf ZVKs.....	81
5.2.1	Adhäsionskräfte und Adhäsionsenergien von <i>S. aureus</i> auf ZVKs.....	81
5.2.2	Der bakterielle Annäherungsprozess auf ZVKs und die Ermittlung der <i>Snap-in</i> -Kraft	83
5.3	Der Einfluss von HBP und ausgewählten HBP-Proteinen auf die Adhäsion von <i>S. aureus</i> auf ZVKs	84
5.3.1	Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> auf HBP-beschichteten ZVKs	84
5.3.2	HSA und HFG und ihre Bedeutung für die Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> auf ZVKs .	86
5.3.3	Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> auf explantierten Katheteroberflächen.....	88

5.3.4	Dekoration der Bakterienzelloberfläche mit HBP und Auswirkungen auf die Adhäsionskraft.....	89
5.4	Zusammenfassende Diskussion zur bakteriellen Adhäsionsstärke von <i>S. aureus</i> an unbeschichtete und biokonditionierte ZVKs	89
5.5	Die Adhäsionsstärke von <i>S. aureus</i> auf Endothelzellen	91
5.6	Die Adhäsionsstärke des opportunistischen Hefepilzes <i>C. albicans</i> auf Zahnschmelzprüfkörpern.....	92
5.6.1	Die Adhäsionsstärke von unbehandelten <i>C. albicans</i> -Zellen auf Zahnschmelzprüfkörpern und der Einfluss von Pellicel.....	92
5.6.2	Der Effekt einer Speicheldekoration der Zelloberfläche auf die Adhäsionsstärke von <i>C. albicans</i> auf Zahnschmelzprüfkörpern	94
5.7	Zusammenfassende Diskussion zur Adhäsionsstärke von <i>C. albicans</i> auf Zahnschmelz und potenzielle Adhäsionsmechanismen.....	96
5.8	Ausblick.....	97
6.	Literaturverzeichnis	98
7.	Publikationen/ Dank.....	118
8.	Lebenslauf	122

Abkürzungsverzeichnis

ad	lat. adde (auffüllen auf)
AFM	engl. atomic force microscopy, Rasterkraftmikroskop
ALS	engl. agglutinin-like sequence
bPRP	Basische prolinreiche Proteine
BSA	engl. bovine serum albumin
<i>C. albicans</i>	engl. <i>Candida albicans</i>
CABSI	engl. catheter-associated bloodstream infection; primäre Blutstrominfektion, die nicht vom inserierten Gefäßkatheter ausgeht
ClpC	ATP-abhängige Clp-Protease
CRBSI	engl. catheter-related bloodstream infection; Blutstrominfektion, die gesichert oder wahrscheinlich vom Gefäßkatheter ausgeht
ClfA und -B	engl. clumping Factor A and B; Fibrinogen-Bindeproteine A und B
CVC	engl. central venous catheter
d	Tag
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECC	engl. early childhood caries
<i>et al.</i>	lat. et alii (und andere)
F _{adh}	Adhäsionskraft
F _{Snap}	Snap-in-Kraft (engl. snap in)
Fg	Fibrinogen
FnbpA und -B	Fibronectin-Bindeproteine A und B
E _{adh}	Adhäsionsenergie
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H ₂ O _{rein}	filtriertes und autoklaviertes Wasser
HAP	Hydroxylapatit
HFg	Humanes Fibrinogen
HSA	Humanes Serumalbumin
HUVEC	engl. human umbilical vein endothelial cells
Ig	Immunglobulin
IMMH	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar
ITS	engl. internal transcribed spacer
kDa	Kilodalton
MALDI-TOF	engl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight
MSCRAMM	engl. Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix

	Molecules
MRSA	engl. methicilin-resistant Staphylococcus aureus
MSSA	engl. methicillin-sensitive Staphylococcus aureus
nom	nominal
o. g.	oben genannt
OTS	Octadecyltrichlorosilan
PBS	engl. phosphate-buffered saline
RMS	engl. Root mean-square (roughness)
rRNA	engl. ribosomal ribonucleic acid
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCFS	engl. single-cell force spectroscopy, Einzelzellkraftspektroskopie
spp.	Abkürzung für Spezies (Plural von sp.)
SERAM	engl. Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules
SHORE	Kennzahl und Maß zur Werkstoffhärte; benannt nach Albert F. Shore
TSB	engl. tryptic soy broth
vdW	van der Waals(-Kräfte)
vgl.	vergleiche
xDLVO	Erweiterung der Theorie von Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek
YPG	engl. Yeast Extract-Peptide-Glycerol
ZVK	Zentraler Venenkatheter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adhäsion von kolonisierenden opportunistischen Krankheitserregern.	2
Abbildung 2: Adhäsion als Stadium der Biofilmbildung bei kolonisierenden opportunistischen Erregern.	5
Abbildung 3: Zellwand-gebundene Adhäsionsfaktoren in <i>S. aureus</i> (links) und <i>C. albicans</i> (rechts).	10
Abbildung 4: Die vier potenziellen Kontaminationsrouten und -quellen bei der Entstehung von ZVK-Infektionen.	16
Abbildung 5: Hochauflösende Aufnahmen der Zahnschmelzoberfläche.	23
Abbildung 6: Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops beim Abbildeprozess von Substratoberflächen.	34
Abbildung 7: Quantifizierbare Adhäsionsparameter aus einer rasterkraftmikroskopischen Kraft-Distanz-Messung.	36
Abbildung 8: Polydopamin-basierte Funktionalisierung von AFM-Federbalken mit individuellen, viablen Bakterien.	37
Abbildung 9: FluidFM-basierte Funktionalisierungsmethode zur Anbringung von individuellen Zellen an eine AFM-Mikropipette.	38
Abbildung 10: Optischer Annäherungsprozess der AFM-Bakteriensonde auf die ZVK-Oberfläche mithilfe eines Inversmikroskops.	43
Abbildung 11: Topografien der ZVK-Typen I bis III.	49
Abbildung 12: AFM-Rückzugskurven von individuellen <i>S. aureus</i> -Bakterienzellen auf den ZVK-Typen I-III.	53
Abbildung 13: Positionsabhängige und zellindividuelle Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> auf ZVK-Oberflächen.	54
Abbildung 14: Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> HOM 6 und HOM 433 auf den ZVK-Typen I-III.	55
Abbildung 15: Adhäsionsenergien von <i>S. aureus</i> HOM 6 und HOM 433 auf den ZVK-Typen I bis III.	56
Abbildung 16: Snap-in-Kräfte von <i>S. aureus</i> HOM 6 und HOM 433 auf den Oberflächen von ZVK-Typ I-III.	58
Abbildung 17: Einfluss von ZVK-adsorbierten Blutplasmakomponenten auf die <i>Snap-in</i> -Kraft von <i>S. aureus</i>	60
Abbildung 18: Der Einfluss von adsorbierten Blutplasmakomponenten auf die Topografie der ZVK-Oberfläche.	61
Abbildung 19: Adhäsionskräfte zwischen AFM-Messspitze und ZVK-Oberfläche ohne oder mit adsorbierten Blutplasmakomponenten.	63

Abbildung 20: Einfluss von humanen Blutplasmakomponenten auf die Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> auf ZVK-Oberflächen.....	65
Abbildung 21: Die Adhäsionskräfte von <i>S. aureus</i> HOM 6 und HOM 433 auf explantierten ZVKs...	67
Abbildung 22: Einfluss von HSA und HFG auf die Adhäsionskraft von <i>S. aureus</i> auf ZVKs und Modulation des <i>Snap-in</i> -Events durch HSA.	68
Abbildung 23: Untersuchung der Adhäsionskraft und Abreißlänge von <i>S. aureus</i> HOM 415 und der homologen <i>ΔclpC</i> -Mutante HOM 416 auf humanen Endothelzellen.....	71
Abbildung 24: Adhäsionskräfte von unbehandelten <i>C. albicans</i> -Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern mit oder ohne Speichelpellikel.	72
Abbildung 25: Rückzugskurven, Abreißlängen und Adhäsionsenergien von unbehandelten <i>C. albicans</i> -Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern.	73
Abbildung 26: Adhäsionskräfte von speichelbehandelten <i>C. albicans</i> -Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern mit oder ohne Speichelpellikel.	75
Abbildung 27: Rückzugskurven, Abreißlängen und Adhäsionsenergien von speichelbehandelten <i>C. albicans</i> -Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern.	76
Abbildung 28: Überlagerung von Kraft-Distanz-Kurven von unbehandelten oder speichelbehandelten <i>C. albicans</i> -Zellen auf <i>in situ</i> -Pellikeln des Zahnschmelzes.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Interaktion bzw. Kräfte mit einer wichtigen Funktion bei der mikrobiellen Adhäsion.....	7
Tabelle 2: Ausgewählte Wirtsfaktoren aus Blutplasma bzw. Speichel und ihr Einfluss auf die Adhäsion von <i>S. aureus</i> bzw. <i>C. albicans</i>	19
Tabelle 3: AFM-Geräte und Zubehör.....	27
Tabelle 4: Chemikalien.....	27
Tabelle 5: Laborgeräte und Systeme.....	28
Tabelle 6: Mikrobiologische Isolate.....	29
Tabelle 7: Eukaryotische Zelllinien.....	29
Tabelle 8: Lösungen.....	29
Tabelle 8: Software.....	30
Tabelle 9: Medizinprodukte.....	30
Tabelle 11: Oberflächeneigenschaften der ZVK-Typen I-III.....	51
Tabelle 12: Vergleich von Adhäsionskraft F_{adh} und Adhäsionsenergie E_{adh} zwischen HOM 6 und HOM 433.....	56

1 Zusammenfassung

Die Rasterkraftmikroskopie-basierte, Einzelzell-kraftspektroskopische Quantifizierung der Adhäsionsstärke von opportunistisch-pathogenen Mikroorganismen auf klinisch-relevanten Oberflächen, wie dem Zentralen Venenkatheter oder dem Zahnschmelz, ermöglichen es, den biophysikalischen Mechanismus hinter der Adhäsion besser zu verstehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Adhäsion von individuellen *Staphylococcus aureus*-Zellen auf Zentralen Venenkathetern und von *Candida albicans*-Zellen auf Zahnschmelz untersucht. Dabei standen ihre Adhäsionsvermögen an die jeweiligen nativen Substratoberflächen sowie von *S. aureus* in Gegenwart von humanem Blutplasma und von *C. albicans* in Gegenwart von humanem Speichel im Vordergrund. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf Zentralen Venenkathetern und von *C. albicans* auf Zahnschmelz auf den unbehandelten Substratoberflächen im geringen ein- bis zweistelligen Nanonewton-Bereich bewegten. Eine Biokonditionierung der Substratoberflächen mit humanem Blutplasma oder mit Speichel zeigte einen unterschiedlichen Effekt bei der Adhäsion: Während eine Speichelbeschichtung des Zahnschmelzes die Adhäsionskräfte von *C. albicans*-Zellen signifikant erhöhte, führte eine Blutplasmabeschichtung des Zentralen Venenkatheters zu einer signifikanten Reduzierung der Adhäsionskräfte von *S. aureus*. Die starke Adhäsion von *C. albicans* auf speichelbeschichtetem Zahnschmelz konnte auch auf oral-behandelten, *in situ*-biokonditionierten Zahnschmelzprüfkörpern gezeigt werden. Aufgrund des starken negativen Effekts von humanem Blutplasma auf das initiale Adhäsionsvermögen von *S. aureus* auf Zentrale Venenkathetern wurden weiterführende Studien der Einzelzellkraftspektroskopie mit explantierten Zentralen Venenkathetern aus der Klinik, oder nach Adsorption von ausgewählten Blutplasmaproteinen auf dem Substrat durchgeführt. Explantierte Substratoberflächen zeigten dabei eine ähnliche Minimierung der Adhäsionskräfte wie nach einer *in vitro*-Behandlung des Substrats mit humanem Blutplasma. Unter den ausgewählten Blutplasmaproteinen konnte Humanes Serumalbumin als ein starker negativer Effektor der Adhäsion von *S. aureus* auf Zentralen Venenkathetern identifiziert werden. Fibrinogen, ein in der Literatur etablierter Faktor bei der Adhäsion von *S. aureus*, induzierte interessanterweise ebenfalls eine Abnahme der Adhäsionskräfte, jedoch in einem begrenzteren Umfang als humanes Serumalbumin. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Arbeit die Rasterkraftmikroskopie-basierte Einzelzellkraftspektroskopie erstmalig auf authentischen, klinisch-relevanten Oberflächen durchgeführt wurde. Substratoberflächen wurden ebenfalls *in vitro* mit relevanten Körperflüssigkeiten behandelt, die einen starken Effekt auf die Adhäsion des jeweiligen Mikroorganismus ausübten. Die resultierende Adhäsionsstärke war auf diesen biokonditionierten Substratoberflächen und auf *ex situ* isolierten bzw. *in situ*-behandelten Substratoberflächen vergleichbar, was ein klares Indiz dafür darstellt, dass die *in vitro* produzierten Daten ein gutes Abbild der *in vivo*-Situation wiedergeben.

Die Einzelzellkraftspektroskopie wurde auch zur Bestimmung der Adhäsionsstärke von *S. aureus* auf Endothelzellen nach Inaktivierung des Hitzeschockproteins ClpC, einem Modulator der bakteriellen

Überlebensfähigkeit in Wirtszellen, angewendet. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Adhäsionsstärke zwischen einem ClpC-produzierenden *S. aureus*-Stamm und einer *clpC*-Deletionsmutante. Daraus konnte gefolgert werden, dass das ClpC-abhängige Überleben des Bakteriums in der Wirtszelle nicht über eine Regulation des bakteriellen Adhäsionsvermögens an die Wirtszelloberfläche erfolgt.

Atomic force microscopy to investigate the adhesion of opportunistic-pathogenic microorganisms to authentic, clinically relevant surfaces

Summary

Atomic force microscopy-based single-cell force spectroscopy enables the quantification of the adhesion strength of microorganisms to clinically relevant surfaces, such as central venous catheters or tooth enamel surfaces. With this technique, it is possible to uncover biophysical adhesion mechanisms, which have not been discovered yet.

In this work, the adhesion strengths of *Staphylococcus aureus* to the tubing of central venous catheters and of *Candida albicans* to tooth enamel specimen were investigated. Chiefly, the adhesion of individual cells of each species was tested to the respective naïve surfaces, as well as to human blood plasma-treated central venous catheters for *S. aureus*, and to saliva-treated tooth enamel for *C. albicans*. The results show that the adhesion forces for *S. aureus* to the catheter and for *C. albicans* to the tooth enamel were in the lower nanonewton range. When surfaces were preincubated with the respective bodily fluids, we found a different effect on adhesion: While a coating of tooth enamel with saliva resulted in a significant increase of *C. albicans* adhesion forces, the deposition of human blood plasma reduced the adhesion forces of *S. aureus* significantly. The strong adhesion of *C. albicans* to saliva-treated tooth enamel could also be reproduced on orally treated, *in situ*-coated tooth enamel specimen.

Due to the strong negative impact of human blood plasma on the adhesion capacity of *S. aureus* to central venous-catheter tubing, further single-cell force spectroscopy studies were conducted with explanted central venous catheters from the clinics or after coating the substrate surface with selected blood plasma proteins. *S. aureus* cells tested on explanted surfaces showed a similar reduction in adhesion forces as observed with the *in vitro*-treated catheter surfaces. Among selected blood plasma proteins, human serum albumin was identified as a negative effector of the adhesion of *S. aureus* to central venous catheters. Fibrinogen, a factor known to promote adhesion of *S. aureus* to host cells and tissues, interestingly, also induced a reduction of adhesion forces, albeit not to the same degree as albumin.

In conclusion, this work established atomic force microscopy-based single-cell force spectroscopy for the first time on authentic, clinically relevant surfaces. Substrate surfaces were either untreated or treated *in vitro* with the relevant bodily fluids, which had a tremendous effect on the adhesion of the microorganisms to the respective surface. Importantly, the resulting adhesion strengths were comparable

to the adhesion strengths recorded on *ex vivo*- or *in situ*-coated substrate surfaces, suggesting that the *in vitro* data produced with this assay can be related to the *in vivo* situation.

Furthermore, this technique could be used to quantify the adhesion strength of *S. aureus* to endothelial cells after inactivation of ClpC, a modulator of bacterial survival in host cells. Here, no significant difference was found in the adhesion strengths between a ClpC-producing *S. aureus* and a *clpC* deletion mutant. It was concluded that the ClpC-dependent survival of the bacterium in the host cell does not result from a regulation of the adhesion strength to the epithelial cell surface.

2 Einleitung

2.1 Kolonisierende opportunistische Krankheitserreger des Menschen

Die Bezeichnung „Opportunistischer Krankheitserreger“ definiert eine größere Gruppe von mikrobiellen Organismen, die gelegentlich lokale oder lebensbedrohliche Infektionen im Wirt verursachen. Mit „kolonisierenden opportunistischen Krankheitserregern“ soll dabei jene Gruppe gemeint sein, die den menschlichen Wirt im Regelfall asymptomatisch besiedeln und einen Bestandteil der normalen Flora des Wirts bilden. Zu dieser Gruppe gehören bakterielle Mikroorganismen, wie etwa *Staphylococcus aureus*, und Pilze, wie *Candida albicans*. Parasiten, wie der Einzeller *Toxoplasma gondii*, oder Viren, wie das Herpes-Simplex-Virus, komplementieren diese Gruppe. Wirtsabhängige Faktoren beim Menschen wie Alter und Verhalten [225], Körperanatomie [38] und Gesundheitsstatus (hierbei zählen Immunkompetenz, mögliche Vorerkrankungen oder Fettleibigkeit [57,153,204]) können die Kolonisationsrate, und die Wahrscheinlichkeit, an einer (Re-)Infektion zu erkranken, markant beeinflussen [85].

Die mikrobielle Kolonisation von Oberflächen ist ein progressiver und dynamischer Vorgang, beginnend mit dem biophysikalischen Prozess der Adhäsion einzelner Mikroben an die Oberfläche (s. Abb. 1) und ihrer schrittweisen Vermehrung. Proliferierende Mikroben können weitere Artgenossen und artfremde Mikroorganismen rekrutieren und über interzelluläre Verknüpfungen in den Besiedlungsprozess einbauen. Die höchste Komplexität wird erreicht, wenn durch diese verzahnten Ereignisse dreidimensionale multizelluläre Gebilde, sogenannte mikrobielle Biofilme, entstehen. In solchen Konstrukten sind die mikrobiellen Zellen in eine schleimige Matrix aus mikrobiellen Exopolysacchariden, extrazellulärer DNA und Proteinen eingebettet [139]. Während die Bakterien innerhalb eines Biofilms an unterschiedliche Mikronischen angepasst sind und verschiedene Phänotypen und Funktionen annehmen, dienen planktonische Bakterien hauptsächlich zur Dissemination und Besiedlung neuer Oberflächen [60].

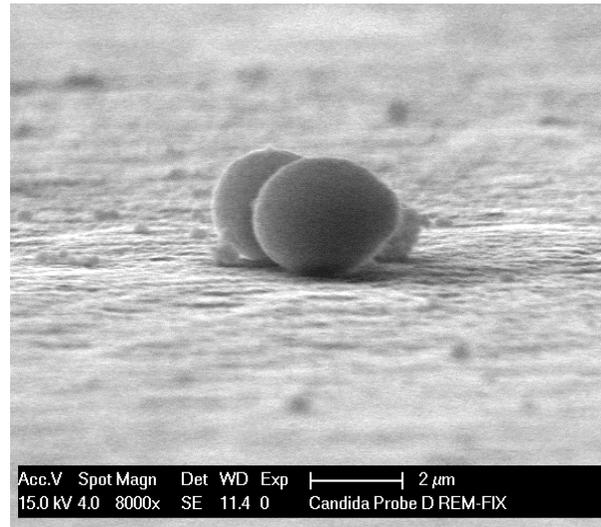
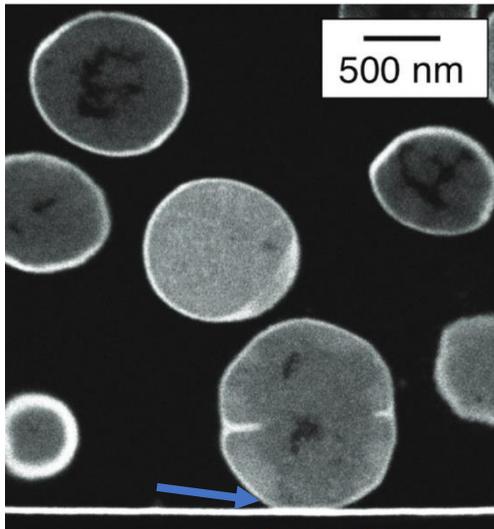


Abbildung 1: Adhäsion von kolonisierenden opportunistischen Krankheitserregern.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (links) eines Biofilmausschnitts mit einer adhären *Staphylococcus aureus*-Zelle auf einer abiotischen Goldoberfläche (Pfeil) und (rechts) einzelner *Candida albicans*-Zellen auf einer natürlich biokonditionierten Zahnoberfläche. (Links) Adaptiert nach [105], (rechts) Matthias Hannig, UKS Homburg.

Die initiale Adhäsion der mikrobielle Zelle an eine biotische/abiotische Oberfläche ist die Grundlage bei der Eroberung von neuen Habitaten und unter günstigen, nährstoffreichen und umweltfreundlichen (und selbst umweltfeindlichen) Bedingungen die Basis der Biofilmbildung [178]. Die Adhäsion bewirkt progressiv eine oft irreversible Verankerung der Zelle auf der Substratoberfläche, die Synthese von Proteinen durch den Vorgang der Mechanotransduktion, die wichtig für die Bildung von essentiellen Komponenten eines Biofilms sind, und trägt maßgeblich zur Dichte und Höhe des Biofilms bei [60,76,105]. Mikroben, die zu einer ausgeprägten Biofilmbildung fähig sind und im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden sollen, sind die beiden opportunistischen Humanpathogene *S. aureus* und *C. albicans*.

2.1.1 Das Bakterium *Staphylococcus aureus*

Etwa 20-30 % der gesunden Erwachsenen sind dauerhafte Träger des grampositiven Kokkenbakteriums *Staphylococcus aureus*, während bis zu weitere 47 % zumindest zeitweise mit diesem Bakterium besiedelt sein können [151,278,275,222]. Das Haupthabitat von *S. aureus* ist der Nasenrachenraum mit einem Schwerpunkt auf den Nasenvorhof [297]. Daneben können auch die Haut, und etwas seltener auch der Darm, mit diesem fakultativ anaeroben Bakterium besiedelt sein ohne dabei zwingend eine Infektion hervorzurufen. Mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 1 µm ist es nach der Gram-

Färbung unter dem Lichtmikroskop gut zu erkennen. Hierbei lassen sich die Bakterien, die sich gerne mit mehreren individuellen Bakterienzellen in Trauben-förmigen Clustern zusammenlagern, sehr gut von den ebenfalls opportunistisch-pathogenen, allerdings kettenförmigen Streptokokken, wie *Streptococcus pyogenes*, unterscheiden. Eine biochemische Methode zur Unterscheidung der Staphylokokken von den Streptokokken ist der Katalase-Nachweis, der bei Staphylokokken positiv verläuft. Von dem ebenfalls klinisch-relevanten und nahen Verwandten *Staphylococcus epidermidis* ist *S. aureus* über einen negativen Koagulase-Test differenzierbar. Neuerdings an Bedeutung gewinnende Keime wie *Staphylococcus argenteus* sind dagegen biochemisch schwer, durch hochtechnologische Methoden jedoch sicher von *S. aureus* abzugrenzen [7].

Viele *S. aureus*-Isolate besitzen eine erworbene Resistenz gegenüber klinischen Antibiotika, eine Beobachtung, die erstmals 1960 beim Penicillinase-festen β -Lactamderivat Methicillin gemacht wurde, und in die Erstbeschreibung vom Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) führte [212]. Heutzutage ist bekannt, dass die meisten im Krankenhausumfeld zirkulierenden MRSA neben ihrer Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika in der Regel auch noch gegen weitere Antibiotikaklassen resistent sind. Zur Bekämpfung dieser *S. aureus*-Varianten können üblicherweise nur noch Reserveantibiotika wie etwa das Glykopeptid Vancomycin oder das Lipopeptid Daptomycin eingesetzt werden [161]. Jedoch wird auch mit ihrer Hilfe eine Beseitigung des Keims nicht immer gewährleistet: Forscher fanden, dass selbst Reserveantibiotika in klinisch-relevanten Konzentrationen manchmal nicht zielführend waren, die Bakterienpopulation in einem effektiven Maße zu reduzieren, die es dem Immunsystem gestattet, die Infektion zu kontrollieren, wenn diese sich in Biofilmen anlagerten [28]. Schätzungen der jüngeren Vergangenheit gehen davon aus, dass bakterielle Biofilme für etwa 80% aller Infektionen des Menschen verantwortlich sind und eine erhebliche Rolle bei der Entstehung von akuten und chronischen Infektionskrankheiten spielen [234]. Daher werden alternative Kombinationen von Wirkstoffen oder Strategien zur Bekämpfung von diesen Biofilm-bildenden Keimen dringend benötigt. Infektionen mit *S. aureus* können zu einer Reihe von Krankheitsbildern, wie Infektionen der Haut- und Weichgewebe bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Blutstrominfektionen oder Endokarditiden, führen. *S. aureus* etabliert solche Infektionen auch über die Besiedlung von Implantaten wie dem Zentralen Venenkatheter (ZVK) oder künstliche Herzklappen [245,14,185,4,174].

2.1.2 Der Hefepilz *Candida albicans*

Candida albicans ist ein weiterer, bedeutender Vertreter der kolonisierenden opportunistischen Krankheitserreger des Menschen und gehört zu den sich asexuell vermehrenden Hefepilzen, solchen Einzellern, die sowohl durch Knospung als auch durch Hyphenbildung wachsen und sich vermehren können. *C. albicans* ist daher ein polymorpher Hefepilz aus (i) kompakten ovalförmigen Hefezellen, (ii) „echten“ Hyphen (elongierte Zellen, die intrazellulär miteinander verknüpft sind und über gemeinsame Poren verfügen) und (iii) Pseudohyphen (aneinandergereihte Hefezellen, denen gemeinsamen Poren fehlen) [167]. *C. albicans* besiedelt den Menschen an verschiedenen Habitaten, wie dem Gastrointestinal- oder Reproduktionstrakt, in der Mundhöhle, oder auf der Hautoberfläche [144,3,97,157]. Die Kolonisation der Mundhöhle gilt als Basis von oralen *Candida*-Infektionen, den oralen Candidosen, und wird auch als der Ursprung für eine weitere Dissemination des Hefekeims im Körper, darunter auch im Rahmen der gastrointestinalen Kolonisation angenommen [242]. Die Besiedlung der Mundhöhle mit *C. albicans* ist meist altersunabhängig und bis zu 67 % aller Kinder und 59 % aller Erwachsenen können mit *C. albicans* durchseucht sein [100]. Dementsprechend konnte der Keim bereits in Zahnfleischtaschen [69], Wurzelkanälen [15], auf orthodontischen Apparaturen, die direkt auf den Zähnen angebracht werden können [32], innerhalb von Zahnprothesen [170], und auf der Zahnschmelzoberfläche [24] nachgewiesen werden. Der kulturelle Nachweis von *C. albicans* erfolgt über spezielle Nährböden wie dem Candida-CHROM-Agar, einem selektiven Indikatormedium für verschiedene Arten der *Candida*-Gattung bei gleichzeitiger Wachstumshemmung von Bakterien. Weitere biochemische Tests ermöglichen die Identifizierung von *C. albicans* anhand von Zucker-Assimilationstests und enzymatischen Tests. Neben diesen Goldstandards der *C. albicans*-Diagnostik bietet eine Massenanalyse von *C. albicans*-Zellfragmenten über MALDI-TOF MS (engl. matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) eine rasche Identifikation dieser Spezies [217]. Klinisch bedeutsame Erkrankungen, die durch *C. albicans* verursacht werden können, sind Oberflächeninfektionen der Haut und Schleimhäute bis hin zu ernsthaften Blutstrominfektionen, die mit einer Mortalitätsrate von über 40% assoziiert sind [295,39,209]. In Deutschland ist dieser Keim verantwortlich für etwa 9,2 % aller nosokomialen Infektionen [94]. Antimykotische Therapien gegen *Candida* spp. lassen sich je nach Alter des Patienten, Grad und Ort der Infektion mit verschiedenen Wirkstoffen durchführen. Bei Neugeborenen und Kleinkindern sowie bei Erwachsenen mit mukokutanen, den Schleimhaut-betreffenden, Infektionen wird häufig der Ergosterolsynthese-Inhibitor Fluconazol verwendet. Bei systemischen Infektionen werden u.a. der 1,3- β -D-Glukansynthese-Inhibitor Caspofungin oder der Porenbildner Amphotericin B verwendet. Ein erheblicher Nachteil bei der Anwendung von Antimykotika sind die häufigen Wechselwirkungen mit humanen Wirkungsstrukturen, wie etwa die Hemmung von Enzymen. Der Grund hierfür liegt in der Ähnlichkeit von potenziellen Zielstrukturen in Pilz und Mensch. Daher benötigt eine Therapie mit beispielsweise Fluconazol zur Bekämpfung von *C. albicans*- Infektionen bei werdenden Müttern eine hohe Wirkstoff-Konzentration

bei etwa 400 – 800 mg/d. Dadurch kann es folglich zu schwerwiegenden, kongenitalen Fehlbildungen des Kindes kommen (zum Vergleich: 6-12 mg/kg/d an Fluconazol sind empfohlen bei einer systemischen Infektion von Neugeborenen) [162,163,224].

2.2 Mikrobielle Adhäsion als Grundlage der Biofilmbildung

Die Stadien der Biofilmbildung (s. Abb. 2) verlaufen in *C. albicans* und *S. aureus* auf ähnliche Weise und werden für *C. albicans* in vier und für *S. aureus* in fünf grundlegende Phasen unterteilt: (I) Adhäsion von einem oder mehreren Einzellern an die Oberfläche gefolgt von interzellulärer Adhäsion, (II) Proliferation der Mikroben zu einer basalen Schicht und zusätzlich die Formierung erster strukturgebender Hyphen bei Pilzen, (III) Maturation des Biofilms und (IV) Dispersion von kompakten Einzelzellen zur Kolonisierung weiterer Stellen [167,187]. Bei *S. aureus* gibt es zwischen (II) und (III) zusätzlich eine Exodus-Phase, bei der einzelne Bakterien aus dem Biofilm freigesetzt werden, um ein dreidimensionales Wachstum des gesamten bakteriellen Biofilms zu ermöglichen [186].

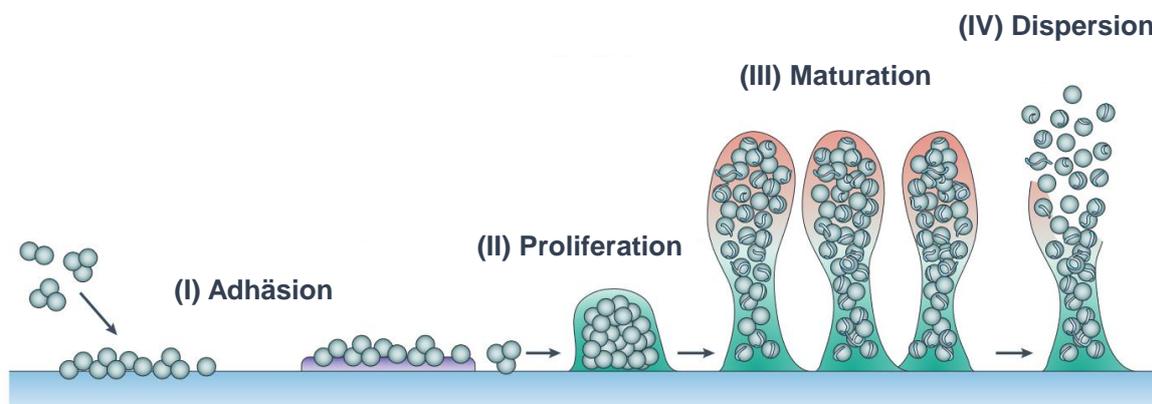


Abbildung 2: Adhäsion als Stadium der Biofilmbildung bei kolonisierenden opportunistischen Erregern.

Dargestellt ist die mikrobielle Biofilmbildung mit den vier charakteristischen Entwicklungsstadien. Die wichtige (I) initiale Adhäsion von einzelnen Zellen erfolgt dabei an abiotische und/oder an biokonditionierte Stellen (violett) der Substratoberfläche. Adaptiert nach [207].

Der initiale Prozess der Adhäsion an die Oberfläche hilft den mikrobiellen Zellen sich vor harschen Umweltbedingungen, wie etwa mechanischen Scherkräften, zu schützen, und bei Biofilm-bildenden Mikroorganismen komplexe mikrobielle Gemeinschaften zu bilden. Die Adhäsion ist dadurch auch der

Ursprung für die Entstehung von Biofilmen-assoziierten Infektionen [61]. Die mikrobielle Adhäsion kann an biologische Strukturen, wie etwa an humane extrazelluläre Matrixproteine auf Wirtszelloberflächen, oder an abiotische (medizinisch-relevante) Oberflächen, die im menschlichen Körper implantiert oder inseriert werden können, erfolgen. Biophysikalisch betrachtet ist die Adhäsion die Summe aller Kräfte, die zwischen zwei oder mehreren Interaktionspartnern, wie etwa einem Bakterium und einer Substratoberfläche, wirken, wobei solche größeren Körper mit ihren Oberflächen(makro-)molekülen und -atomen spezifisch (direktional, innerhalb enger geometrischer Grenzen) oder unspezifisch (ungerichtet) interagieren. Bei einigen Arten von Mikroorganismen ist bekannt, dass sie auf ihrer Oberfläche in großer Anzahl Makromoleküle mit adhäsiven Eigenschaften, die Adhäsine bzw. Adhäsionsfaktoren, aufweisen, und dass diese Adhäsine mit ihren individuellen Bindungseigenschaften sowie ihrer Verteilung auf der mikrobiellen Zelloberfläche die Adhäsionsstärke des Mikroben maßgeblich beeinflussen [253]. Im Folgenden werden die unspezifischen und spezifischen Adhäsionsmechanismen beschrieben, derer sich Mikroorganismen bedienen können, um eine Oberfläche, u.a. mithilfe solcher Adhäsine, zu besiedeln.

2.2.1 Unspezifische Adhäsionsmechanismen in Mikroorganismen

Einen wichtigen Beitrag zu der Adhäsion von Mikroorganismen spielen die unspezifischen Adhäsionsmechanismen, bei denen in der Regel ungerichtete, physikalische Kräfte wirken. Die unspezifischen Kräfte entstehen zwischen verschiedenen Arten von Atomen, Molekülen oder Molekülgruppen oder auch bei der Annäherung von Mikrometerobjekten bei unterschiedlichen Distanzen in Ångström¹-Dimensionen. Sie sind maßgeblich auf elektromagnetische Interaktionen zurückzuführen, die darauf beruhen, dass auf atomarer Ebene elektrische Ladungen gleicher Art sich abstoßen und entgegengesetzte sich anziehen. Umgebungsfaktoren wie pH, Ionenstärke, Temperatur und Zusammensetzung von Flüssigkeiten können genauso wie mechanische und elektrische Eigenschaften des Substrats oder der Zelloberfläche der Mikroorganismen das Auftreten unspezifischer Adhäsionsmechanismen markant beeinflussen. Verschiedene Interaktionen fallen in diese Kategorie und man unterscheidet zwischen den langweitreichenden und den kurzweitreichenden Interaktionen bzw. Kräften (s. Tab. 1). Bei den langweitreichenden Interaktionen nimmt das Interaktionspotenzial mit der Distanz zwischen zwei Körpern nur langsam ab, während bei den kurzweitreichenden Kräften die Abnahme schneller erfolgt (bei Betrachtung der Interaktionen zwischen zwei Körpern auf der Ångström-Skala).

¹¹ benannt nach dem Physiker Anders Jonas Ångström; 1 Å = 0,1 nm.

Tabelle 1: Interaktion bzw. Kräfte mit einer wichtigen Funktion bei der mikrobiellen Adhäsion.

Art der Interaktion oder Kraft	Charakteristiken	Reichweite
Van der Waals	Eine Kraft, die zwischen Oberflächen mit permanenten und/oder induzierten Dipolen wirkt; attraktiv	≤ 50 nm; langweitreichend (abhängig von den Geometrien der involvierten Körper)
Elektrostatisch	Eine Kraft zwischen Ionen, geladenen Molekülen oder Oberflächen; attraktiv oder repulsiv	Wenige nm in physiologischer Lösung; langweitreichend
Hydrophober Effekt	Eine Interaktion zwischen nichtpolaren Molekülen bzw. Körpern in polaren Flüssigkeiten; attraktiv	≤ 5 nm; kurzweitreichend
Sterisch	Quantenmechanische Kraft, wodurch die Geometrie und Gestalt eines Moleküls festgelegt wird; repulsiv	Wenige Ångström; kurzweitreichend
Thermale Fluktuation	Eine temperaturabhängige Kraft, die zur sterischen Abstoßung zwischen Molekülen führt; repulsiv	Wenige Ångström
Wasserstoffbrücken	Eine direktionale elektrostatische Kraft zwischen positiven und negativen (Partial-)Ladungen von Molekülen; attraktiv	Wenige Ångström

Zu den am besten untersuchten Interaktionen in mikrobiellen Adhäsionsprozessen zählen die van der Waals (vdW)-Kräfte. Diese gehören zu den langweitreichenden Interaktionen und ermöglichen starke, ladungsabhängige Attraktionen etwa zwischen einem kugelförmigen Mikrometerobjekt, wie (näherungsweise) eine sphärische Zelle, und einer makroskopischen Substratoberfläche [169,255]. Die

vdW-Kräfte vermitteln daher auch die Adhäsion von Staphylokokken oder anderen einzelligen Organismen an polarisierte oder polarisierbare Substratoberflächen [141,169]. So konnte gezeigt werden, dass das *S. aureus* mit seiner in der Regel negativen Oberflächenladung auf Siliziumoberflächen einen Dipol induzieren konnte, wodurch es dann über vdW-Kräfte zur Adhäsion kommen konnte [169]. Auf anderen Oberflächen, wie etwa dem biomedizinisch relevanten Teflon funktioniert diese Art der Dipol-Induktion durch negativgeladene Bakterien nicht, da Teflon eine starke, durch Fluor-Atome vermittelte negative Oberflächenladung aufweist und sich nicht polarisieren lässt [140]. Zur Modellierung der bakteriellen Adhäsion an Substratoberflächen werden Bakterien oft als kolloide Partikel beschrieben wie etwa in der DLVO-Theorie, benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek. In der DLVO-Theorie wird die Interaktion bzw. das Interaktionspotenzial von zwei Oberflächen anhand ihrer Ladungen (in Flüssigkeiten meist negativ) und der zwischen ihnen wirkenden vdW-Kräfte beschrieben bzw. ermittelt [42,130,140]. Die Erweiterte DLVO-Theorie (xDLVO) berücksichtigt zusätzlich kurzweitreichende Interaktionen zwischen dem Bakterium und der Substratoberfläche, wie etwa den hydrophoben Effekt. Hydrophobe Interaktionen spielen vor allem bei der Adhäsion von Mikroorganismen mit einer hydrophoben Zelloberfläche, wie *S. aureus*, auf hydrophoben Substratoberflächen eine tragende Rolle [81,73,302,257]. Allerdings können solche Adhäsions-Events, die auf hydrophoben Interaktionen basieren, aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Zelloberfläche, wie sie auch bei *S. aureus* zutrifft, nicht mithilfe der xDLVO-Theorie erklärt oder vorhergesagt werden [257]. Auf der Zelloberfläche von *S. aureus* etwa befinden sich zahlreiche adhäsive Makromoleküle (ermittelt wurden in Simulationsstudien etwa 8000 Adhäsine bei einem definierten Radius von 500 nm), die mithilfe von kurzweitreichenden Interaktionen in großer Anzahl an hydrophobe Oberflächen binden können. Es konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion und die Annäherung von *S. aureus* an hydrophobe Silizium-Oberflächen signifikant stärker bzw. attraktiver ausfiel als bei dem nahverwandten *Staphylococcus carnosus*, dem zellwandgebundene Adhäsionsfaktoren größtenteils fehlen [268]. Der hauptsächliche Grund für diesen markanten Unterschied im Adhäsionsvermögen liegt darin, dass Adhäsine von *S. aureus*, welche aus der Zellwand des Bakteriums herausragen, bereits bei einer Distanz von ~ 50 nm zur Substratoberfläche, auf die Oberfläche treffen und ihr gegenüberliegendes Ziel zu binden vermögen, noch bevor der eigentliche Körper des Bakteriums die Oberfläche erreicht [267,268,253]. Hierbei scheinen sowohl proteinöse als auch nicht-proteinöse Makromoleküle der Zellwand von *S. aureus* eine wichtige Rolle zu spielen, da die Adhäsionsfähigkeit der Zelle reduziert werden konnte, sobald die bakterielle Zelloberfläche mit einer Protease (Pronase E) oder mit einem Protein-Crosslinker wie Glutaraldehyd behandelt wurde [268]. Diese Makromoleküle sind maßgeblich für die Adhäsionsstärke von *S. aureus* verantwortlich, und zeigen, dass die xDLVO-Theorie, die normalerweise nur die Geometrie des Bakteriums berücksichtigt, theoretisch auf die einzelnen makromolekularen Oberflächenadhäsine angewendet werden müsste, um die bakterielle Adhäsion an hydrophobe Oberflächen exakt zu beschreiben [268].

Auf hydrophilen Oberflächen ist die Anbindungsfähigkeit und die Adhäsion von *S. aureus* schwächer als auf hydrophoben Oberflächen und es existiert eine stochastische Adhäsionsstärke für individuelle Bakterienzellen, wodurch das Zustandekommen einer (irreversiblen) bakteriellen Adhäsion schwer vorherzusehen ist [172]. Dort kann die elektrostatische Repulsion, die in physiologischer Lösung durch einen Doppellayer aus negativen Ladungen zwischen Bakterium und Substratoberfläche ausgelöst wird, so groß werden, dass praktisch keine Anbindung der Adhäsine an die Substratoberfläche erfolgen kann. Bei dieser Form der bakteriellen Interaktion zur Substratoberfläche handelt es sich dann um eine reversible, schwebende Adhäsion (engl. floating adhesion) im Gegensatz zu einer fest-verankerten Adhäsion (engl. tether-coupled adhesion), wie sie auf hydrophoben Oberflächen zu beobachten ist [276].

2.2.2 Spezifische Adhäsionsmechanismen in Mikroorganismen

Vor allem pathogene Mikroorganismen sind bekannt dafür, auch an humane Wirtsstrukturen, wie etwa Zellmembrankomponenten von Epithel- und Endothelzellen, sowie an Komponenten der extrazellulären Matrix zu binden [118]. Die Adhäsion verläuft hier meist über spezifische Rezeptor-Liganden-Interaktionen, die über die Bindung der Oberflächenadhäsine der Mikrobe an humane Ligandenproteine des Wirts in geometrisch eingegengten Räumen stattfindet, wie etwa beim Clumping Faktors A (ClfA) in *S. aureus*, der durch den C-Terminus der γ -Proteinkette von Fibrinogen zwischen seinen Proteindomänen N2 und N3 eingefädelt wird [179,180]. Die für die Adhäsion in Betracht kommenden Kräfte sind prinzipiell dieselben wie bei den unspezifischen Adhäsionsmechanismen, jedoch mit dem Unterschied, dass spezifische Interaktionen in einem sehr begrenzten Interaktionsraum stattfinden. Hier spielen dann vor allem hydrophobe Interaktionen bei der Kontaktentstehung und Wasserstoffbrücken bei der Interaktion von komplementären Strukturen in Bindungstaschen eine wichtige Rolle [183].

In *S. aureus* und *C. albicans* vermitteln meist zellwandgebundene Oberflächenadhäsine die spezifische Adhäsion. Sie sind kovalent (seltener durch nicht-kovalente Interaktionen) in der Zellwand verankert und werden in das Außenmilieu exponiert, wobei sie unter Umständen weiter modifiziert werden können, wie etwa durch Zuckerketten oder Oberflächenladungen (s. Abb. 3).

Adhäsionsfaktoren und Adhäsionsmechanismen in S. aureus

S. aureus besitzt ein großes Repertoire an Virulenzfaktoren, mit deren Hilfe das Bakterium den Körper des Wirtes erfolgreich besiedeln kann. Es gibt unter den Virulenzfaktoren vier große Klassen: Die Invasine, die immunmodulierenden Faktoren, die Toxine und die Adhäsionsfaktoren. Unter den Adhäsionsfaktoren finden sich Proteine, die kovalent an das Peptidoglykan der Zellwand gebundenen

sind und als CWA (engl. cell wall-anchored [proteins]) bezeichnet werden [91]. Eine weitere Untergruppe bilden die adhäsiven und polymeren Zellwand-Bestandteile Wand- und Teichonsäuren.

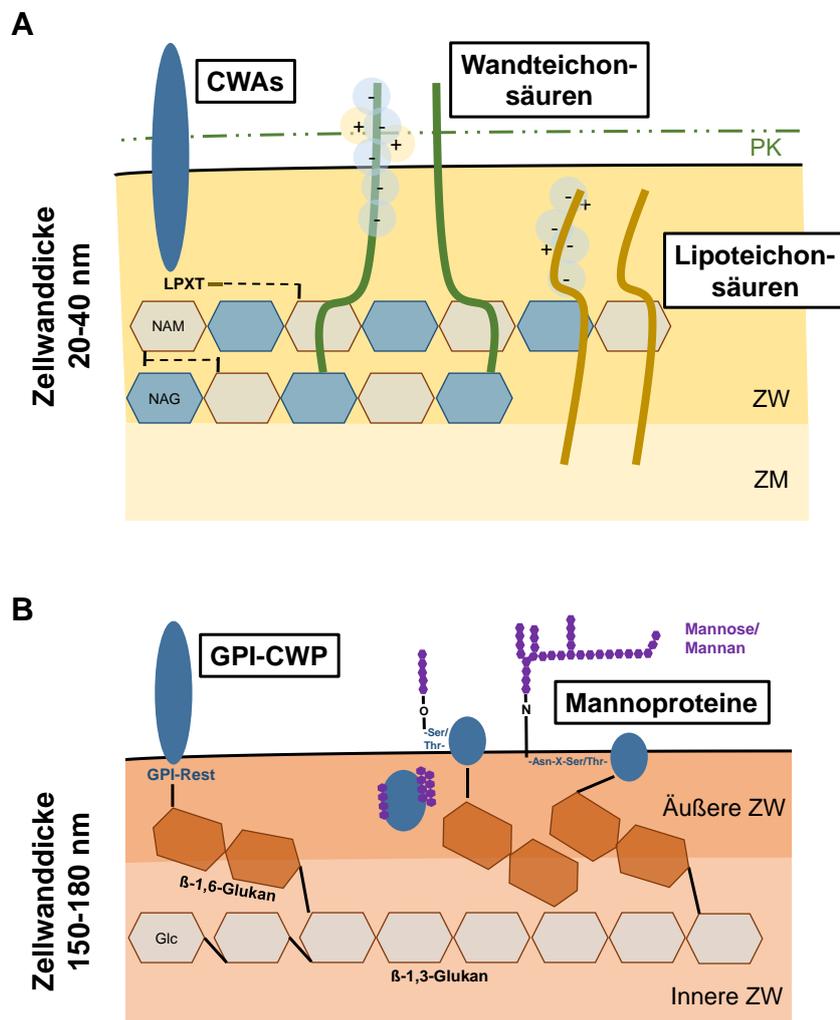


Abbildung 3: Zellwandgebundene Adhäsionsfaktoren in *S. aureus* und *C. albicans*.

Schematische Darstellung der Adhäsionsfaktoren der Zellwand bei (A) *S. aureus* und (B) *C. albicans*. Auffällige Gemeinsamkeiten der Zellwand sind strukturgebende Zuckerketten aus Peptidoglykan (*S. aureus*) oder Glukan (*C. albicans*), mit denen die Adhäsionsfaktoren kovalent verknüpft sein können. Weitere Adhäsionsfaktoren sind mit der Zellwand auf nicht-kovalente Weise assoziiert oder mit der Zellmembran verbunden. CWA, engl. cell-wall anchored (proteins); Glc, Glucose; GPI-CWP, engl. GPI-anchored cell wall protein; LPXTG, Leu-Pro-X-Thr-Gly, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt; MP, Mannoprotein; NAG, N-Acetyl-Glukosamin; NAM, N-Acetyl-Muraminsäure (Miteinander verknüpfte NAM- und NAG-Moleküle bilden die Basis von Peptidoglykansträngen); NT, Protein-N-Terminus; PK, Polysaccharid-Kapsel; ZM, Zellmembran; ZW, Zellwand. Abbildung zur Veranschaulichung nicht maßstabsgetreu.

Eine dritte Gruppe sind die SERAMs (engl. secretable expanded repertoire adhesive molecules), Proteine, die sekretiert werden und teilweise an der bakteriellen Zellwand verbleiben sowie an adhäsive Wirtsstrukturen binden und die bakterielle Adhäsion vermitteln können [49].

Im Folgenden werden einige Vertreter der CWA-Teilgruppe MSCRAMM (engl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) beschrieben, denen eine bedeutende Rolle bei der bakteriellen Adhäsion an Wirtsstrukturen zukommt. Die Proteinsequenz der MSCRAMMS besteht stets aus folgenden Komponenten; dem N-terminalen Signalpeptid, mehreren charakteristischen, IgG-artig gefalteten Domänen [91], den hydrophoben Zellwand- und Zellmembran-überbrückenden Domänen, und dem C-terminalen LPXTG-Motiv, über welches das Protein mithilfe des Enzyms Sortase A kovalent in die Zellwand verankert wird [118]. Zwei der wichtigsten MSCRAMMS sind die Fibrinogen-Bindfaktoren (engl. clumping factors) ClfA und -B. ClfA und -B sind ca. 92 kDa bzw. 124 kDa (was je nach *S. aureus*-Stamm auch variieren kann) groß und die Fg-Bindungsaktivität verläuft für beide über die N-terminale Region A, welche aus den IgG-artigen Ligandenbindedomänen N2 und N3 besteht. Für ClfA wurde eine Prävalenz von 99 % in MSSA- und MRSA-Isolaten beschrieben [115]. Interessanterweise ist die Proteinstruktur von Region A nur zu 26% zwischen ClfA und -B identisch, was auf unterschiedliche Zielstrukturen in Fg hindeutet. Daher ist es nicht verwunderlich, dass ClfA die γ -Kette, und ClfB die α - und β -Ketten von Fg bindet [195]. Die Bindung zwischen Fg und ClfA ist sehr stark und kann konformationsabhängig bis in die Größenordnung kovalenter Bindungen (~ 2 nN) reichen [122]. ClfA kann über Fg an abiotische Oberflächen oder mit Fg als Brückenstruktur an das Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ auf der Zelloberfläche von Endothelzellen binden, was zu einer erhöhten Kolonisierung von Herz und Nieren, wie in einem Mausmodell gezeigt wurde, führen kann [90,284]. ClfA ist ein immunogener Virulenzfaktor in *S. aureus* und wurde daher auch als Teil eines Kombinationsimpfstoff gegen invasive *S. aureus*-Infektionen getestet [110]. Neben seiner zellbindenden Eigenschaft ist ClfA in Kombination mit den beiden Koagulasen Coa und vWBP insbesondere für die Bildung von Fibrinnetzwerken von Bedeutung, in denen sich *S. aureus* vor der angeborenen Immunabwehr zu schützen vermag [51,90]. ClfB wiederum kommt eine wesentliche Rolle bei der Besiedlung der Nasenschleimhäute zu, indem es mit nasalen Epithelzellen interagiert und dabei an das Strukturprotein K10 des Keratin-Typs I bindet, welches auf der Zelloberfläche abgelagert wird [91,202]. Auch bindet ClfB an das Zelloberflächenprotein Loricrin, welches ebenfalls auf den nasalen Epithelzellen oder auf Korneozyten vorkommt [89,189,286]. Im Rahmen von Weichgewebsinfektionen im Mausmodell wurde gezeigt, dass ClfB in Gegenwart von Loricrin einen Einfluss auf die durch *S. aureus* verursachte Abszessbildung ausübt [160].

Weitere wichtige Adhäsine von *S. aureus* sind die Fibronectin-bindenden Proteine FnbpA und -B. Die Fnbps gehören zu den größeren MSCRAMMS und erreichen eine Größe von ~ 110 kDa (FnbpA) bzw. ~ 100 kDa (FnbpB). Sie besitzen mehrere C-terminale Fibronectin(Fn)-Bindestellen, die eine Adhäsion eines Fnbps an mehrere Fn-Moleküle ermöglichen [246,291]. Je nach Stamm können die Fnbps bis zu elf aufeinanderfolgende Fn-Bindestellen enthalten, die sich vom C-Terminus bis in Region A erstrecken [181]. Ähnlich wie die Clfs besitzen die Fnbps eine N-terminale Fg-Binderegion, wobei gezeigt werden konnte, dass FnbpA ähnlich wie ClfA die γ -Kette von Fg bindet und dadurch in ClfA- und ClfB-Doppelmutanten von *S. aureus* die Interaktion zu Fg aufrechterhalten kann [291]. Obwohl die Fnbps zu

den Adhäsionsproteinen in *S. aureus* gehören, spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Fc-vermittelten Internalisierung von *S. aureus* durch eukaryote Epithel- oder Endothelzellen [77,248,92], einem weiteren Immunevasionsmechanismus des Bakteriums, sich der Internalisierung durch professionelle Phagozyten wie Neutrophile Granulozyten oder Makrophagen zu entziehen.

Ein weiteres wichtiges Adhäsionsprotein dieses Bakteriums ist Protein A, welches u.a. bei der Adhäsion von *S. aureus* über das Oberflächenprotein gC1qR an Thrombozyten eine Rolle spielt [194]. Protein A besitzt eine Größe von etwa 55 kDa und an seinem N-Terminus fünf Immunglobulin-bindende Tandem Repeats, die jeweils aus einem Bündel aus drei helikalen Proteinstrukturen bestehen. Die eigentliche Hauptfunktion dieses Proteins ist eine Bindung der Fc-Strukturen von IgG-Antikörpern, wodurch die Antikörper-vermittelte Opsonisierung von *S. aureus* durch das Immunsystem verringert wird. Als Adhäsionsfaktor bindet Protein A des Weiteren an den von-Willebrand-Faktor und fördert dadurch die bakterielle Adhäsion an Endothelzellen [124,210]. Ergänzend lässt sich zu den zellwandgebundenen Adhäsinen in *S. aureus*, wie den FnBPs [241,298], ClfB [195] oder Protein A (Björkind und Arvidson, 1980) hinzufügen, dass sie bevorzugt in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien exprimiert werden, während andere Adhäsine wie ClfA oder das MSCRAMM SdrC auch in späteren Wachstumsphasen exprimiert werden können [19,82].

Neben den CWA-Proteinen existieren mit den Teichonsäuren, wie erwähnt, auch nicht-proteinöse Zellwand-Adhäsine in *S. aureus*. Dabei gibt es die Unterteilung in Wandteichonsäuren (WTS) und Lipoteichonsäuren (LTS). Bei ihnen handelt es sich um komplexe, zwitterionische Zellwandpolymere, wobei die WTS kovalent an das Peptidoglykan der Zellwand gebunden und die LTS über ein Glykolipid in der Zellmembran verankert sind [31]. WTS und LTS bestehen aus einem polyanionischen Rückgrat aus Ribitolphosphat- bzw. Glycerolphosphat-Wiederholungen. Teichonsäuren sind wichtige integrale, und im Falle von LTS essenzielle Bestandteile der Zellwand von *S. aureus* [214]. WTSs sind zudem wichtige Adhäsine bei der Kolonisierung von humanen Haut- und Nasenepithelzellen [292–294].

Ein Überblick über die Gesamtheit an Adhäsionsfaktoren in *S. aureus* findet sich in den Reviews von Heilmann und Foster *et al.* [91,118].

Adhäsionsfaktoren und Adhäsionsmechanismen in Candida albicans

Die Zellwand von *C. albicans* besteht aus einer inneren und äußeren Zellwand sowie, im äußersten Bereich der Zelloberfläche, aus einem ausgeprägten Netzwerk aus verzweigten Glykoproteinen. Die innere bzw. äußere Hefen-Zellwand besteht hauptsächlich aus den Polysaccharidketten β -1-3-Glukan bzw. β -1,6-Glukan. Die Glykoproteine der Zellwand besitzen in *C. albicans* häufig eine Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Ankerstruktur zu ihrer kovalenten Anbindung an die Zellwand [152]. Diese Struktur ist namensgebend für die Gruppe der GPI-Proteine und ermöglicht eine

bioinformatische Entdeckung möglicher Adhäsionsfaktoren in *C. albicans* [67]. Die GPI-Oberflächenproteine sind meist mit dem C-Terminus an das β -1,6-Glukan der äußeren Zellwand gebunden (s. Abb. 3). Einige wenige Nicht-GPI-Proteine sind, ähnlich wie die SERAMs aus *S. aureus*, über hydrophobe und ionische Interaktionen mit der Zellwand assoziiert, oder über anderweitig kovalente Verbindungen dort verankert. Vertreter beider Gruppen können zusätzlich über Disulfidbrücken mit der Zellwand kovalent verbunden sein [40]. Beide Gruppen enthalten zudem potenzielle Adhäsionsfaktoren [135,40]. Eine Auswahl wichtiger GPI-Oberflächenproteine mit Adhäsionseigenschaften sind die Als-Proteine Als1 bis -5, Hwp1, Csh1 oder Eap1, die an extrazelluläre Wirtstrukturen wie etwa auf humanen Zelloberflächen binden können oder bei der Biofilmbildung eine wichtige Rolle spielen [71,164,200,247]. Die Als-Proteine sind die am besten charakterisierten Adhäsine in *C. albicans*. Ihre N-Terminale Proteinstruktur besteht - nach der enzymatischen Abspaltung der Signalsequenz - aus Ig-artigen Proteindomänen, deren komplexe Struktur eine Funktion in Protein-Protein-, Protein-Zucker- und anderen Protein-Liganden-Interaktionen ermöglicht [67,74]. Als-Proteine können im Falle von Als1 an das γ -Peptid von Fg, an Fn, oder an Fucose-haltige Glykane binden [71,229]. Die Ig-artigen Proteindomänen N1 und N2 von Als1 erinnern dabei von ihrem Aufbau aus β -Faltblättern und von ihrer Faltungsstruktur her an die Proteindomänen von ClfA in *S. aureus* [237]. An sie schließen sich im Weiteren an: Eine Threonin-reiche Region, die eine kurze Amyloid-formende Proteinstruktur mit einer Wichtigkeit für Zell-Zell-Interaktionen trägt, eine Tandem Repeat-Region, die eine Rolle bei hydrophoben Interaktionen spielt und O-Mannosylierungsstellen für kovalente Modifikationen durch Zuckermoleküle [21,10,229]. Eine Mannosylierung ist von zentraler Bedeutung bei weiteren zellwandgebundenen bzw. assoziierten Faktoren aus *C. albicans*, den Mannoproteinen, denen bereits mutmaßliche Adhäsionseigenschaften zugeschrieben wurden [266]. Diese Mannoproteine, die aufgrund der häufigen Modifikation der Proteine durch Mannose oder Mannan in *C. albicans* so bezeichnet werden, machen etwa 20 % bis 30 % der Gesamttrockenmasse der Zellwand aus [95,223]. Ein Mannan-Rest, ein Polymer aus Mannose-Einheiten, ist dabei über kurzsträngige (engl. O linkages) oder über verzweigte (engl. N linkages) Oligosaccharide mit dem Protein verknüpft (s. Abb. 3). Die Mannosylierung der Proteine ist wichtig für die Integrität und Funktion der Adhäsine und für die Integrität der gesamten Zellwand [135]. Ein wichtiges Mannoprotein ist Bgl2, welches neben seiner Funktion als Zellwand-Remodulierungsenzym auch eine Bindungsaktivität an Speichelliganden besitzt [135]. *C. albicans* besitzt eine starke Bindungsaktivität an abiotische Oberflächen [74,164], die maßgeblich über Als1 und Eap1 vermittelt wird. So zeigte eine *als1 Δ Δ* -Deletionsmutante in *C. albicans* beispielsweise eine signifikante Verminderung im Adhäsionsvermögen auf der medizinisch-relevanten Substratoberfläche Silikon [88]. Untersuchungen mit einer *eap1*-Mutante wiederum erbrachten, dass Eap1 für die Adhäsion von *C. albicans* an Polystyrol von großer Bedeutung ist [164]. Adhäsionsfaktoren spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion von *C. albicans* auf proteinbeschichteten abiotischen Oberflächen, wie etwa durch Speichelfaktoren. So konnte u.a. gezeigt werden, dass *C. albicans* dazu in der Lage war, humane Speichelproteine oder auch einzelne Faktoren wie das humane

Speichelprotein Statherin auf der Oberfläche von Zahnschmelz zu binden [136]. Die Adhäsion von *C. albicans* an speichelbeschichteten Oberflächen konnte wiederum unterbunden werden, sobald die Oberflächenproteine von *C. albicans* mit Trypsin oder mit einem anderen, Mannose-spaltenden Enzym verdaut wurden. Diese Beobachtungen zeigten auf, dass Mannoproteine bei der Adhäsion von *C. albicans* an Speichelprotein-beschichtete Oberflächen eine tragende Rolle spielen können. Ebenso wurde eine Beteiligung der etablierten *C. albicans*-Adhäsionsfaktoren Als1 und Bgl2 und des zellwandgebundenen Ecm33 bei der Anbindung an Speichelkomponenten beschrieben [135,266].

Die Fähigkeit von *C. albicans* an eine Vielfalt von Proteinen und an fragmentierte Protein-Moleküle (lineare Peptidstränge) zu adhären, ist eine besondere Eigenschaft dieser Hefe. *C. albicans* besitzt dafür, neben seinen spezifischen Interaktionen mit Wirtsliganden, ein spezielles Adhäsionssystem (engl. *degenerate adherence recognition system*): Die diesem System zuzuordnenden Adhäsine binden dabei an einfache bis sich mehrfach wiederholende, kurze Aminosäuresequenzen bzw. an simple Grundmotive der proteinösen Liganden [150]. Dadurch wird auch die Adhäsion an denaturierte Proteine auf Oberflächen ermöglicht [116].

2.3 Die Anhaftung von Mikroorganismen auf klinisch-relevanten Oberflächen

Hart- und Weichgewebe des menschlichen Körpers, die in ständigem Kontakt mit Mikroorganismen stehen, werden zwangsläufig durch diese besiedelt. Dies gilt beispielsweise für den Mund-Nasen-Rachenraum, für den Verdauungstrakt mit seiner immensen Vielfalt an mikrobiellen Spezies, oder für die Hautoberfläche als oberflächenmäßig das größte aller Organe. Darüber hinaus können in den Körper inserierte Fremdkörper, wie der Zentrale Venenkatheter (ZVK) oder Gelenks- bzw. Zahnimplantate, im menschlichen Körper ebenfalls durch Mikroorganismen besiedelt werden. Weniger als 100 Kolonieformende Mikroorganismen waren in einer Tierstudie dabei ausreichend, um eine Implantat-assoziierte Infektion in Gegenwart von Immunzellen auszulösen [305].

2.3.1 Oberflächenanhaftung von *S. aureus* auf Zentralen Venenkatheter (ZVK)

Krankenhaus-assoziierte Blutstrominfektionen, die mit dem Gebrauch von Kathetern assoziiert (CABSI)² sind, oder die primär vom Katheter ausgehen (CRBSI)³, stellen seit Jahrzehnten eine große Herausforderung im intensivmedizinischen Alltag dar [132,55,83,103]. In Deutschland gibt es jährlich

² engl. catheter-associated blood stream infection

³ engl. catheter-related blood stream infection

mindestens 8400 mit ZVKs in Verbindung stehende Sepsisfälle auf Intensivstationen [261,306]. Eine Studie zeigte, dass in 64 % der Fälle von CRBSIs grampositive Erreger als Auslöser der Katheterinfektion identifiziert werden konnten [211]. Die häufigsten grampositiven Verursacher von CRBSIs sind Koagulase-negative Staphylokokken und *S. aureus* [211,243]. *S. aureus* ist aufgrund seines großen Arsenal an bakteriellen Virulenzfaktoren diejenige Staphylokokken-Art, bei der eine Katheter-Kolonisation am häufigsten zu einer schwerwiegenden Infektion führt [133,304].

Die hauptsächliche Infektionsroute bei ZVK-Infektionen wird bis dato kontrovers diskutiert, jedoch gibt es vier solche potenziellen Routen, die zu einer Verunreinigung des Gefäßkatheters durch mikrobielle Erreger führen können [96] (s. Abb. 4): (I) Die Adsorption oder Adhäsion einzelner individueller Keime bei der Einführung des ZVKs in das Blutgefäß durch die Hautoberfläche des Patienten oder durch disseminierte Mikroorganismen von der Kleidung oder der Flora des medizinischen Personals. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bei Kurzzeit-Behandlungen (≤ 4 d nach Insertion des ZVKs) beim Auftreten von kontaminierten Gefäßkathetern eine Korrelation zwischen der Keimart auf dem ZVK und derselben in der Hautflora des Patienten vorlag, wenn zum Zeitpunkt der ZVK-Insertion der Keim auf der Haut des Patienten nachweisbar war [226,16,43]. (II) Eine Verunreinigung des ZVKs durch intravenöse Medikamente, Infusate, Spül- und Blocklösungen [63]. Dies ist heutzutage eher einer der seltenen Gründe für eine ZVK-Kontamination und wurde etwa durch kommerziell erworbenes verunreinigtes Wasser verursacht, das zur Verdünnung von intravenös verabreichtem Antibiotikum verwendet wurde [72]. (III) Eine Manipulation des Katheterhubs⁴ durch das Krankenhauspersonal, die die Gefahr einer Kolonisierung und Biofilmbildung auf der intraluminalen Seite des ZVKs erhöht, indem Bakterien entlang dieser Seite bis in die Blutbahn migrieren, ein Risiko, dass sich mit der Anzahl der Behandlungstage mit dem ZVK erhöht [227,238]. Beschrieben wurde, dass der Katheterhub bereits nach ca. 7-9 Behandlungstagen die zweithäufigste Quelle einer Katheterinfektion und nach 23 Tagen die häufigste Infektionsquelle für CRBSIs darstellt [227,249]. (IV) Schließlich die hämatogene Kolonisierung des Katheters durch ins Blut disseminierte planktonische Mikroorganismen aus entfernten primären Infektionsherden. Diese Art der Kolonisierung wurde nur selten beschrieben und der Mechanismus zur Besiedlung der ZVK-Oberfläche durch blutbeschichtete Mikroorganismen wurde bisher nicht charakterisiert [154,238].

⁴ Hierbei handelt es sich um eine mechanisch verstärkte Luer-Lock-Verbindung zwischen dem ZVK und den Infusionseingängen

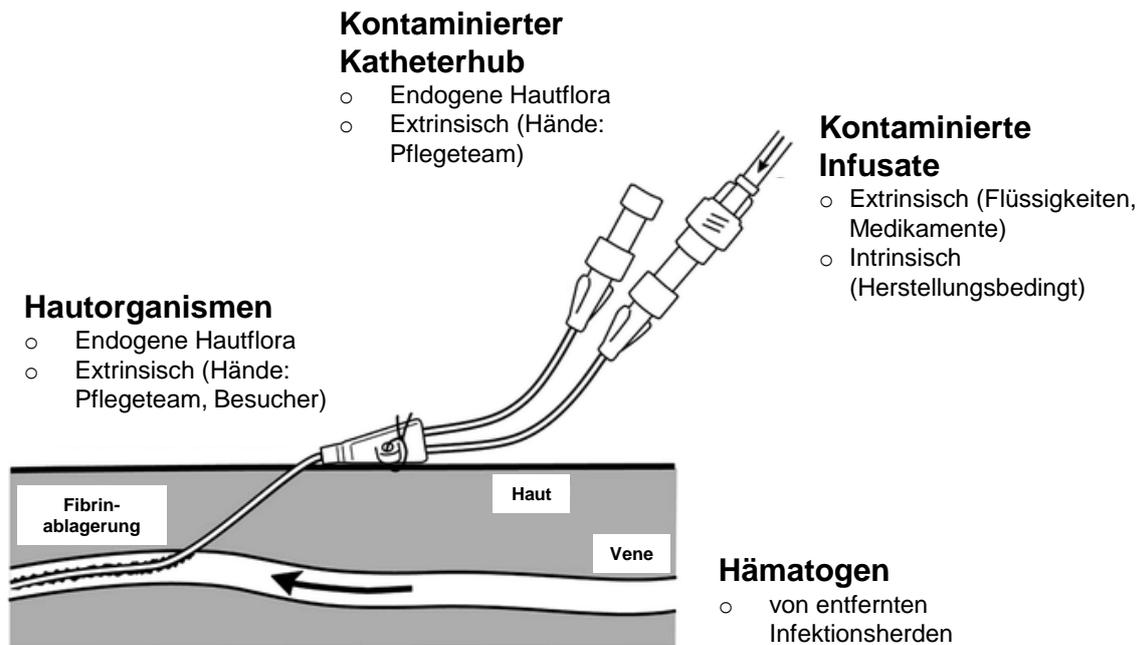


Abbildung 4: Die vier potenziellen Kontaminationsrouten und -quellen bei der Entstehung von ZVK-Infektionen. Adaptiert nach [236].

Die Infektionsrouten I und III stellen den höchsten Risikofaktor für eine Infektion dar [238]. Mikrobielle Kontaminationen um die Insertionsstelle herum wurden bereits als ein entscheidender Faktor für CRBSIs identifiziert [27]. Dieses steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass die extraluminale Katheteroberfläche häufig dichter kolonisiert wird als das intraluminale Areal [59]. Aus diesen Gründen ist die Untersuchung der bakteriellen Adhäsion als erster Schritt der Biofilmbildung auf der extraluminale Seite des ZVKs und zur Reduzierung von CRBSIs von höchster Wichtigkeit.

2.3.2 Oberflächenanhaftung von *C. albicans* auf Zahnoberflächen bei Kindern

Der opportunistische Erreger *C. albicans* ist ein häufiger Besiedler der Mundhöhle des Menschen und dort ein vielgestaltiger Mikroorganismus, der, wie oben erwähnt, in den Formen Hefezelle, Hyphen und Pseudohyphen vorkommt. *C. albicans* baut strukturierte und dynamische Biofilme, die dem festsitzenden Pilz ermöglichen in der Mundhöhle gegen mechanische Scherkräfte, wie etwa solche die durch den Speichelfluss verursacht werden, zu bestehen [20,65,264]. Polymikrobielle Biofilme mit zwei oder mehreren unterschiedlichen Arten wie *C. albicans*, *Actinomyces viscosus* oder *Streptococcus mutans*, führen häufig zu ernsthaften Erkrankungen des Mundraumes, wie etwa Prothesen-Stomatitis, Parodontitis, und Zahnkaries, zu letzterer zählt bei Kleinkindern das schwerwiegende Nursing-Bottle-Syndrom S-ECC [106,134,301]. S-ECC ist eine der weitverbreitetsten Krankheiten bei Kindern unter 3 Jahren oder 4-6 Jahren und ist ein Belastungsfaktor für das weltweite Gesundheitswesen [203,301].

Es konnte bei einem hohen Prozentsatz an Kindern eine Infiltrierung der Zähne mit *C. albicans* beobachtet werden [242]; auch wurden tiefe kariöse Zahnkavitäten mit entweder *C. albicans* allein oder im Zusammenschluss mit einer weiteren nicht-*albicans Candida*-Art beschrieben [84]. Dabei lässt sich dieser Krankheitserreger bei S-ECC-erkrankten Kindern bis zu dreimal häufiger in den Zahnplaques als in der umgebenden Speichelflüssigkeit auffinden [300]. Es wird heutzutage davon ausgegangen, dass eine hohe orale Präsenz von *Candida* spp. mit dem Schweregrad von S-ECC korreliert [66,84,171]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* in der Lage ist, die Zahnstruktur zu degradieren, eines der Charakteristika von Karies-Pathogenen [148,244]. Durch das Vermögen von *C. albicans* Säuren wie Brenztraubensäure oder Essigsäure abzusondern und dadurch seine Umgebung anzusäuern und dabei selbst die Fähigkeit besitzt, in dieser sauren Umgebung zu überleben, könnte eine Degradation der Zahnoberfläche verursacht werden [148]. Die bisher beschriebenen mikrobiellen Kariesauslöser entspringen größtenteils der Gruppe der opportunistisch pathogenen Bakterien (vor allem *Streptococcus mutans*). Trotz der hohen Bedeutung von *S. mutans* für die Entstehung von Zahnkaries, fehlen die eindeutigen wissenschaftlichen Belege dafür, dass diese Spezies der alleinige Erreger von Zahnkaries ist [99]. Die Entdeckung, dass *S. mutans* zur Entstehung von Zahnkaries führen konnte, veranlasste viele Forschungsarbeiten sich (erfolgreich) mit *S. mutans* im Kontext von Zahnkaries zu beschäftigen, resultierte aber auch darin, dass die Untersuchung potenzieller anderer Keime vernachlässigt wurde [175]. Im vergangenen Jahrzehnt konnte die Existenz von Lactobacillen, Enterokokken und *C. albicans* in kariösen Zähnen belegt werden [148]. Es wurde auch berichtet, dass *C. albicans* in Abwesenheit von *S. mutans* die Kariesentstehung fördern kann. Dies passiert vorzugsweise auf der okklusalen Oberfläche der Zähne, wo Scherkräfte gegen Keime geringer sind als auf den bukkalen und approximalen, glatten Seiten des Zahnes [148].

2.4 Adsorption von Wirtsfaktoren auf Substratoberflächen und ihre Bedeutung für die mikrobielle Adhäsion

Die Oberflächen von Wirtszellen und Geweben oder von medizinisch relevanten Substraten, die in den menschlichen Körper inseriert werden (z.B. ZVKs oder Implantate), werden beim erstmaligen Kontakt mit Körperflüssigkeiten innerhalb von wenigen Sekunden mit Biomolekülen beschichtet [17]. Die Adsorption von Proteinen an Implantatoberflächen ist von besonderem Interesse, da diese als potenzielle Bindepartner für Mikroorganismen vorliegen können. Dabei spielen die Oberflächeneigenschaften des Substrats einen entscheidenden Einfluss auf die Konformation der adsorbierten Proteine: Beispielsweise können auf hydrophilen Oberflächen Liganden auf vergleichsweise schonende Weise adsorbieren und ihre natürliche Konformation beibehalten [265]. Hydrophobe Oberflächen, hingegen, denaturieren vielfach das Protein, die ursprüngliche Proteinkonformation wird zerstört, und das Protein breitet sich stärker auf der Oberfläche aus [111]. Auch kann die Konkurrenz unter freibeweglichen Proteinen in einem heterogenen Proteingemisch einen entscheidenden Einfluss auf die Adsorption an das Substrat

ausüben, wobei das Molekulargewicht der Proteine die Sedimentationsgeschwindigkeit bestimmt. Der Vroman-Effekt besagt für adsorbierte Blutplasmaproteine (und möglicherweise auch für andere adsorbierte Proteine aus anderen Proteingemischen) auf negativ-geladenen Oberflächen wie Titan oder Glas, dass die kleineren, durch Sedimentation gebundenen Makromoleküle mit der Zeit durch größere Makromoleküle, die eine höhere Affinität zur Oberfläche aufweisen, ersetzt werden [18,287].

2.4.1 Der Effekt von humanen Blutplasmaproteine auf die Adhäsion von *S. aureus*

Humanes Blutplasma (HBP) bildet den proteinösen und zellfreien Bestandteil des Blutes. Auf Medizinprodukten wie ZVKs verändert HBP das Bindungsvermögen von *S. aureus* auf diesem Materialtyp [102]. Es gibt dabei eine Diskrepanz in der Literatur über den Effekt von HBP auf die Adhäsion von *S. aureus* an ZVKs oder an den Grundstoff Polyurethan, aus dem ZVKs häufig aufgebaut sind. Einige Studien konnten dabei einen positiven Effekt von HBP auf das Adhäsionsvermögen von *S. aureus* auf *in vitro*-beschichtete [52,138] oder explantierte ZVKs aus den Blutgefäßen von Patienten [280,281] feststellen, während andere Studien keinen oder sogar einen negativen Effekt von Blutplasma bzw. -serum an Polyurethan-basierte ZVKs beobachteten [155,213]. Einzelne Blutplasmafaktoren, hingegen, sind auf ihren Effekt auf die bakterielle Adhäsion gut charakterisiert (s. Tab. 2). Zwei Beispiele für solche Blutplasmaproteine sind Humanes Serumalbumin (HSA), ein 66 kDa-großes Protein mit einer Sekundärstruktur aus hauptsächlich α -Helices und keinen β -Faltblattstrukturen, welches eine entscheidende Rolle beim Transport von fettlöslichen Molekülen im Blut spielt und verantwortlich für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks ist; und Fg, ein 340 kDa-großes Hexamer aus zwei Sets mit jeweils einer α -, β - und γ - Proteinkette, und dessen enzymgesteuerte Umwandlung in Fibrin beim Prozess der Wunderverschließung essentiell ist [188]. Die Proteinzusammensetzung des Blutplasmas kann sich individuell stark unterscheiden und ist ebenfalls mit Gewebsproteinen nach Gewebsschädigungen oder mit Proteinen des Immunsystems, wie etwa IgM- und IgG-Antikörper als Reaktion auf Infektionen, durchsetzt. Die Konzentrationen der einzelnen Proteine können sich um mehrere Ordnungen in einer logarithmischen Skala unterscheiden [12]. HSA etwa ist mit Abstand das häufigste Blutplasmaprotein und um einen Faktor $\sim 10^2$ höher konzentriert als das zweithäufigste Blutplasmaprotein, Faktor H, ein Komplement-Kontrollprotein des Immunsystems. Viele Komponenten des Blutplasmas können als Kolonisierungsfaktoren von pathogenen Mikroorganismen ausgebeutet werden, und dadurch zur Basis einer Blutstrominfektion oder Endokarditis werden [92,118,121,210]. Mit HSA gibt es einen bereits bekannten, negativen Bindepartner für *S. aureus* im Blut [143]. Verschiedene Untersuchungen belegten, dass HSA sich inhibitorisch auf die Adhäsion von *S. aureus* an Oberflächen auswirkte [11,201,176,177]. Es wurde spekuliert, dass durch die negativen Netto-Oberflächenladungen von *S. aureus* und von immobilisiertem HSA eine Annäherung an das Substrat unterbunden wird [120,232].

Tabelle 2: Ausgewählte Wirtsfaktoren aus Blutplasma bzw. Speichel und ihr Einfluss auf die Adhäsion von *S. aureus* bzw. *C. albicans*.

Proteine in grün- bzw. in orange-schattierten Feldern wirken sich nach Adsorption an die Substratoberfläche negativ bzw. positiv auf die spezifische Adhäsion des jeweiligen Mikroorganismus aus.

Blutplasmaprotein und Beziehung zu <i>S. aureus</i>	Speichelprotein und Beziehung zu <i>C. albicans</i>
Serumalbumin [121]	Muzine [34]
IgG [121]	Statherin [136]
Fg [118]	Basische Prolinreiche Proteine [205]
Fn [92]	Fn [149]
von-Willebrand-Faktor [210]	Bpifa2 [129]
Vitronektin [49]	

2.4.2 Der Effekt von Speichelproteinen auf die Adhäsion von *C. albicans*

Der Speichel ist eine körpereigene Mixtur, die aus den sekretierten Flüssigkeiten der drei großen paarigen Speicheldrüsen (Ohr-, Unterkiefer, und Unterzungspeicheldrüse) und der kleinen Speicheldrüsen gebildet wird. Weitere Komponenten, die von Mikroorganismen der Mundhöhle abgegeben werden, oder durch die Nahrung im Speichel verbreitet werden, können zur Komposition des Speichels beitragen. Zu den häufigen Proteinen im Speichel gehören die zu den Glykoproteinen zählenden Muzine oder die stärke-spaltende Amylase. Eine Besonderheit in der Mundhöhle ist die Ausbildung einer proteinhaltigen Grenzfläche zwischen dem Speichelfluss und der Zahnoberfläche, die auch Pellikel genannt wird. Dabei gibt es markante Unterschiede in der Proteinzusammensetzung des Pellikels über die Zeit, wie etwa zwischen einem initialen Pellikel (Speichelkontaktzeit zum Zahn $t \leq 3$ min) und dem ausgereiften Proteinbiofilm ($t \geq 120$ min). Ebenso konnten große Unterschiede in der Pellikelzusammensetzung zwischen einzelnen Probanden beobachtet werden. Bereits in den initialen Pellikeln ist eine große Anzahl an unterschiedlichen Proteinen enthalten, auch wenn ein bemerkenswerter hoher Anteil von überlappenden Proteinen zwischen verschiedenen Individuen

detektierbar war [272]. In Pellikeln können sich geeignete Liganden für kolonisierende opportunistische Krankheitserreger wie *C. albicans* befinden, wie etwa das humane Bpifa2, ein Agglutinationsfaktor des Speichels zur Verklumpung von Mikroorganismen sowie *C. albicans*-Bindpartner auf Silikonoberflächen [129] (s. Tab. 2). Weitere potenzielle Liganden bilden das Fn, das 43-Aminosäurenlange Statherin, ein Protein, das die Bildung von Calciumsalzen verhindert und so für hohe Calciumkonzentrationen an der Zahnoberflächen zu sorgen vermag, sowie basische Prolin-reiche Proteine, darunter zwei 17 kDa- (IB-6) und 20 kDa-große Varianten [117,136,149,197,205].

Einige Arbeiten zeigten auch, dass Speichel als Ganzes die Adhäsion von *C. albicans* an medizinisch-relevante Oberflächen, wie etwa Hydroxylapatit oder Silikon positiv beeinflussen kann [41,128,129,266], wohingegen anderen Arbeiten Speichel keinen oder sogar einen dualen Einfluss auf die Adhäsion zugeschrieben haben [34,218], wodurch der potenzielle Effekt von Speichel auf die Adhäsion von *C. albicans* heute ein kontrovers diskutiertes Thema darstellt.

2.5 Traditionelle Adhäsionsassays mit Batch-Kulturen und moderne AFM-basierte Adhäsionsstudien

2.5.1 Mikrobiologische Adhäsionsstudien mit Batch-Kulturen

Adhäsionsstudien mit Mikroorganismen beschreiben meist die qualitative oder semi-quantitative Anzahl von adhärenen Mikroorganismen an Oberflächen [36,143]. Bei Adhäsionsstudien mit Batch-Kulturen, in denen Mikroorganismen aus demselben Kulturansatz nach identischen Wachstumsbedingungen verwendet werden, stehen häufig Kurzzeitstudien im Vordergrund, die die Adsorption und Adhäsion von Mikroorganismen an eine Substratoberfläche nach etwa 30 - 120 min untersuchen. Eine Besonderheit solcher Assays ist die Verwendung hoher Mikrobekonzentrationen (in der Regel $> 10^6$ Zellen/ml). Das quantitative Anhaftungsvermögen des Mikroorganismus in diesen Zellzahl-quantifizierenden Assays hängt stark von der Inkubationsdauer und von der Spezies oder Subspezies ab; zusätzlich wird bei einigen Spezies die maximale Anzahl adhärenen Zellen nach 60 min erreicht, wohingegen andere Spezies auch nach 90 min einen Anstieg in der Anzahl der adhärenen Zellen zeigen [208]. Wichtige Faktoren bei der Anhaftung der Zellen sind dabei die wirkenden Adhäsionsmechanismen zwischen der Zelle und dem Substrat und der passive Transport (Sedimentation bei statischen Assays oder der Strömungstransport bei Experimenten unter Fluss) der Mikroorganismen zur Oberfläche [42]. Vielfach kommt es dabei zu markanten Diskrepanzen zwischen den in statischen Adhäsionsassays und Flussexperimenten erhaltenen Adhäsionsdaten, da bei den letzteren die Fließgeschwindigkeit und die Scherkraft die Adhäsionsmechanismen des Mikroorganismus beeinflussen können [199,215,271]. Die Anzahl adhärenen mikrobieller Zellen kann darüber hinaus stark vom Design des Adhäsionsexperiments beeinflusst werden, mögliche Varianten sind Flusskammern mit parallelen Platten, radiale Flusskammern, Zentrifugations-Assays, Schüttelassays und statische Adhäsionsassays mit Waschschrinen zur Entfernung ungebundener Zellen in beispielsweise Mikrotiterplatten [35,192,221]. Eine umfangreiche Auflistung der aktuell gängigen Techniken mit ihren jeweiligen Stärken (und Schwächen) findet sich in einem Review von Alam und Kollegen [6].

2.5.2 Adhäsionsstudien mit *S. aureus* auf Zentralen Venenkathetern

Die Adhäsion von *S. aureus* auf ZVKs soll in dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielen. Dabei soll die individuelle Adhäsionsstärke einzelner Bakterienzellen quantifiziert werden. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung in diesem Themengebiet: Verschiedene Adhäsionsstudien beschäftigten sich bereits mit der Anhaftung von *S. aureus*-Zellen an ZVKs aus

Polyurethan, Silikon, Teflon und weiteren Kunststoffmaterialien [120,155]. Auch Untersuchungen auf proteinbeschichteten Kathetern wurden durchgeführt [52,93,280]. Auch die Adhäsion von *S. aureus* an oberflächenmodifizierte Katheter mit einem hydrophilen Hydrogel oder mit einer Heparin-Beschichtung, einem Blutgerinnungshemmer, der die *in vitro*-Adhäsion von Bakterien verringert, oder mit adsorbierten Blutplasmae Proteinen wurden untersucht [155,168,13]. Die bakterielle Adhäsion auf Kathetern wurde dabei häufig durch Elektronenmikroskopie visualisiert, und adhärenente lebende Bakterien wurden über ihre ATP-Aktivität, über Fluoreszenzfärbung oder über eine CFU-Bestimmung quantifiziert [93,155,216]. Die Adhäsionsraten entsprachen dabei in der Regel etwa 0,1 bis 1% aller im Assay eingesetzten Bakterien [155,137,138], was darauf hindeutet, dass die meisten Bakterien in Lösung verblieben oder beim Waschvorgang abgelöst wurden. Polyurethan- und Silikonkatheter haben sich in den letzten Jahrzehnten als die geeignetsten Kathetertypen im klinischen Alltag etabliert [44]. Polyurethankatheter sind aufgrund ihrer mechanischen Überlegenheit (d.h., gute Steifheit für die Insertion, typisches Weichwerden nach Positionierung in der venösen Blutbahn) und ihrer Biostabilität und Biokompatibilität heutzutage die am häufigsten verwendeten Kurzzeitkatheter [29]. Allerdings ergaben viele klinische Infektionsverläufe und *in vitro*-Studien, dass ZVKs aus Polyurethan durch Bakterien wie Staphylokokken gebunden wurden [13,23,245]. Für verschiedene *S. aureus*-Stämme konnte dabei auch die adhäsive Eigenschaft auf unkonditionierten und Blutplasma-beschichteten ZVKs gezeigt werden [137].

Obwohl Batch-Assays die Bedeutung und Gefahr der Adhäsion von verschiedenen *S. aureus*-Isolaten an ZVKs demonstriert haben, wurde die Adhäsionsstärke einzelner *S. aureus*-Zellen auf Polyurethankathetern bisher nicht untersucht. Die quantifizierte Adhäsionsstärke einzelner Bakterienzellen könnte das Verständnis über die bakterielle Adhäsion grundlegend erweitern, da in Zukunft theoretische Modelle entwickelt werden könnten, die bei der Materialentwicklung von Bedeutung sein können [268]. Für solche quantitativen Untersuchungen bedarf es hochauflösender Techniken und Anwendungen mit einzelnen Mikroorganismen, wie etwa der Rasterkraftmikroskopie-basierten Einzelzellkraftspektroskopie.

2.5.3 Adhäsionsstudien mit *C. albicans* auf Zahnschmelz

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Adhäsion von *C. albicans* auf Zahnschmelzprüfkörpern. Zahnschmelz wurde in der Literatur häufig anhand von künstlich hergestelltem Hydroxylapatit (HAP) nachgebildet, da Zahnschmelz zu 95 % aus HAP, einem Mineral aus Kalziumphosphat, besteht. HAP des Zahnschmelzes bildet längliche Nanokristallite (~ 100-1000 nm x 26 nm x 68 nm [L x W x H]:) und formt sich im Mikrometerbereich weiter zu Prismen aus, die aus der linearen Ebene der Oberfläche herausragen [114] (s. Abb. 5).

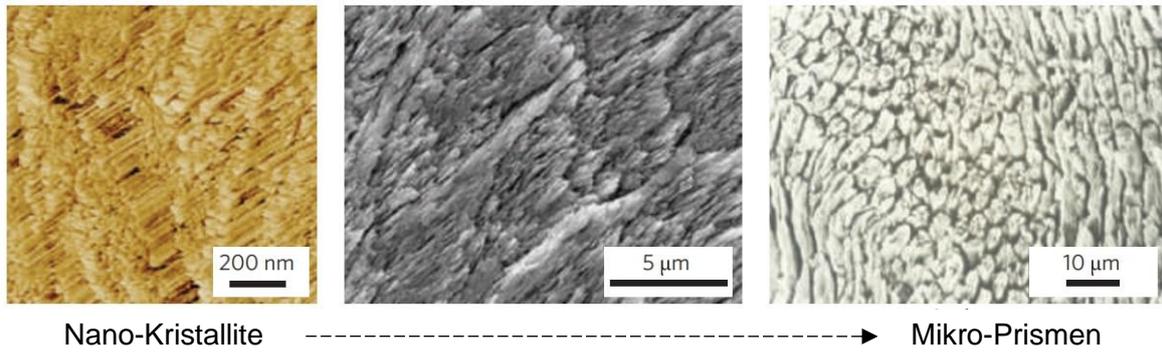


Abbildung 5: Hochauflösende Aufnahmen der Zahnschmelzoberfläche.

Kristallisiertes Hydroxylapatit ist hierarchisch eingeteilt und bildet bei der Entstehung von Zahnschmelz Nanokristallite und Prismen. Auf jeder Ebene entsteht eine geordnete Struktur. (Links) Rasterkraftmikroskopie, (Mitte und rechts) Elektronenmikroskopie. Adaptiert nach [114].

Die Mehrzahl der bis dato veröffentlichten Adhäsionsstudien mit *C. albicans* beschäftigen sich mit der Anhaftung von *C. albicans*-Zellen aus Batch-Kulturen an HAP [41,198,136,119,266]. In diesen Studien konnte u.a. gezeigt werden, dass *C. albicans* HAP in einem stärkeren Ausmaß bindet als etwa Polymethylmethacrylat (PMMA), welches in der Zahnmedizin in Teil- und Vollprothesen Verwendung findet [119]. Auf ähnliche Weise konnte eine stärkere Anhaftung von *C. albicans* an künstliche HAP-Kügelchen gezeigt werden als beim bakteriellen Karieskeim *S. mutans* [198]. Auf speichelbehandeltem HAP zeigte *C. albicans* dabei interessanterweise eine stärkere Adhäsion im Vergleich zu unbehandeltem HAP [206,266], was bereits dafür spricht dass Speichelkomponenten die Adhäsion, d.h. die Anzahl an gebundenen *C. albicans*-Zellen, positiv beeinflussen können. Einzelzellkraftspektroskopische Studien mit diesem opportunistischen Krankheitserreger wurden bisher weder an HAP noch an natürlichem Zahnschmelz durchgeführt, so dass bis dato unbekannt ist, mit welchen Adhäsionskräften *C. albicans* an diese Wirtsoberfläche zu binden vermag.

2.5.4 Bestimmung der Adhäsionsstärke einzelner pathogener Mikroorganismen mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscopy, AFM)-basierte Einzelzellkraftspektroskopie (engl. single-cell force spectroscopy, SCFS) ist eine Methode, um quantitative Adhäsionsparameter bei der initialen Adhäsion von individuellen Zellen, vorrangig Mikroorganismen, zu bestimmen [142]. Hierbei wird der Kraftsensor des AFMs, der Federbalken, beispielsweise mit einem einzelnen Bakterium zu einer Bakteriensonde funktionalisiert, wodurch bakterielle Interaktionen zu einer Substratoberfläche mithilfe des Federbalkens bestimmt werden können (s. Kapitel 3.4

„Rasterkraftmikroskopie“ und Kapitel 3.4.1.2 „Einzelzell-Kraftspektroskopie mit Mikroorganismen“). Die Bewegung der Bakteriensonde zum Substrat (Annäherung), der direkte Kontakt, und ihr Rückzug können genau beobachtet werden. Dabei ist es möglich mit Beginn der Rückzugsphase und des bakteriellen Ablösevorgangs zellindividuelle Adhäsionskräfte zwischen der Bakterienzelle und dem jeweiligen Substrat zu bestimmen [268]. Kang und Elimelech beschrieben erstmals die Herstellung von Bakteriensonden zur Bestimmung der Adhäsionskräfte einzelner, lebender Bakterien auf artifiziellen Oberflächen [142]. Bei diesem damals neuwertigen Verfahren wurde das Bakterium mit dem biologischen Klebstoff Polydopamin, einem Polymer mit adhäsiven Eigenschaften auf nahezu allen bisher bekannten Oberflächen, an den Federbalken befestigt und so die Bestimmung der Adhäsionskräfte lebender Bakterien ermöglicht [142]. Mithilfe der AFM-basierten SCFS ist heutzutage eine Quantifizierung von Adhäsionskräften über einen relativ umfassenden, physiologisch-relevanten Kräftebereich ($> 20 \text{ pN} - 100 \text{ nN}$) möglich, wohingegen anspruchsvolle Instrumente wie Optical Tweezer zwar kleine Kräfte ($10 - 200 \text{ pN}$) sehr gut auflösen können [86,303], aber ungeeignet dafür sind, die Bestimmung größerer bakterieller Adhäsionskräfte ($> 500 \text{ pN}$) zu realisieren [193,257,267]. Durch die AFM-basierte SCFS ist es auch einfacher die Kontaktbedingungen zwischen Bakterium und Substrat zu kontrollieren, wie etwa die Höhe der Aufdrückkraft oder die Kontaktzeit. Außerdem ist es möglich, dieselbe Zelle zum einen in ihrem nativen Zustand und zum anderen nach einem Proteinbad auf ihre Adhäsionsstärke hin zu testen und dabei den Einfluss der an die Bakterienzelle adsorbierten Proteine auf das Adhäsionsverhalten der Bakterienzelle an das gleiche Substrat zu identifizieren [254]. Ebenso kann die Bakteriensonde auf unterschiedlichen Oberflächen verwendet werden, da sie ohne größere Probleme zwischen verschiedenen Samples transferiert werden kann. Die SCFS ist zudem die einzige Technik, mit der man beim Ablösevorgang einen Kräftegradienten darstellen kann [262]. Dadurch ist es während des Ablösevorgangs des Bakteriums von der Oberfläche möglich, neben der maximalen Interaktionskraft, der Adhäsionskraft, auch die in der Interaktion lokalisierte Adhäsionsenergie zu bestimmen. Auch die Abreißlänge ist ein wichtiger Parameter, den man beim Ablösevorgang bestimmen kann und der den maximalen Abstand aufzeigt, bei dem der Kontakt des Bakteriums mit der Substratoberfläche beendet wird [254]. Basierend auf der SCFS wurden umfangreiche Protokolle zur Bestimmung der Adhäsion von einzelnen Bakterien auf abiotischen Oberflächen entwickelt [22,269]. Dadurch wurde unter anderem die Adhäsion von *S. aureus* auf abiotische Oberflächen wie hydrophile und hydrophobe Siliziumwafer untersucht und die Mechanismen der bakteriellen Adhäsion charakterisiert [267,268,256]. Diese und andere Untersuchungen führten zur Aufklärung der Bedeutung von van-der-Waals-Kräften, hydrophoben Effekten oder der Oberflächenrauigkeit und des Kontaktbereichs für die bakterielle Adhäsion [253,256,257].

Eine spezielle Anwendung des AFMs ist das FluidFM (engl. Fluidic Force Microscopy). Hierbei ist der AFM-Federbalken (hier auch Mikropipette genannt) mit einer Öffnung am freien Ende versehen, die über einen Mikrofluidik-Kanal im Federbalken mit einem Druckkontrollsystem verbunden ist. Durch

die Erzeugung eines negativen Druckes können so Mikrometer-Objekte wie humane Zellen, Hefezellen oder Bakterien an der Öffnung immobilisiert werden. Eine Pionierarbeit konnte die Adhäsionskräfte von *C. albicans* auf hydrophoben Dodecylphosphat-Oberflächen bestimmen; die Maximalwerte lagen dabei bei etwa 40 nN [219]. Eine weitere Arbeit beschäftigte sich mit der Adhäsion von *C. albicans* an nanostrukturierte Oberflächen [64]. Studien mit FluidFM-generierten Bakteriensonden, wie etwa mit den Bakterien *Escherichia coli* oder *Paracoccus seriniphilus* wurden ebenfalls beschrieben [126,220]. Der Vorteil der FluidFM-basierten SCFS ist der hohe Durchsatz von eukaryonten Zellen wie Hefen oder humane Zellen [219]. Kurzgefasst kann dabei eine einzelne Zelle mit dem Federbalken angesaugt werden, worauf dann die Quantifizierung der Adhäsion auf dem Substrat erfolgt. Anschließend wird die Zelle mit Überdruck entfernt und eine neue Zelle kann zur Funktionalisierung ausgewählt werden. Der Durchsatz mit Bakterien ist im Vergleich zur herkömmlichen Polydopamin-basierten SCFS mit dieser Methode jedoch geringer, da aufgrund des geringen Bakteriendurchmessers Nanopipetten (Öffnung: 300 nm) verwendet werden müssen, die nur eine vergleichsweise geringe Ansaugkraft gestatten, so dass die Bakterien nur schwierig per negativem Druck an die Nanopipette immobilisiert werden können oder aber nach aufwändiger Immobilisierung beim Messvorgang vielfach abgelöst werden [165].

2.5.5 Möglichkeiten zur Anwendung des AFMs auf Medizinprodukten

In der Literatur lassen sich viele Studien finden, die die Adhäsionskräfte von pathogenen Organismen über Einzelzellkraftspektroskopie auf genau definierten Oberflächen oder auf Grundstoffen von Implantaten, den Biomaterialien, testen [64,142,172,219,250,253,254,256,268,289]. Darunter lassen sich Adhäsionsstudien von *S. aureus* auch auf Biomaterialien von medizinischer Qualität, wie etwa Substrate aus Silikon finden [288,289]. Biomaterialien unterscheiden sich von den kommerziell erwerbbaeren Implantaten jedoch häufig insofern, dass die exakte Oberflächenbeschaffenheit von Implantaten meist unbekannt ist. Wie komplex die Verarbeitung eines Implantats sein kann, lässt sich am Beispiel von ZVKs erahnen, deren Oberflächen zur Prävention von Infektionen („Anti-Biofilm-Strategie“) manchmal zusätzlich mit antimikrobiellen Substanzen oder anti-adhäsiven Beschichtungen ausgestattet sind [233]. Um eine reelle Abbildung des Adhäsionsverhaltens von opportunistischen pathogenen Mikroorganismen auf, im Klinikalltag eingesetzten, Medizinprodukten zu erhalten, ist es wichtig, die Oberfläche des jeweiligen Medizinproduktes zu charakterisieren und die zellindividuelle Adhäsion auf diesem Material zu untersuchen und nicht auf einer aus ähnlichen Grundsubstanzen produzierten planen Oberfläche.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die semi-quantitative oder quantitative Bestimmung der Anzahl adhärenter Mikroorganismen auf abiotischen und medizinisch-relevanten Oberflächen wurde bis dato schon gut untersucht. Ebenso existieren schon viele Untersuchungen zum Einfluss humaner Wirtsfaktoren auf das Adhäsionsverhalten von *S. aureus* oder *C. albicans* auf Modelloberflächen. Aussagekräftige Untersuchungen zum zellindividuellen Adhäsionsvermögen, wie etwa die Adhäsionskraft der mikrobiellen Zellen, auf Medizinprodukten wie dem ZVK oder auf harten Gewebsoberfläche wie Zahnschmelz wurden bisher nicht durchgeführt. Auch der Einfluss von Körperflüssigkeiten wie Blut und Speichel auf das Adhäsionsvermögen der individuellen mikrobiellen Zelle wurde nur in Einzelfällen getestet [254]. Basierend auf den Pionierarbeiten von Thewes *et al.* (2015) und Potthoff *et al.* (2012) sollten in dieser Arbeit Bakterien- und Hefesonden generiert und verwendet werden, um die initiale Adhäsionsstärke, die sich aus den quantifizierbaren Daten zur Adhäsionskraft, Adhäsionsenergie und Abreißlänge einer einzelnen Zelle bestimmen lässt, zu ermitteln [219,269]. Im Speziellen sollten diese quantifizierbaren Parameter von *S. aureus* auf ZVKs und von *C. albicans* auf Rinderzahnschmelz in An- bzw. Abwesenheit relevanter Körperflüssigkeiten bestimmt werden. Die Adhäsionsstärke von *S. aureus* wurden in einem weiteren Projekt auch auf einer Endothelzelllinie bestimmt, um die Bedeutung der bakteriellen Adhäsion im direkten Vorfeld des Internalisierungsprozesses von *S. aureus* durch Endothelzellen zu evaluieren.

3 Material & Methoden

3.1 Materialien

Tabelle 3: AFM-Geräte und Zubehör.

Gerät / Zubehör	Hersteller	Material	Federkonstante (N/m)	Spitzenradius (nm)
Rasterkraftmikroskop-System BioScope Catalyst (Aufbau auf Leica DMI4000B-Lichtmikroskop)	Bruker, Santa Barbara, USA			
Rasterkraftmikroskopie-System FlexAFM mit FluidFM®-Addon (Aufbau auf Axiovert 10-Mikroskop)	Nanosurf, Liestal; Cytosurge, Glattbrugg, beide Schweiz			
FluidFM® micropipette (2 µm-Öffnung)	Cytosurge, Glattbrugg, Schweiz	Siliziumnitrid	0,3 (nominal)	spitzenlos
MLCT-O10 (D)	Bruker	Siliziumnitrid	0,03 (nominal)	spitzenlos
Qp-BioAC-CI	NanoAndMore GmbH, Wetzlar		0,3 (nominal)	< 30
SNL-10 (A)	Bruker	Siliziumnitrid	0,35 (nominal)	2 (nominal)

Tabelle 4: Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Argongas	Praxair, Düsseldorf
Blutagarplatten (enthalten 5 % Schafsblut in TSA)	Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Dopamin-Hydrochlorid	Thermo Fisher (Kandel), Kandel
Ethanol (99,9 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Humanes Fibrinogen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Humanes Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	VWR, Darmstadt
Kaliumchlorid	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR, Belgien
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Zentrale Beschaffung und Dienste, Saarbrücken
Natriumhypochlorit	Hedinger GmbH, Stuttgart
LIVE/Dead BacLight Bacterial Viability Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 5: Laborgeräte und Systeme.

Laborgerät/System	Hersteller
Absaugstation	Laboport Knf, Freiburg
Analysewaage Mettler PC4400	Mettler, Gießen
Autoklav Vakulab HP	MMM Group, Planegg/München
Axiovert 10 Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Feinwaage Mettler AE100	Mettler, Gießen
GeneQuant pro 1300 Spectrophotometer	Biochrom, Berlin
Magnetrührer	Ika, Staufen
Mikromanipulator	Narishige Group (Tokyo, Japan)
Mikroskop Leica DMI4000 B	Leica, Wetzlar
MilliQ™ Synthesis A10	Millipore, Billerica, USA
pH-Meter (PHM220)	Radiometer, Meterlab Meckenheim
Pipettboy acu 2	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Schüttelinkubator Multitron	Infors HAT, Einsbach
Sterilwerkbank HERA safe	Heraeus, Hanau
Ultraschallsonde 1510	Braun, Melsungen
UV Ozone Cleaner – ProCleaner™ Plus	BioForce Nanosciences; Salt Lake City, USA
Vortex	Scientific Industries, USA
Vakuum-Exsikkator	Duran, Wertheim/Main
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 6: Mikrobiologische Isolate.

Isolat	Beschreibung	Referenz
<i>S. aureus</i>		
HOM 6 (N315)	MRSA	[158]
HOM 415 (ATCC 12600)	DSM 20231, <i>agr</i> -	DSMZ
HOM 416 (PBM001)	DSM 20231, <i>clpC::erm(B); EmR</i>	[46]
HOM 433	MSSA, klinisch isoliertes CRBSI-Isolat	diese Arbeit, [108]
<i>C. albicans</i>		
ATCC 10231	DSM 1386, Nicht-invasiv, Gruppe (engl. clade) 2, Serotyp A	DSMZ

Tabelle 7: Eukaryotische Zelllinien

Isolat	Beschreibung	Referenz
<i>EA.hy926</i>		
(ATCC CRL2522)	Humane Endothelzellen, immortalisiert	[78]

Tabelle 8: Lösungen.

Medium/Puffer	Hersteller/Rezeptur
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco®, Invitrogen, Darmstadt
Glycerin (65 %)	65 ml Glycerol (100 %), 2,5 ml 1 M Tris/HCl pH 8,0, 2,45 g MgSO ₄ x 7H ₂ O _{rein} ; ad 100 ml H ₂ O _{rein}
H ₂ O _{rein}	18,2 MΩcm, <10 <i>parts per billion</i> Gesamtzahl an organischem Kohlenstoff; autoklaviert

Lysogeny Broth (LB)	20,0 g Difco™ LB Broth, Lennox (Beckton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Frankreich); ad 1 l H ₂ O _{rein}
NaClO (5%)	45 ml (11% Natriumhypochlorid); 55 ml H ₂ O _{rein}
PBS (10 x)	80,0 g NaCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ , 2 g KCl; ad 1 l H ₂ O _{rein} ; pH 7,4
TRIS-HCl (10 mM)	12,11 mg Trizma® (Sigma Aldrich, Steinheim) in 100ml H ₂ O _{rein} , pH 8,5
Tryptic Soy Broth (TSB)	30,0 g Bacto™ TSB (Beckton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Frankreich); ad 1 l H ₂ O _{rein}
Yeast Peptone Dextrose (YPD)	10,0 g Yeast Extract, 20,0 g Bacto Peptone, ad 1 l H ₂ O _{rein} , autoklaviert; 20,0 g Glucose (sterilfiltriert)

Tabelle 9: Software.

Software	Hersteller
Nanoscope Analysis v1.9	Bruker, Santa Barbara, USA
NanoScope v	Bruker, Santa Barbara, USA
Office® 365	Microsoft, Redmond, USA
OriginPro 2019b	OriginLab, Northampton, USA
Scanning Probe Image Processing (SPIP)	Software Image Metrology, Dänemark
Zotero 5.0.88	Center for History and New Media, George Mason-Universität, USA

Tabelle 10: Medizinprodukte.

Medizinprodukt	Hersteller/
Arrow CVC set DE-14703-S (Typ I)	Teleflex Medical GmbH, Fellbach
Arrow (explantiert)	wie oben
B. Braun Certofix Trio S 720 (Typ II)	B. Braun, Melsungen
B. Braun (explantiert)	wie oben
Blutentnahmesystem S-Monovette® 9 ml LH	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Skalpell	B. Braun, Melsungen
Kanüle Safety-Multiply®	Sarstedt, Nümbrecht

Vygon Seldipur Safe (Typ III)

Vygon, Aachen

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,2 µm-Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Einweg-Saugpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Costar, Wiesbaden
Falcons (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
FluoroDish FD35-100	World Precision Instruments (Friedberg)
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Klebstoff	Pattex
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroskopier-Glasobjektträger	Menzel, Braunschweig
Nunc® Cryo Tube	Nalge Nung International, Rochester, USA
Petrischalen Ø 94 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Socorex Acura®	Socorex, Ecublens, Schweiz
Pipettenspitzen (1000 µl, 100 µl, 10 µl)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (2 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Willco Wells GWST-5040	WillCo Wells (Amsterdam, Niederlanden)

3.2 Humanes Probenmaterial

- Humanes Vollblut wurde von gesunden, erwachsenen Spendern entnommen. Die Probandeninformation zur Studie und Einwilligungserklärung wurden den Spendern vorgelegt
- Explantierte ZVKs von Patienten stammten aus der klinischen Abteilung Innere Medizin V – Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin, UKS, Homburg
- Humaner Speichel und Zahnschmelzpellikel wurden von gesunden, erwachsenen Probanden gewonnen, die ihre Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie gaben

Die Studien und Prozesse zur Gewinnung von Blutmaterial und explantierten ZVKs wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes evaluiert und genehmigt (Code-Nummern 95/18 und 39/20). Protokolle zur Gewinnung und Kollektivierung von humanem Speichel und Pellikel wurden

ebenfalls genehmigt (Code-Nummern 283/03, 2016 und 54/21, 2021). Die Studien erfolgten nach den Richtlinien der Erklärung von Helsinki.

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung und Kryokonservierung von *S. aureus*

Bakterienisolate wurde für die Experimente in Flüssigmedium bei 37 °C im Multitron Schüttelinkubator (Infors, Bottmingen, Schweiz) angezogen. Bei den längeren Inkubationszeiten (16 h) der Übernachtskulturen wurde eine Umdrehungsgeschwindigkeit (UPM) von 150 UPM eingestellt, bei der Anzucht von 2,5 h-Kulturen wurde die UPM auf 225 erhöht. Das Ansetzen der Flüssigkulturen erfolgte dabei in Schüttelkolben mit einem Volumen/Medium-Verhältnis von 10:1. Zur Inokulation des Mediums mit Bakterien für Übernachtskulturen wurde eine einzelne Kolonie mit einer sterilen Impföse ins Medium überführt. Zur Herstellung der 2,5 h-Kulturen wurde frisches Medium mit der Übernachtskultur beimpft, so dass die frische Kultur eine Optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,05 als Startwert besaß.

Bakterienkolonien für Experimente und für die Kryokultivierung wurden auf TSA (engl. Trypticase Soy Agar)-Platten mit 5% Schafsblut (BD, Heidelberg) angezüchtet. Die Kultivierung erfolgte über Nacht (18 - 21 h) bei 37 °C im Hereaus B5042E-Inkubator (Willi Fischer KG, Frankfurt). Die bewachsene Blutagarplatte wurden in der Regel bis zu sieben Tage bei 4 °C aufbewahrt und längere Lagerungszeiten wurden aufgrund der Gefahr von mutagenen Prozessen im Bakteriengenom vermieden.

Kryokulturen der verwendeten *S. aureus*- Stämme wurden aus Übernachts-Flüssigkulturen in LB-Medium hergestellt. Dazu wurde die bakterielle Flüssigkultur zu sterilisiertem Glycerin (65% in H₂O_{steril}) in einem Nunc® Cryo Tube (Nalge Nunc International, Rochester, USA) gemischt. Die bakterielle Kryokultur enthielt dabei eine Glycerin-Endkonzentration von 15-25 % und ihre Lagerung erfolgte bei – 70 °C.

3.3.2 Isolierung des klinischen Bakterienisolats HOM 433

Das klinische *S. aureus*-Isolat HOM 433 wurde in Kooperation mit der Inneren Medizin V (AG Bahls, UKS Homburg) von einem kolonisierten ZVK eines Patienten gewonnen. Dafür wurde das Schlauchende des ZVKs mit Spitze vom Rest getrennt und in ein Transportröhrchen überführt. Mithilfe des Rohrpostsystem des UKS' wurde das Patientenmaterial dann an das IMMh versandt. Das Material

wurde zunächst zwischengelagert bei -70 °C und dann auf einer Blutagarplatte nach der Technik von Maki in eine Festkultur überführt [173]. Aufgrund des möglichen Auftretens von Mischkulturen wurde eine Reinkultur, ebenfalls auf einer Blutagarplatte, angefertigt und einzelne Bakterienkolonien für die Kryokonservierung verwendet.

3.3.3 Kultivierung und Kryokonservierung von Hefezellen

Der verwendete *C. albicans*- Stamm DSM 1386 wurde für die Experimente in YPD-Flüssigmedium im Schüttelinkubator für 19 h bei 37 °C und 150 UPM angezogen. Für die Experimente wurde eine einzelne Kolonie des Pilzes auf einer TSA-Agarplatte mit 5% Schafsblut ins YPD-Medium überführt. Für verbesserte aerobe Wachstumsbedingungen wurde ein Volumen/Medium-Verhältnis von 12,5 : 1 ausgewählt. Kryokulturen wurden im Verfahren nach dem MAST Cryobank System (MAST, Diagnostica, Reinfeld) hergestellt, wobei einzelne *C. albicans*-Kolonien von der TSA-Agarplatte in das MAST-Medium mit Perlen eingerührt wurden. Die angesetzte Kryokultur wurde dann bei -70 °C aufbewahrt.

3.4 Rasterkraftmikroskopie

3.4.1 Einleitung zur Methodik

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. *Atomic Force Microscopy*; AFM) ist eine sehr fortschrittliche Oberflächen-Analysetechnik, mit deren Hilfe man Substratoberflächen topographisch abbilden und Variationen der Oberfläche nachempfinden kann, mit der Möglichkeit den dargestellten Regionen auch nanomechanische Eigenschaften, wie Elastizität oder Adhäsionskapazitäten, quantitativ zuzuordnen [25,75]. Diese Methode gestattet es Messungen in Vakuum, Luft oder in Flüssigkeit durchzuführen. Eine Behandlung der Substratoberfläche, wie etwa durch eine Fixierung durch Glutaraldehyd, sind in der Regel nicht notwendig [230]. Damit eignet sich das AFM im Besonderen für biologische Experimente, in denen es oft von erhöhter Bedeutung ist, dass Experimente in physiologischen Puffern oder Zellkulturmedien stattfinden und Materialien zudem in einem nativen Zustand (unfixiert, ungefärbt oder unmarkiert) verbleiben sollen (Müller und Dufrêne, 2011).

Das Herzstück der Rasterkraftmikroskopie ist eine mikroskopisch kleine Messspitze (bezeichnet im Folgenden als AFM-Spitze), die an einem „Kraftsensor“, dem Federbalken (Länge: $< 300\text{ }\mu\text{m}$) angebracht ist und mit der es möglich ist, eine Probenoberfläche in einem Rasterprozess topografisch darzustellen. Die AFM-Spitze kann verschiedene Geometrien (pyramidal, konisch, in Sonderfällen auch zylindrisch oder sphärisch) annehmen, und besitzt in der Regel einen Spitzenradius im geringen

Nanometer-Bereich. Somit ist es möglich, durch die Wahl einer geeigneten Spitzengeometrie und des Spitzenradius Substratoberflächen mit einer lateralen (X-Y) Auflösung von $\leq 1-5$ nm abzubilden [75]. Für eine erfolgreiche Abbildung ist es essenziell, repulsive Kräfte zwischen der AFM-Spitze und der Probe zu minimieren und die Aufdrückkraft konstant zu halten. Dafür werden die Verbiegungen des Federbalkens, die sich im für das menschliche Auge unsichtbaren nm-Bereich bewegen, mithilfe eines Laserstrahls, der auf die Rückseite des Federbalkens fokussiert und in eine segmentierte Photodiode reflektiert wird, amplifiziert. Bei jeder Verbiegung des Federbalkens kommt es auf diese Weise zu einer Veränderung des messbaren Spannungssignals in der Photodiode [37,230]. Das Rasterkraftmikroskop enthält ein Rückkopplungssystem (engl. feedback circuit), welches Abweichungen des Spannungswertes in der Photodiode zu einem eingestellten Referenzwert korrigieren kann (s. Abb. 6). Wird der Referenzwert wieder erreicht, so erfährt wiederum die AFM-Spitze die für sie vorhergesehene Aufdrückkraft auf die Probenoberfläche. Somit lässt sich mithilfe des Rückkopplungssystems die Aufdrückkraft des AFM-Spitze auf der Probenoberfläche kontrollieren, was ein wichtiges Kennzeichen dieser Technik ist. Erst dadurch wird es möglich weder die AFM-Spitze noch die Probenoberfläche zu deformieren oder zu beschädigen, was letztendlich entscheidend dafür ist, die Oberflächentopografie wirklichkeitsgetreu darzustellen.

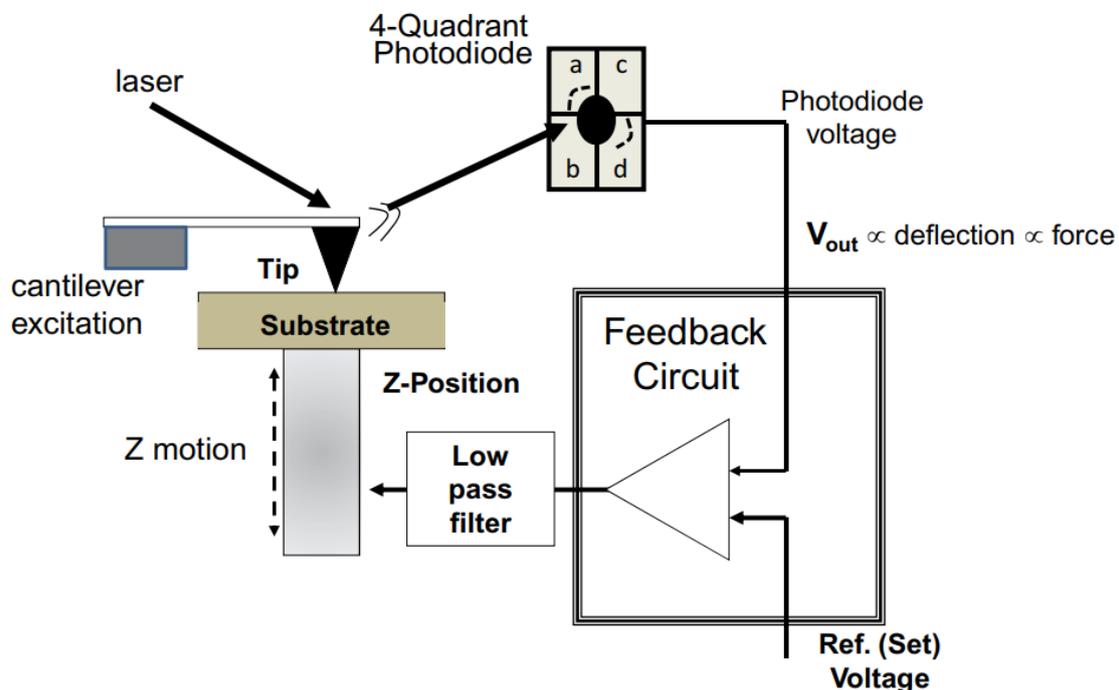


Abbildung 6: Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops beim Abbildeprozess von Substratoberflächen.

Schematische Darstellung der essenziellen Komponenten eines Rasterkraftmikroskops und ihre jeweilige Verknüpfung innerhalb der AFM-Rückkopplungsschleife, deren Funktion es ist, die Kraft zwischen der AFM-Spitze und der Substratoberfläche konstant zu halten. Beim topografischen

Abbildeprozess auf einer Substratoberfläche verursachen repulsive Interaktionskräfte eine Verbiegung des Federbalkens, welche mithilfe eines reflektierten Laserstrahls auf der Rückseite des Federbalkens in einer Photodiode amplifiziert und detektiert wird. In der Photodiode wird eine Veränderung des Spannungssignals (V_{out}) zum voreingestellten Referenzwert (V_{set}) registriert, woraufhin das Rückkopplungssystem des AFMs ein Fehlersignal kreiert, das der Differenz von V_{out} und V_{set} entspricht. Dieses Signal erreicht dann den Z-Positionierer (das Z-Piezoelement), der die Verbiegung des Federbalkens schließlich ausgleicht, um den Referenzwert V_{set} in der Photodiode wieder zu erreichen [230].

Die hohe Kraftkontrolle des AFMs erlaubt es dem Benutzer auch Kraftspektroskopien durchzuführen. Dabei werden Kraft-Distanz-Messung aufgenommen, bei der die Kräfte-Interaktion der AFM-Spitze mit der Substratoberfläche in Abhängigkeit von ihrer Distanz zueinander bestimmt wird. Dabei wird die AFM-Spitze der Substratoberfläche langsam angenähert und dann mit einer kontrollierbaren und geringen Aufdrückkraft im pN- oder nN-Bereich auf sie gepresst. In dieser Annäherungsphase kann die AFM-Spitze, ggf., bei einer attraktiven Interaktion zur Substratoberfläche, durch etwa vdW-Kräfte in den direkten Kontakt mit ihr „springen“. Dieses In-Kontakt-Schnappen erfolgt bei einem charakteristischen Abstand über der Substratoberfläche, der *Snap-in*-Distanz, mit einer maximalen Verbiegungskraft auf den Federbalken, der *Snap-in*-Kraft. Beim Ablösevorgang können, sofern es zu einer Adhäsion zwischen AFM-Spitze und Substrat kommt, Interaktionskräfte im pN- bis nN-Bereich aus der Rückzugskurve bestimmt werden. Weichere Federbalken besitzen eine höhere Sensitivität als härtere und ermöglichen die Auflösung von intermolekularen Kräften [25], sind im Gegensatz dazu aber eher ungeeignet, größere Kräfte aufzulösen. Die maximale Interaktionskraft beim Ablösevorgang zwischen AFM-Sonde und Substratoberfläche bezeichnet man als Adhäsionskraft und das mathematische Integral der Kraft entlang des (Ablöse-)Weges als Adhäsionsenergie, die der benötigten Arbeit für den Ablösevorgang der AFM-Spitze von der Substratoberfläche entspricht (s. Abb. 7).

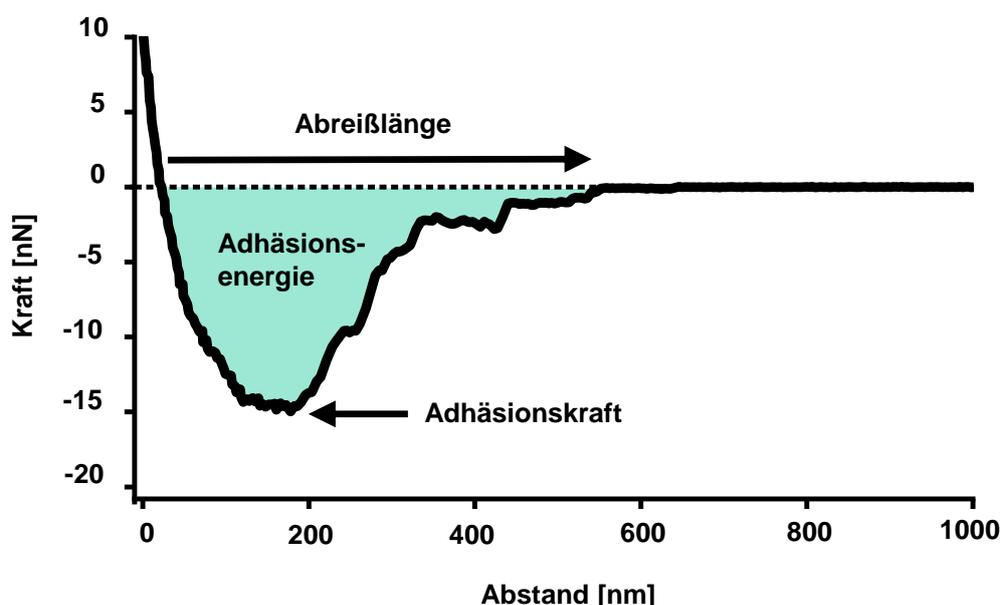


Abbildung 7: Quantifizierbare Adhäsionsparameter aus einer rasterkraftmikroskopischen Kraft-Distanz-Messung.

Dargestellt ist die Rückzugskurve während einer Kraft-Distanz-Messung mit einer AFM-Sonde, die hier beispielhaft mit einer lebenden Zelle statt mit einer AFM-Spitze behaftet ist, auf einer Substratoberfläche. Die Adhäsionskraft ist dabei der Minimalwert für die Kraft, die Abreißlänge kennzeichnet das Ende der Diskontinuität und den Übergang zur Basislinie, und die Adhäsionsenergie entspricht der hervorgehobenen Fläche und ist das Integral der Kraft entlang des Abstandes, der begrenzt ist vom 0 nm-Abstandswert und der Abreißlänge.

3.4.1.1 Modi zum Abbilden von topografischen und adhäsiven Substratoberflächen-Eigenschaften

Zur Darstellung der Substratoberfläche wird die AFM-Spitze rasterförmig auf dem zu charakterisierenden Areal bewegt. Dabei kann die AFM-Spitze in einer ständigen Berührung (Kontakt-Modus), oder in einem intermittierenden Kontakt-Modus mit der Oberfläche stehen. Der Kontakt-Modus ist eine sichere Abbildungstechnik für abiotische Oberflächen, jedoch kann es durch laterale mechanische Scherkräfte zu Brüchen an der AFM-Spitze kommen und auf weichen oder biologischen Oberflächen zur schnellen Kontamination der AFM-Spitze sowie zur Verformung von den biologischen Oberflächenstrukturen. Im intermittierenden Kontakt-Modus wird der Federbalken mit der AFM-Spitze in eine Schwingung versetzt, und die AFM-Spitze berührt die Oberfläche dabei, wahlweise, im unteren Wendepunkt der Amplitude der Resonanzfrequenz oder mit einer kontrollierten Aufdrückkraft (Peak Force) unterhalb der Resonanzfrequenz. Beide intermittierende Kontakt-Modi eignen sich gut für die Darstellung von biologischen Oberflächen, da laterale Scherkräfte zwischen der AFM-Spitze und der Substratoberfläche minimiert werden [8]. Die Schwingung bei Resonanzfrequenz wird im traditionellen „Tapping-Modus“ angewendet, der auf den meisten AFM-Systemen verfügbar ist, und normalerweise mit steifen Federbalken (Federkonstante 2 - 100 N/m) kombiniert wird. In diesem Modus folgt der schwingende Federbalken den Konturen der Probenoberfläche. Dabei wird die Höhenposition der AFM-Spitze während des Abbildens ständig angepasst, da Veränderungen innerhalb der Proben topografie zu Störungen der Resonanzschwingung des Federbalkens führen. In dem Tapping-Modus können mithilfe des Phasen-Signals auch mechanische Eigenschaften der Substratoberfläche abgelesen werden, basierend auf einer Phasenverschiebung zwischen den sinusförmigen *drive signal* und Schwingung des Federbalkens. Eine präzise Beschreibung von (kontakt-)mechanischen Eigenschaften ist anhand der Phasenverschiebung allein nicht möglich. Dafür eignet sich der PF QNM (engl. PeakForce Quantitative NanoMechanics)-Modus besser, der von Bruker (Santa Barbara, CA, USA) in 2009 entwickelt wurde. In diesem Modus, in dem der Federbalken unterhalb der Resonanzfrequenz zur Schwingung gebracht wird, kann die Aufdrückkraft (hier: engl. peak force) mit pN-Genauigkeit kontrolliert werden. Dadurch können Annäherungsphase und Rückzugsphase der Kraft-Distanz-Kurven präzise auf weitere

nanomechanische Eigenschaften ausgewertet werden. Die Elastizität der Probenoberfläche kann durch die Annäherungsphase begutachtet werden und Elastizitätskarten der Areale können erstellt werden. Adhäsionskräfte können aus den Rückzugskurven quantifiziert und grafisch als Adhäsionskarte dargestellt werden.

3.4.1.2 Einzelzell-Kraftspektroskopie mit Mikroorganismen

Die Einzelzellkraftspektroskopie ermöglicht es, das Annäherungs- und das Adhäsionsvermögen von einzelligen Mikroorganismen auf verschiedenen Oberflächen zu beurteilen und simultan zu quantifizieren [45,191,268]. Dafür wird eine einzelne Zelle mithilfe eines biokompatiblen Klebstoffes am freien Ende eines spitzenlosen Federbalkens immobilisiert [22,142,269]. Eine stabile Biofunktionalisierung erfolgt etwa durch Polydopamin, einem von bioadhäsiven Muschelproteinen inspiriertem Derivat des Katecholamins Dopamin [142]. Diese Art der chemischen Immobilisierung beeinträchtigt die Lebensfähigkeit des Bakterium nicht, wodurch Kraft-Distanz-Messungen mit lebenden Bakterienzellen ermöglicht werden [269]. Der Vitalitätszustand des Mikroorganismus kann zusätzlich anhand eines Lebend-Tot-Farbstoffes nach den Experimenten visualisiert werden (s. Abb. 8).

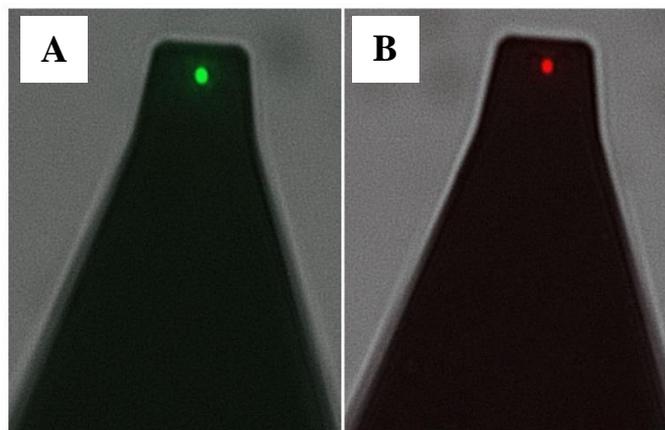


Abbildung 8: Polydopamin-basierte Funktionalisierung von AFM-Federbalken mit individuellen, viablen Bakterien.

Nach einer Behandlung mit dem Bioklebstoff Polydopamin können Silikonitrid-Federbalken zur Immobilisierung eines Bakteriums genutzt werden. Mithilfe eines inversen Lichtmikroskops und der feinen Hydrauliksteuerung eines Mikromanipulators kann ein individuelles Bakterium am Federbalken immobilisiert werden. Lebend-tot-Färbung (A) eines lebenden *S. aureus*-Bakteriums nach 100 Kraft-Distanz-Kurven oder (B) nach Abtötung des Bakteriums durch Ethanol. Adaptiert nach [269].

Eine alternative Methode zur Anbindung von lebenden Zellen an den Federbalken ermöglicht das FluidFM [126]. Hierbei werden modifizierte Federbalken mit einem integrierten Mikrofluidik-Kanal und einer Öffnung am freien Ende (Mikro- oder Nanopipetten) genutzt, um individuelle Zellen mithilfe eines Negativdrucks zu immobilisieren (s. Abb. 9). Diese Methode wurde bereits verwendet, um verschiedene Zelltypen, auch mit größeren Durchmessern als Bakterien, wie etwa Hefezellen, darunter auch *C. albicans*, oder humane Zellen zu immobilisieren und deren Adhäsionsstärke zu testen [56,68,219].

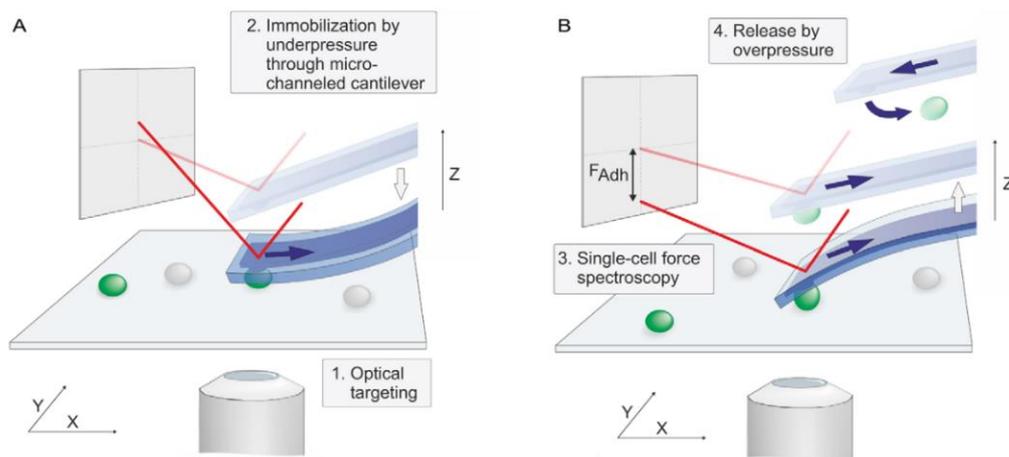


Abbildung 9: FluidFM-basierte Funktionalisierungsmethode zur Anbringung von individuellen Zellen an eine AFM-Mikropipette.

Die Funktionalisierung einer Mikropipette, eines Federbalkens mit integriertem Mikrofluidik-Kanal, erfolgt mithilfe eines Negativdrucks und eignet sich im Besonderen für größere Mikrometerobjekte wie einzellige Pilze und humane Zellen. Nach Beendigung des Experiments kann die Zelle mithilfe von Positivdruck, oder durch kurzes Anheben des Federbalkens aus der Flüssigkeit wieder entfernt werden. Adaptiert nach [219].

3.4.2 Abbilden der Oberflächeneigenschaften von ZVKs im intermittierenden Kontaktmodus

In dieser Arbeit wurden im PF QNM-Modus Oberflächentopografien und kontaktmechanische Eigenschaften von Zentralen Venenkathetern unter Einfluss von HBP untersucht. Der PF QNM-Modus auf ZVKs verhindert in Gegenwart von Blutplasmaproteinen oder anderen weichen Oberflächenstrukturen ihr Loslösen von der Oberfläche und verringert dadurch maßgeblich eine Kontamination der AFM-Spitze. Die hohe Kontrolle der Aufdrückkraft reduziert auch Brüche an der AFM-Spitze und Beschädigungen der Substratoberfläche [131]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei kommerziell erhältliche ZVK-Modelle (ZVK-Typen I bis III) verwendet (Typ I: Arrow CVC set DE-

14703-S, Teleflex Medical GmbH, Fellbach; Typ II: Certofix Trio S 720, B. Braun, Melsungen; Typ III: Seldipur Safe, Vygon, Aachen).

Vorbereitung der ZVKs für die Rasterkraftmikroskopie:

Die steril verpackten Katheter wurden unter einer Biosicherheitswerkbank der Klasse II (Heraeus, Hanau) geöffnet, um die Sterilität der Katheterfragmente weiterhin zu gewährleisten, und um eine potenzielle Ablagerung von Fremdpartikeln aus der Luft zu reduzieren. Für die Oberflächencharakterisierung der ZVKs und Adhäsionsexperimente mit Bakterien wurde der Katheterschlauch (engl. tubing) ohne Katheter-Spitze verwendet. Dieser wurde mit einem sterilen B. Braun-Einmal-Skalpell (Aesculap AG, Tuttlingen) in 0,5 cm-große Fragmente zerteilt. Einzelne Fragmente wurden nachfolgend auf eine flache Petrischale mit Glasboden (WillCo Wells, Amsterdam, Niederlande) mit einem wasserunlöslichen Klebstoff (Pattex, Düsseldorf) fixiert und zur Aushärtung des Klebers (und Entweichung von dessen Dämpfen) für 30 min in der Biosicherheitswerkbank platziert.

Die fixierten ZVK-Fragmente wurden dann, je nach Versuchsablauf, mit HBP (Kontrollbehandlung: PBS) behandelt. Dafür wurden im Vorfeld des Experiments Vollblutproben von gesunden Probanden gesammelt. Aus zwei Lithium-Heparin-Blutentnahmeröhrchen (16 I.E. / ml Blut, Sarstedt, Nümbrecht) mit 9 ml Vollblut wurden unter der Sterilbank 1 ml Aliquots erstellt und für 2 min bei 5.000 UPM zentrifugiert. Der Überstand mit dem Blutplasma wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und ein zweites Mal zentrifugiert. Das Blutplasma wurde isoliert und in einem frischen Reaktionsgefäß bis zur weiteren Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. ZVK-Fragmente für AFM-Experimente wurden mit $\sim 500\text{ }\mu\text{l}$ Blutplasma für 30 min bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurden die ZVK-Fragmente achtmal in PBS zur Entfernung nicht-adsorbierter Moleküle gewaschen [1], wobei die Waschlösung nicht direkt auf dem ZVK pipettiert wurde, um die biologische Beschichtung nicht zu beschädigen. Schließlich wurde das vorbereitete ZVK-Substrat mit 4 ml PBS überschichtet.

Abbildern und Auswertung:

Zur Bestimmung der Oberflächentopografien und kontaktmechanischen Adhäsionseigenschaften der Zentralen Venenkatheter wurden Federbalken mit einer pyramidalen Spitze SNL-10 (Nom. Federkonstante: 0,35 N/m; Bruker, Santa Barbara; USA) oder einer zirkular-symmetrischen Spitze qp-BioAC-CI (Nom. Federkonstante: 0,3 N/m (Nanosensors, Neuchatel, Schweiz) verwendet. Die PeakForce-Amplitude wurde auf 150 nm eingestellt. Danach wurde die Katheteroberfläche auf einem Areal von $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ bei einer Scan-Frequenz von 0,1 Hz und einer Resolution von 256×256

Samples/Linie abgebildet. Zur Bestimmung der Topografien wurden die Rohbilder mit den Funktionen *Flatten* (1. Ordnung) und *Plane Fit* (0.Ordnung) in Nanoscope Analysis Version 1.9 (Bruker Nano, Santa Barbara, USA) korrigiert. Oberflächeneigenschaften, die mit der Topografie assoziiert sind, wie die mittlere Rauigkeit (engl. *root mean square* [rms]) und die dimensionslose Schiefe wurden über ein Areal von 10 µm x 10 µm bestimmt. Die kontaktmechanischen Eigenschaften (Adhäsion) wurden parallel zur Bestimmung der Topografie in einem separaten Kanal des PF QNM-Modus aufgenommen. ZVK-Fragmente von verschiedenen Modellen wurden im fabrizierten Zustand oder nach Behandlung mit PBS bzw. HBP untersucht. Für jede Bedingung wurden drei verschiedene Stellen auf den ZVK-Oberflächen abgebildet.

3.4.3 Einzelzell-Kraftspektroskopie mit *S. aureus* auf ZVKs

Vorbereitung der Bakterien:

Um die Adhäsionsstärke von individuellen *S. aureus* -Bakterienzellen auf dem ZVK zu bestimmen, wurden Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase nach 2,5 h-Wachstumszeit in TSB verwendet. 1 ml dieser Hauptkultur wurde für 1 min bei 12.000 UPM zentrifugiert und das Bakterienpellet zweimal in 1 ml 1 x PBS gewaschen. Für die Einzelzell-Kraftspektroskopie waren vereinzelte Bakterien nötig. Daher wurde 1 µl der Hauptkultur (1:100 Verdünnung in PBS) zur Sedimentation der Bakterien auf eine Petrischale pipettiert. Die Sedimentation der Bakterien dauerte bei geschlossenen Schale 2-3 min, während dieser Zeit konnte der Tropfen auch nicht maßgeblich verdunsten. Anschließend wurden 30 µl PBS auf den kleineren Tropfen gegeben, um die Bakterien in Flüssigkeit zu halten und vor dem Austrocknen zu schützen.

Vorbereitung der ZVK-Fragmente:

Die verwendeten ZVK-Fragmente wurden wie zuvor beschrieben vorbereitet (s. Kapitel 3.4.2 "Vorbereitung der ZVKs für die Rasterkraftmikroskopie"). Explantierte ZVKs der Typen I und II wurden nach Erhalt vom Patienten aus der Klinik (Innere Medizin V – Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin, UKS, Homburg) in Fragmente aufgeteilt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei – 70 °C weggefroren und unmittelbar vor den AFM-Experimenten auf Glasschalen (WillCo Wells, Amsterdam, Niederlande) mit Pattex-Kleber befestigt. Das Trocknen des Klebers erfolgte in einer Feuchtigkeitskammer, um das natürliche Protein-Coating des individuellen Patienten auf dem Katheter vor der Austrocknung zu schützen.

Dopaminbehandlung der Federbalken:

Für die Einzelzell-Kraftspektroskopie sollte ein einzelnes Bakterium an einen spitzenlosen Federbalken (MLCT-010, nom. Federkonstante: 0,03 N/m, Bruker, Santa Barbara, USA) angebracht werden. Für die benötigte adhäsiven Eigenschaften des Federbalkens wurde dieser mit Dopamin, wissenschaftlich auch 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethylamin, (Thermo Fisher, Kandel) behandelt. Dafür wurde der Federbalken zunächst in einem Ozon-/UV-Reiniger (BioForce Nanosciences; Salt Lake City, USA) für 15 min gereinigt und in eine mit Parafilm beschichtete Petrischale positioniert. 100 µl einer Dopamin-haltigen Lösung (4 mg/ml Dopamin in 10 mM Tris-HCL; pH 8,5) wurden auf den Federbalken gegeben für eine Inkubationsdauer von 1 h bei 4 °C gelagert. In dieser Zeit wechselte der ursprüngliche farblose Tropfen seine Färbung in dunkles braun mit einer leichten Trübung, die ein Indiz für die Polymerisation des Dopamins darstellt. Anschließend wurde der Federbalken dreimal in 100 µl sterilisiertem, ultrareinem H₂O gewaschen und für 1 h in der Sterilbank zum Trocknen gestellt.

Kalibrierung der Federbalken:

Jeder einzelne Federbalken wurde für eine zuverlässige Ermittlung der Kraft aus der Federbalkenverbiegung in zwei Schritten kalibriert. Im Kalibrierungsprozess wurde zunächst die Verbiegung des Federbalkens in nm aus der Änderung des Spannungssignals in der Photodiode in V ermittelt. Diese Beziehung wird auch als Verbiegungssensitivität (nm/V) definiert. Anhand der Federkonstante wurde darauf der Zusammenhang zwischen der Verbiegung und der Kraft in N experimentell bestimmt. Die Zweischnitt-Kalibrierung diente dazu, ggf. abweichende Werte von den nominalen Herstellerangaben festzustellen. Zur Bestimmung der Verbiegungssensitivität wurde eine harte, undeformierbare Substratoberfläche benötigt [269], wofür die Glas-Oberfläche eines herkömmlichen Glasobjektträgers (Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) ausgewählt wurde. Der Federbalken wurde dann auf der Glasoberfläche aufgedrückt, bis ein Referenzwert, eine vordefinierte Auslenkung des Lasers in der Photodiode in Volt, erreicht wurde. Dabei wurde der Fahrweg des Z-Weg-Piezomotors, der die Bewegung des Federbalkens steuert und die Verbiegung auf dem Glas kontrolliert, aufgezeichnet. Diese auf diese Weise ermittelte Verbiegungssensitivität betrug in der Regel ~ 25 nm/V für den Federbalken D (MLCT-O10, Bruker, Santa Barbara, USA). Die Federkonstante wurde mithilfe des thermischen Rauschens (engl. *thermal noise*) der Umgebung und die dadurch verursachten zufälligen Verbiegungen des Federbalkens experimentell bestimmt. Vereinfacht dargestellt in (1), kann bei harmonischen Schwingungen des Federbalkens die Federkonstante aus der Gesamtenergie des Systems und der potenziellen Energie berechnet werden

$$k = K_B T / x_z^2 \quad (1)$$

wobei:

k = die Federkonstante

K_b = Die Boltzmann-Konstante, $1,38 * 10^{-23}$ Joule/Kelvin

x_z = die Verbiegung des freien Endes des Federbalkens

Die experimentell ermittelte Federkonstante für den o.g. Federbalken betragen in der Regel zwischen 0.04-0.09 N/m.

Funktionalisieren des Federbalkens mit einem Mikromanipulator:

Die Funktionalisierung des Federbalkens zur Bakteriensonde wurde mithilfe eines Mikromanipulators (MOM 202D, Narishige, Tokyo, Japan), und somit extern vom AFM-Setup, durchgeführt [269]. Bei einem Mikromanipulator handelt es sich um einen Aufbau für ein Lichtmikroskop, der es erlaubt, mithilfe einer Hydrauliksteuerung mechanische Mikrometer-Manipulationen durchzuführen. Unter Zuhilfenahme eines selbst-konstruierten Mikromanipulator-Arms konnte dort der bewegliche Federbalkenhalter des AFMs verankert werden. Der Federbalkenhalter wurde dazu genutzt, den Federbalken in das Mikromanipulator-System einzubauen. Für die Funktionalisierung des Federbalkens mit einer individuellen *S. aureus*-Bakterienzelle wurden die o.g. sedimentierten Bakterien auf der Petrischale zur Hilfe genommen. Die Vorgehensweise zur Funktionalisierung des Federbalkens folgt dem Protokoll von Thewes *et al.* [269].

Einzelzellkraftspektroskopie auf ZVKs:

Die generierte Bakteriensonde wurde in den AFM-Messkopf wiedereingebaut. Hierbei war es wichtig, dass die Laserintensität in der Photodiode vor Ausbau und nach Wiedereinbau des Federbalkens in den AFM-Messkopf unverändert war (Abweichungen von wenigen 100 mV wurden toleriert), da es ansonsten zu Ungenauigkeiten der eingestellten Kalibrierungswerte und zu falschen Quantifizierungen bei der Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven kommen kann. Nach Wiedereinbau wurde die Funktionalität der Bakteriensonde auf einer hydrophoben Glasoberfläche (FluoroDish, World Precision Instruments, Friedberg, Germany) überprüft. Kraft- Distanz -Kurven, die keine simultane Streckung von Zellwand-gebundenen Adhäsionsfaktoren vermuten oder erkennen ließen, wurden aussortiert. Nach erfolgreichem Test wurde das hydrophobe Glas-Sample durch das vorbereitete ZVK-Fragment (s.

Kapitel 3.4.2 „Abbilden der Oberflächeneigenschaften von Zentralen Venenkathetern im intermittierenden Kontaktmodus“) ausgetauscht. Die Bakteriensonde wurde bei maximalem Sicherheitsabstand über dem ZVK platziert und schrittweise der Oberfläche angenähert. Entsprechend einer selbst entwickelten Prozedur wurde die Bakteriensonde der Mitte des Katheteroberfläche angenähert (s. Abb. 10) mit einer angewandten Kraft (engl. deflection setpoint) von ≤ 2 nN.

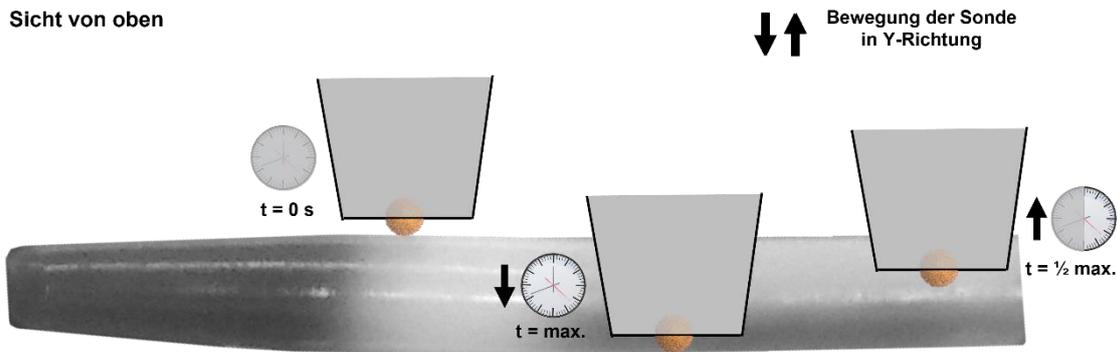


Abbildung 10: Optischer Annäherungsprozess der AFM-Bakteriensonde auf die ZVK-Oberfläche mithilfe eines Inversmikroskops.

Die Bakteriensonde wurde nach einer ersten groben Annäherung an die ZVK-Oberflächenmitte in einem ausreichenden Höhen-Abstand von $50 \mu\text{m}$ an den oberen Rand des ZVKs gefahren. Die Zeit zur kompletten Überfahrt bis zum unteren Rand des ZVKs wurde dann ermittelt. Die Bakteriensonde wurde dann wieder die Hälfte der Zeit zurückgefahren, wo sich die geschätzte Mitte des ZVKs befand. Die Bakteriensonde wurde der Oberfläche angenähert und Kraft-Distanz-Kurven wurden aufgenommen.

Die kraftspektroskopischen Messungen mit der Bakteriensonde auf dem ZVK wurden innerhalb von fünf Minuten nach Eintauchen des ZVK-Fragments in PBS gestartet. Auf der ZVK-Oberfläche wurde 10 Kraft-Distanz-Kurven auf verschiedenen Positionen durchgeführt, mit einem lateralen Mindestabstand von mindestens $1 \mu\text{m}$ in x-Richtung zwischen zwei Kraft-Distanz-Messungen. Dabei wurden für jede Kraft-Distanz-Kurve eine Aufdrückkraft von 300 pN , Annäherungs- und Rückzugsgeschwindigkeiten von 160 nm/s und eine Fahrtstrecke von 800 nm festgesetzt. Die Viabilität des Bakteriums wurde nach den SCFS-Experimenten mit einer 1:1000 Verdünnung eines Leben-tot-Farbstoffes (LIVE/Dead BacLight Bacterial Viability Kit, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) bestätigt.

3.4.4 Einzelzell-Kraftspektroskopie mit *S. aureus* auf Endothelzellen

Vorbereitung der Bakterien:

Um die Adhäsionskräfte und Abreißlängen von individuellen *S. aureus*- Zellen auf Endothelzellen zu bestimmen, wurden Bakterien des Stammes DSM 20231 oder seiner isogenen *clpC*-Mutante aus der stationären Wachstumsphasen aus 16 h-Übernachtskulturen in LB-Medium verwendet. Die Vorbereitung der Bakterien für die Einzelzell-Kraftspektroskopie folgt der Prozedur aus Kapitel 3.4.3.

Vorbereitung der Endothelzellen:

Endothelzellen der Linie EA.hy926 wurden für die Einzelzell-Kraftspektroskopie ausgewählt. Die Kultivierung sowie Subkultivierung von EA.hy926 und das Verfahren zur Einstellung definierter Zellzahlen mithilfe der Trypanblaufärbung von Zellen folgten jeweils den dazugehörigen, zuvor veröffentlichten Protokollen [79]. Am Vortag der AFM-Messungen wurden $7,5 \times 10^4$ Zellen in DMEM in einer Petrischale mit Glasboden ausgesät und die Zellen für 24 h adhären gelassen. Am Messtag wurde das DMEM durch entsprechendes frisches Medium ausgetauscht.

Einzelzellkraftspektroskopie auf ZVKs:

Nachdem der AFM-Federbalken – wie in Kapitel 3.4.3 bereits beschrieben – vorbereitet und mit einer individuellen *S. aureus*- Zelle funktionalisiert wurde, wurde die Bakterionsonde an die flache Oberfläche des Lamellipodiums einer einzelnen EA.hy926-Zelle angenähert. Daraufhin wurden 8 x 8 Kraft-Distanz-Messungen auf einem Areal von $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ auf dem Lamellipodium bei Raumtemperatur durchgeführt. Kraft-Distanz-Messungen erfolgten in DMEM bei einer Aufdrückkraft von 1000 pN bei einer Kontaktzeit von 250 ms, bei den Annäherungs- und Rückzugsgeschwindigkeiten von 1000 nm/s und bei einer Fahrtstrecke von $7 \mu\text{m}$. Daten von fünf Zellpaaren zwischen jeweils EA.hy926 und DSM20231 oder der isogenen *clpC*-Mutante wurden gesammelt.

3.4.5 Einzelzell-Kraftspektroskopie mit *C. albicans* auf Zahnschmelzprüfkörpern

Vorbereitung der Zahnschmelz-Prüfkörper und der Speichelpellikel:

Zahnschmelzprüfkörper mit der finalen Größe 3 mm x 4 mm x 1 mm wurden von der vestibulären Oberfläche von Rinder-Schneidezähnen gewonnen. In der Arbeitsgruppe von Prof. Matthias Hannig (Forschung Zahnerhaltung, UKS, Homburg) wurden die Zahnschmelzprüfkörper in der finalen Größe und Oberflächenstruktur vorbereitet: Die Prüfkörper wurden mit Schleifpapier (Bühler, Düsseldorf) in aufsteigender Körnung (Max. 4000) im Nassen poliert. Die maximale Körnung ist verantwortlich für das feine Schliffbild des Zahnschmelzes. Nach dem Schleifprozess wurde der Zahnschmelzprüfkörper für 3 min in 3% Natriumhypochlorit, für 10 min in destilliertem Wasser behandelt bzw. gereinigt, und für 15 min in 70%igem Isopropanol sterilisiert. Vor Verwendung am AFM wurde der Zahnschmelzprüfkörper für mindestens 12 h in Wasser äquilibriert.

Am IMMH wurde der Zahnschmelzprüfkörper für die AFM-Messungen mit einem wasserunlöslichen Klebstoff (Pattex, Düsseldorf) auf einer Glasboden-Schale (FluoroDish, World Precision Instruments, Friedberg) befestigt. Die Aushärtung des Klebers erfolgte bei halb offener Schale für 15 min bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit wurde der Prüfkörper mit ~20 µl Wasser bedeckt, um ein Trocknen der Zahnoberfläche zu vermeiden.

Um einen 3-Minuten-Pellikeln auf der Zahnschmelzoberfläche erzeugen zu können, wurden Speichelproben von zwölf Spendern gesammelt und zu Universalspeichel verarbeitet. Diese Prozedur wurde von der AG Hannig durchgeführt. Dabei wurde Speichelflüssigkeit des individuellen Spender zweimal für 10 min bei 14.000 UPM und 2 °C zentrifugiert, wobei die orale Begleitflora entfernt wurde. Danach wurden alle individuellen Speichelproben der Spender zu Universalspeichel vereinigt und bis zur weiteren Verwendung am AFM in kleineren Aliquots bei - 80 °C gelagert. Am IMMH wurde der Zahnschmelzprüfkörper in eine Feuchtigkeitskammer in eine Petrischale gelegt und mit ~ 20-25 µl Universalspeichel beschichtet. Aufgrund der guten Tropfenbildung des Speichels auf dem Prüfkörper blieb der Tropfen problemlos auf der Oberfläche haften, ohne dabei zu verlaufen. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei 37 °C wurde das Volumen wieder abgenommen und die Oberfläche viermal mit 25 µl PBS gewaschen. Der Prüfkörper mit dem fertigen Speichelpellikel wurde dann mit 3 ml PBS überschichtet und für AFM-Messungen verwendet.

Das in situ-Tragen von Zahnschmelzprüfkörpern:

Um das zellindividuelle Adhäsionsvermögen von *C. albicans* auf *in vitro*-speichelbeschichteten Zahnschmelzprüfkörpern mit *in situ*-getragenen Zahnschmelzprüfkörpern zu vergleichen, wurden für die AFM-Studien Zahnschmelzprüfkörper bei einem gesunden Probanden auf der bukkalen Seite des Unterkiefers platziert und biokonditioniert. Spätestens 2 h vor dem Einsetzen des Prüfkörpers wurde die letzte Mahlzeit eingenommen. Etwa 30 min vor dem Einsetzen des Prüfkörpers erfolgte ohne Zahnpasta die Zahnreinigung mit einer Zahnbürste. Es folgte das Tragen des Prüfkörpers. Nach einer Inkubationszeit des Prüfkörpers für 3 min in der Mundhöhle wurde er vorsichtig in ein Becherglas mit 300 ml sterilem H₂O überführt. Anschließend wurde der in der Mundhöhle exponierte Prüfkörper mit einer Pinzette in eine Wiege-Schale gelegt und mit einer Druckflasche mit sterilem Wasser gespült. Dieser Waschprozess war notwendig, um gröbere Ablagerungen von der Prüfkörper-Oberfläche zu entfernen.

Vorbereitung der Pilze:

Um die Adhäsionsstärke von *C. albicans* auf Zahnschmelzprüfkörper zu quantifizieren, wurden Hefezellen aus einer 19 Stunden-Kultur in YPD-Medium gewonnen. Es wurde 1 ml der kultivierten Zellen bei 5000 UPM für 5 min zentrifugiert und zweimal in 1 ml PBS gewaschen. Für die Einzelzell-Kraftspektroskopie sollten einzelne *C. albicans*-Hefezellen an einer Mikropipette (nom. Federkonstante: 0,3 N/m, Öffnung: 2 µm, Cytosurge, Glattbrugg, Schweiz) immobilisiert werden. Für diesen Funktionalisierungsprozess wurden die gewaschenen *C. albicans*-Zellen zunächst 1:200 verdünnt, was einer OD₆₀₀ ≈ 0,3 entsprach. Von dieser Verdünnung wurde 1 µl auf eine Glas-Schale (World Precision Instruments, Friedberg) in 2 µl vorpipettiertes PBS gegeben. Es folgte eine Sedimentationszeit von 2-3 min bei geschlossener Zellkulturschale. Anschließend wurden ~ 40 µl PBS auf den kleineren Tropfen gegeben, um die nun adhärenen Hefezellen in Flüssigkeit zu halten, und die Sedimentationszeit wurde auf insgesamt 15 min erhöht.

Behandlung von C. albicans-Zellen mit Speichel:

In dieser Arbeit sollte auch das Adhäsionsvermögen von speichelbehandelten Hefezellen beurteilt werden. Zur Beschichtung der Hefezellen mit Universalspeichel wurde 1 ml der 19-Stunden-Kultur auf eine OD₆₀₀ = 3 normalisiert und die Zellen für 2 min bei 5000 UPM zentrifugiert und pelletiert. Der

Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Speichel resuspendiert. Anschließend wurden die speicheldurchmischten Zellen in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß übertragen und bei 37 °C für 15 min im geschlossenen Reaktionsgefäß im Brutschrank behandelt. Die Zellen wurden gewaschen, indem das Volumen auf 1,5 ml mit PBS aufgefüllt und dann für 2 min bei 5000 UPM zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde komplett entfernt und das Pellet ein weiteres Mal in PBS gewaschen. Nach einer darauffolgenden Resuspension in 1 ml PBS waren die Zellen bereit für den oben beschriebenen Sedimentationsschritt.

Vorbereitung und Kalibrierung der Mikropipette

Die FluidFM-Mikropipette enthält ein Flüssigkeits-Reservoir, welches vor der Kalibrierung mit 50%igem Glycerin befüllt wurde. Die Bestimmung der Federkonstante in Luft wurde mithilfe des thermischen Rauschens der Umgebung (s. Kapitel 3.4.3 „Einzelzell-Kraftspektroskopie mit *S. aureus* auf ZVKs“) ermittelt und betrug in der Regel zwischen 0,2-0,3 N/m. Die Verbiegungssensitivität wurde, ebenfalls wie in Kapitel 3.4.3, in PBS durchgeführt und konnte mit Werten zwischen 75-80 nm/V bestimmt werden.

Funktionalisierung der Mikropipette und Kraft-Distanz-Messungen auf den Zahnschmelz-Prüfkörpern:

Die Funktionalisierung der Mikropipette zur Hefesonde erfolgte während einer Kraft-Distanz-Messung auf einer einzelnen *C. albicans*-Zelle. Dafür wurde die Mikropipette des FluidFMs zunächst auf der Glasschale in das PBS mit den sedimentierten Zellen getaucht und in einem ausreichenden Höhenabstand zu einer individuellen Zelle (~ 15 µm) platziert. Eine Kraft-Distanz-Kurve mit einer angewandten Kraft von 10 nN für eine Kontaktzeit von 5 s wurde durchgeführt. Während dieser 5 s Verweildauer wurde ein negativer Druck von 400 mbar mithilfe des FluidFM-gekoppelten Druckkontrollsystems aufgebaut, wodurch die Zelle durch die Öffnung der Mikropipette angesaugt und an dieser Stelle immobilisiert wurde. Durch die Rückfahrbewegung der Mikropipette von der Zelloberfläche wurde die Funktionalisierung erfolgreich beendet. Der Negativdruck wurde für die folgenden Kraft-Distanz-Messungen auf Zahnschmelz auf 350 mbar reduziert. Die Hefesonde wurde vor der Überfahrt vom Glasboden auf den Zahnschmelz, zur Vorsichtsmaßnahme, auf den maximalen Abstand zur Substratoberfläche zurückgezogen und dann auf den Zahnschmelz-Prüfkörper überführt. Das Adhäsionsvermögen der Hefezellen wurde für die beiden Oberflächenkontaktzeiten 0 s oder 5 s an jeweils fünf verschiedenen Positionen des Zahnschmelzes mit einem lateralen Abstand von 10 µm zwischen zwei Kraft-Distanz-Kurven bestimmt. Für die Fahrtstrecke der Hefesonde wurden jeweils 5

μm für die Annäherungs- bzw. für die Rückzucksphase mit einer Geschwindigkeit von 800 nm/s eingestellt. Die angewandte Kraft, mit der die Hefesonde auf den Zahnschmelz gedrückt wurden, wurde auf 10 nN gesetzt.

3.4.6 Auswertung von Kraft-Distanz-Kurven

Die Kraft-Distanz-Messung besteht aus einem Annäherungs- und Rückzugsvorgang des Federbalkens bzw. der zellfunktionalisierten Sonde relativ zur Substratoberfläche. Die Annäherungskurve der Kraft-Distanz-Messung ermöglicht die Auswertung der *Snap-in*-Kraft und der *Snap-in*-Distanz. In dieser Arbeit wurde die *Snap-in*-Kraft ausgewertet. Die Rückzugskurve wurde hinsichtlich mehrerer Parameter, der Adhäsionskraft, Adhäsionsenergie, und Abreißlänge analysiert (s. Abb. 7). Die Basislinien der Kurven wurde auf 0 nN korrigiert. Adhäsionskräfte und *Snap-in*-Kräfte wurden nach Messungen mit dem Bruker BioScope Catalyst (Santa Barbara, USA) in Nanoscope Analysis v.1.9 ausgewertet. Alle anderen Adhäsionskräfte sowie die Abreißlängen und Adhäsionsenergien wurden mithilfe der Software OriginPro 2019b (OriginLab, USA) bestimmt. Zur Korrektur der Basislinien von FluidFM-Daten wurde die Software SPIP (Software Image Metrology, Dänemark) genutzt.

Die Kräfteauflösung ist in Kraft-Distanz-Kurven vom jeweiligen AFM-Setup abhängig und zu niedrigen pN-Bereichen hin begrenzt. Einfluss auf die Kräfteauflösung hat die Federhärte und somit die (experimentell ermittelte) Federkonstante. Daher wurden die Werte für die *Snap-in*-Kraft und für die Adhäsionskraft, die unter bestimmten Versuchsbedingungen in der Einzelzellkraftspektroskopie Werte von 0 pN aufzeigten auf 20 pN (Punktlinie in den Abbildungen) festgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Oberflächenmaterialeigenschaften von ZVK-Typ I-III mit Relevanz für die Bakterienadhäsion

Ein Hauptfokus dieser Arbeit war es, das Adhäsionsvermögen des opportunistischen Krankheitserregers *S. aureus* auf ZVKs mithilfe der Einzelzell-Kraftspektroskopie zu bestimmen, wobei die Adhäsionsstärke von individuellen Bakterienzellen quantifiziert werden sollte. Einer der wichtigsten Faktoren, die die Adhäsionsstärke von *S. aureus* auf abiotischen Oberflächen mitbestimmt, ist die Oberflächentopografie. Eine mathematische Funktion von ihr und von entscheidender Wichtig-

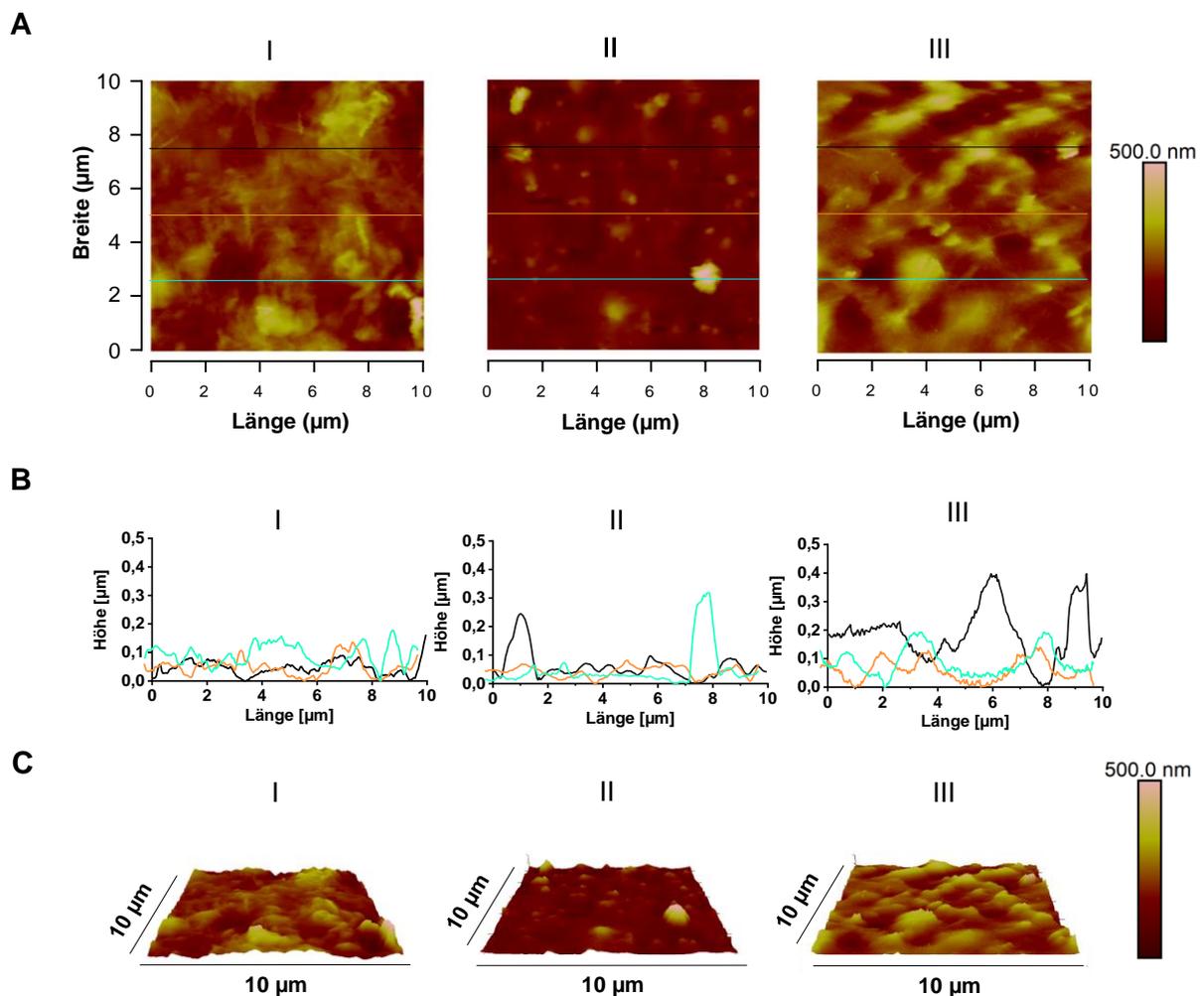


Abbildung 11: Topografien der ZVK-Typen I bis III.

Fragmente der ZVK-Typen I - III wurden auf Glasschalen mit Klebstoff fixiert und nach anschließender Beschichtung in PBS per Rasterkraftmikroskopie im PF-QNM-Modus abgebildet. (A) Höhentopografien der ZVK-Typen I – III auf einem Areal von $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ und einer Berg-Tal-

Distanz (Höhe) von 0,5 μm . (B) Höhenprofile an den Y-Positionen 2,5 μm , 5 μm und 7,5 μm werden durch horizontal eingezeichnete Linien entlang der X-Achse repräsentiert. (C) Dreidimensionale Topografie der 2D-Karten aus (A). Adaptiert nach [108].

keit für die bakterielle Adhäsion ist die Oberflächenrauigkeit, die durch hochauflösende Mikroskopiertechniken wie die Rasterkraftmikroskopie ermittelt werden kann [62]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Oberflächentopografien von drei verschiedenen, im Klinikalltag gebräuchlicher ZVK-Typen (Arrow CVC set DE-14703-S; B. Braun Certofix Trio, und Vygon Seldipur S) in den Dimensionen 10 μm x 10 μm x 0,5 μm (Länge x Breite x Höhe) mittels AFM bestimmt (s. Abb. 11). Untersuchungen der Oberflächenrauigkeit auf einem Areal von 10 μm x 10 μm hinsichtlich des quadratischen Mittelrauwertes RMS (engl. root mean square), einem häufig verwendeten Parameter zum Vergleich von Oberflächenrauigkeiten, ergaben Werte zwischen 51-58 nm, was auf eine ähnlich raue Oberfläche der drei ZVK-Typen schließen lässt (s. Tab. 11). Die AFM-basierten Topografien der abgebildeten Areale zeigten, dass die einzelnen ZVK-Typen zum Teil größere Unterschiede in der Welligkeit der Oberflächenstruktur aufwiesen. Die Oberfläche von ZVK-Typ I wies globuläre Oberflächenbestandteile auf und zeigte bei der Betrachtung des Längsquerschnitts meist einen gleichförmigen Höhenverlauf („Wellenverlauf“) mit leichten Erhebungen, den „Bergen“, und mit meist flachen „Tälern“ (s. Abb. 11 A und B, „I“). ZVK-Typ III zeigte eine ähnliche Oberflächenstruktur, jedoch mit einem sehr großen Abstand zwischen den Wellenbergen und -tälern („Wellenhöhe“; s. Abb. 11 B, „II“). Beide ZVK-Typen besaßen darüber hinaus eine ähnliche Schiefheit (engl. *skewness*), die die Verteilung der Höhendaten und ihre Symmetrie zum Mittelwert wiedergibt. Durch eine insgesamt symmetrische Verteilung der Höhendaten der ZVK-Typen I und III entstanden niedrige *skewness*-Werte, die zusätzlich positive Beträge annahmen (s. Tab. 11). Positive Zahlenwerte weisen darauf hin, dass es tendenziell mehr Erhebungen als tiefe Gruben gibt, jedoch entsprechen die Kennzahl hier bei ZVK-Typ I und III ($0,64 \pm 0,77$ bzw. $0,44 \pm 0,10$) nur einer gering erhöhten Verschiebung zugunsten der Erhebungen. Im Gegensatz dazu zeigte ZVK-Typ II zwar einen regelmäßigen und flachen Höhlenverlauf (s. Abb. 11 B, „II“), aber dafür, wegen einigen unregelmäßig auftretenden, hohen Erhebungen auf der Oberfläche (s. Abb. 11 A und C, „II“) und einer asymmetrischsten Verteilung der Höhendaten einen gesteigerten, positiven Schiefheitswert ($1,69 \pm 0,67$).

Tabelle 11: Oberflächeneigenschaften der ZVK-Typen I-III.

Dargestellt sind verschiedene Oberflächenparameter mit Mittelwerten und Standardabweichungen (Adaptiert nach [108]). Θ_a , engl. *advancing contact angle*; HBP, Humanes Blutplasma.

	Rauigkeit (RMS) in nm	Schiefheit	Kontaktwinkel Θ_a in °	Kontaktwinkel Θ_a in ° (+ HBP)
ZVK-Typ I	57,5 ± 6,9	0,64 ± 0,77	119 ± 6	55 ± 4
ZVK-Typ II	50,8 ± 7,1	1,69 ± 0,67	109 ± 1	39 ± 4
ZVK-Typ III	58,3 ± 18,3	0,44 ± 0,10	109 ± 1	51 ± 5

Ergänzend zu den AFM-basierten Daten zur Oberflächenbeschaffenheit wurde auch die Hydrophobizität der ZVK-Typen I-III bestimmt. In Kollaboration mit der Experimentalphysik der Universität des Saarlandes wurden in einem automatisierten Setup zur Bestimmung der Wasserkontaktwinkel (Θ_a , engl. *advancing contact angle*) die Hydrophobizität auf den Oberflächen der ZVK-Typen ermittelt, wobei der Rand des ZVKs mithilfe einer linearen Funktion und die Wasseroberfläche mithilfe einer Polynomfunktion beschrieben werden konnten. Die Werte für Θ_a lagen bei allen Kathetertypen in einer ähnlichen Größenordnung ($\Theta_a > 90^\circ$) mit dem größten Wert für ZVK-Typ I, gefolgt von ZVK-Typ II und III (s. Tab. 11), und geben eindeutige Hinweise auf eine hydrophobe Oberflächenstruktur der ZVKs. Da der ZVK nach Insertion ins großvenöse Blutgefäß von Patienten mit Blutplasmakomponenten beschichtet wird, wurde auch der Effekt von Humanem Blutplasma nach einer *in vitro*-Behandlung der ZVKs auf die Wasserkontaktwinkel untersucht. Hierbei zeigte sich für alle drei ZVK-Typen eine Reduzierung der Werte für den Wasserkontaktwinkel $\Theta_a < 90^\circ$, was auf eine hydrophile Oberflächeneigenschaft der ZVKs hinweist (s. Tab. 11).

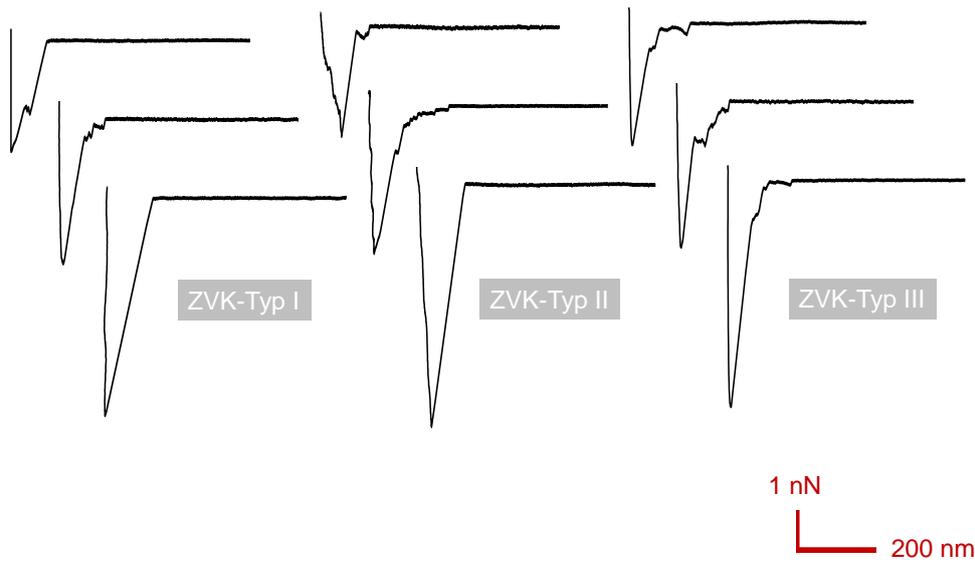
Nach dieser eingehenden Charakterisierung der ZVK-Oberflächenbeschaffenheit sollte in einem nächsten Schritt das Adhäsionsvermögen individueller *S. aureus*-Bakterienzellen auf der ZVK-Oberfläche quantifiziert werden. Zu diesem Zwecke wurden Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase, einem frühen Stadium der bakteriellen Vermehrung mit einer hohen Verdopplungsrate der Bakterien verwendet, bei dem *S. aureus* eine starke Expression verschiedener Zellwand-gebundener Adhäsine aufweist (s. Kapitel 2.2.2. „Adhäsionsfaktoren und spezifische Adhäsionsmechanismen in *S. aureus*“).

4.2 Bestimmung der Adhäsionsstärke von *S. aureus* HOM 6 und HOM 433 auf ZVK-Typ I-III

Die Adhäsionsstärke von *S. aureus* an eine Substratoberfläche lässt sich durch die Anzahl und Bindungsfähigkeit von Oberflächenadhäsinen in der Zellwand definieren [253]. Sie lässt sich in AFM-Studien gut aus der bakteriellen Adhäsionskraft und Adhäsionsenergie ablesen, und wurde etwa auf gut charakterisierten Silizium-Modelloberflächen mit definierter Rauigkeit und/oder Hydrophobizität bestimmt [253,256]. Auf einem Medizinprodukt wie dem ZVK, einem für die medizinische Versorgung von Patienten hoch relevantem Hilfsinstrument, das zugleich jedoch, insbesondere bei längerer Verweildauer im Patienten, regelmäßig durch Bakterien kontaminiert wird, wurde die Adhäsionsstärke von *S. aureus* bisher nicht bestimmt. Diese Wissenslücke sollte im Rahmen dieser Arbeit adressiert werden.

Zunächst wurden Bakteriensonden für die AFM-basierte Einzelzellkraftspektroskopie vorbereitet, wobei ein einzelnes, lebendes Bakterium an einen mit Bioklebstoff (Polydopamin) beschichteten Federbalken angebracht wurde. Als Substratoberflächen wurden kommerziell erwerbbar, im Klinikalltag gebräuchliche polyurethanbasierte ZVKs verwendet. Jede individuelle Bakteriensonde wurde für Kraft-Distanz-Messungen an zehn verschiedenen Stellen auf diesen ZVKs verwendet. Rückzugskurven aus den Kraft-Distanz-Messungen der *S. aureus*-Stämme HOM 6 und HOM 433 auf den drei ausgewählten ZVK-Typen zeigten dabei starke Adhäsionskräfte (F_{adh}) zwischen dem adhären Bakterium und der ZVK-Oberfläche im niedrigen nN-Bereich (s. Abb. 12). Die Rückzugskurven wiesen dabei überwiegend einen glatten Kurvenverlauf bis zum Erreichen eines starken Adhäsionspeaks, von F_{adh} , auf. Diesem folgten vereinzelte sägezahnförmige, kleinere Adhäsionspeaks. Der steile Anstieg der Kurve bis zum Erreichen der maximalen Adhäsionskraft markierte den Prozess, in dem eine maximale Anzahl von gebundenen bakteriellen Oberflächenadhäsinen simultan durch die Rückstellkraft des Federbalkens gestreckt wurden und einer Ablösung des Bakteriums von der ZVK-Oberfläche widerstehen konnten. Dies signalisierte eine starke Interaktion zwischen Bakterienzelle und Substratoberfläche. Sägezahnförmige Peaks repräsentieren die Streckung und Ablösung weiterer meist längerer Adhäsine.

HOM 6



HOM 433

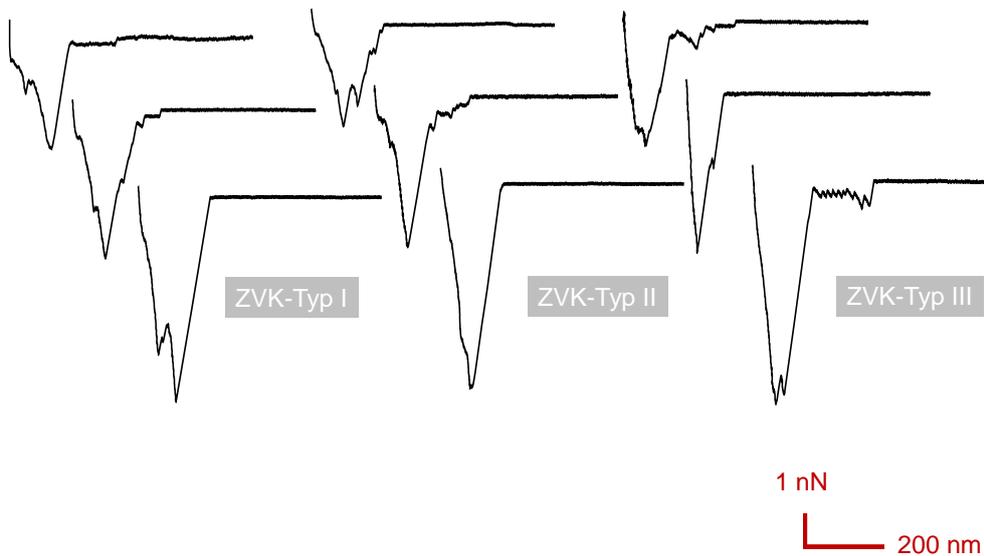


Abbildung 12: AFM-Rückzugskurven von individuellen *S. aureus*-Bakterienzellen auf den ZVK-Typen I-III.

Repräsentative Rückzugskurven aus der Einzelzellkraftspektroskopie zwischen *S. aureus*-HOM 6 bzw. HOM 433 und den ZVK-Typen I-III mit Adhäsionskräften und sägezahnförmigen Peaks. Adaptiert nach [108].

Die Rückzugskurven verdeutlichen weiter, dass für *S. aureus* auf allen ZVK-Typen zum Teil sehr unterschiedlich hohe Werte für die Adhäsionskraft quantifiziert werden konnten. Um den Einfluss der Oberflächenrauigkeit des ZVKs auf die Höhe und Variabilität der Adhäsionskräfte zu testen, wurde ein Vergleich zwischen einer Glasoberfläche aus sehr glattem, hydrophobem Borosilikat-Glas und dem ZVK-Typ II durchgeführt. Dieser zeigte, dass für individuelle Zellen des *S. aureus*-Stammes HOM 6

unterschiedlich starke Adhäsionskräfte entlang des Weges in X-Richtung, also in Längsrichtung des röhrenförmigen ZVKs festgestellt werden konnten, während die Adhäsionskräfte auf dem Borosilikat-Glas auch an verschiedenen Stellen in hohem Maße reproduzierbar waren (s. Abb. 13 A).

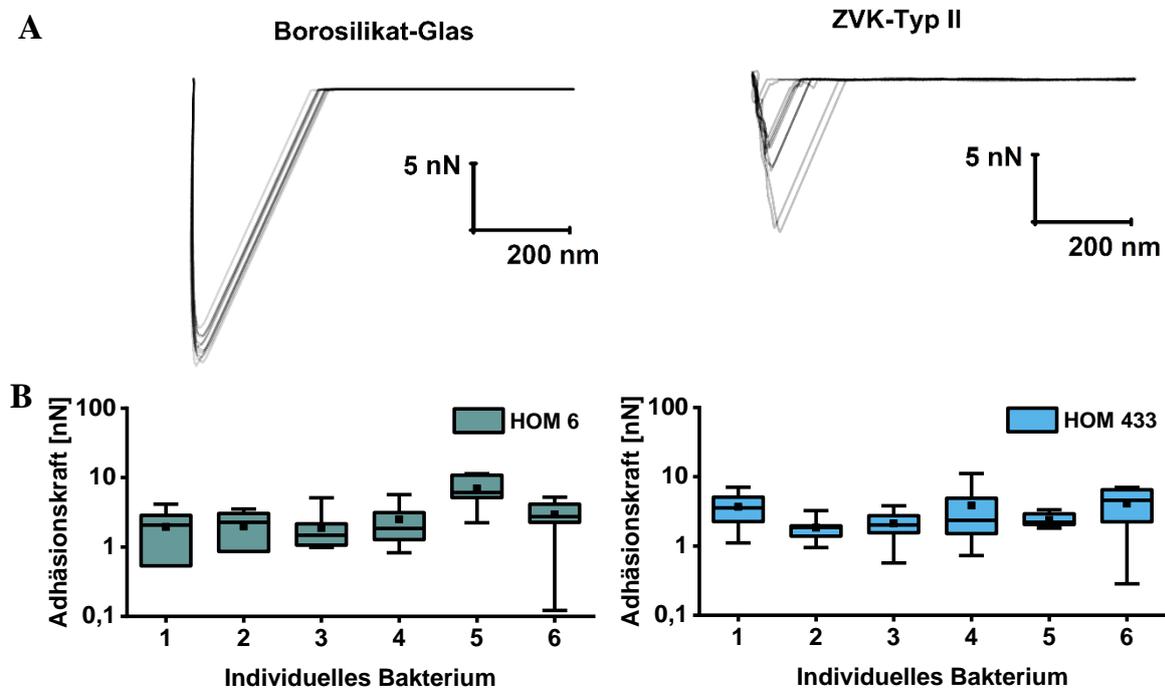


Abbildung 13: Positionsabhängige und zellindividuelle Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf ZVK-Oberflächen.

(A) Überlagerte Rückzugskurven eines repräsentativen Bakteriums von *S. aureus*-HOM 6 auf Borosilikat-Glas und auf der Oberfläche des ZVK-Typ II gemessen an jeweils zehn verschiedenen Positionen auf der jeweiligen Substratoberfläche. (B) Adhäsionskräfte individueller Bakterienzellen von HOM 6 und HOM 433 auf dem ZVK-Typ II. Boxen der Box-Plot-Diagramme enthalten jeweils 10 Daten mit Median (horizontale Linie), Mittelwert (geschlossenes Quadrat), den Interquartilabständen (25 % - 75 %) und Antennen mit 5 % und 95 % des Datenbereiches. Adaptiert nach [108].

Die positionsabhängige Variation der Maxima der Adhäsionskräfte konnte für verschiedene, individuelle Zellen von *S. aureus* HOM 6 und HOM 433 auf dem ZVK-Typ II festgestellt werden (s. Abb. 13 B). Die Größenordnung der Adhäsionskräfte lag typischerweise im Bereich zwischen 1 nN und 10 nN, wie etwa bei HOM 6, Zelle 3 mit $1,87 \pm 1,24$ nN und Zelle 5 mit $6,95 \pm 3,12$ nN bei HOM 6 oder wie bei HOM 433, Zelle 1 mit $3,67 \pm 1,95$ nN und Zelle 2 mit $1,83 \pm 0,62$ nN (s. Abb. 13 B).

Die Betrachtung der Gesamtheit der Adhäsionskräfte von HOM 6 und HOM 433 auf den drei ZVK-Typen I-III ergab, dass sich die Werte für F_{adh} meist im einstelligen nN-Bereich bewegten und sich im Durchschnitt zwischen 2 nN und 5 nN einordneten (s. Abb. 14).

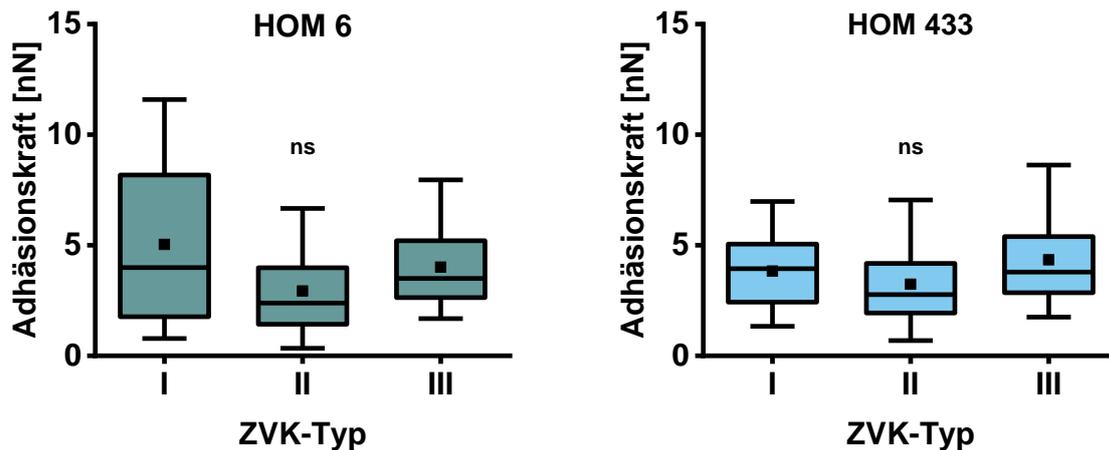


Abbildung 14: Adhäsionskräfte von *S. aureus* HOM 6 und HOM 433 auf den ZVK-Typen I-III.

Adhäsionskräfte von HOM 6 (petrolfarben) und HOM 433 (himmelblau) auf den ZVK-Typen I-III. Boxen der Box-Plot-Diagramme enthalten Datenpunkte von jeweils sechs individuellen Zellen (10 Werte pro Zelle) mit Median (horizontale Linie), Mittelwert (geschlossenes Quadrat), den Interquartilabständen (25 % - 75 %) und Antennen mit 5 % und 95 % des Datenbereiches. ns, nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test). Adaptiert nach [108].

Die getesteten Zellpopulationen von HOM 6 auf den Oberflächen der drei untersuchten ZVK-Typen zeigten ähnliche, signifikant nicht-unterscheidbare Adhäsionskräfte, was auf ein vergleichbares Adhäsionsverhalten dieses *S. aureus*-Stammes auf allen drei ZVK-Typen hindeutet, wenn auch auf ZVK-Typ II die Tendenz zu einer schwächeren Adhäsionskraft ($2,93 \pm 2,20$ nN) auszumachen war. Ähnlich wie HOM 6 zeigten auch getestete Zellpopulationen des klinischen Isolats HOM 433 auf den Oberflächen der drei ZVK-Typen dort untereinander vergleichbare Adhäsionskräfte. Dabei waren die Adhäsionskräfte auf ZVK-Typ II ($3,24 \pm 2,06$ nN) tendenziell wiederum am niedrigsten. Weiterhin wurden zwischen den beiden HOM-Stämmen keine signifikanten Unterschiede in den Adhäsionskräften detektiert, was darauf hindeutet, dass der Laborstamm HOM 6 und das klinische Isolat HOM 433 unter den gehandhabten *in vitro*-Kultivierungsbedingungen ein ähnliches Adhäsionsvermögen, basierend auf der maximalen Interaktionskraft F_{adh} , auf dem jeweiligen ZVK-Typ besaßen (s. Tab. 12).

Tabelle 12: Vergleich von Adhäsionskraft F_{adh} und Adhäsionsenergie E_{adh} zwischen HOM 6 und HOM 433.

Signifikant, $P < 0,05$; ns nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).

HOM 6 vs. HOM 433	Unterschied (F_{adh})	Unterschied (E_{adh})
ZVK-Typ I	$P = 0,58$, ns	$P = 0,61$, ns
ZVK-Typ II	$P = 0,38$, ns	$P = 0,25$, ns
ZVK-Typ III	$P = 1$, ns	$P = 0,045$, signifikant

Zur weiteren Analyse des Adhäsionsvermögens von *S. aureus* auf den ZVKs wurde zusätzlich die Adhäsionsenergie E_{adh} , mit der die benötigte Arbeit zur kompletten Separation von Bakterium und Oberfläche bezeichnet wird [270], berechnet. Obwohl die Bestimmung von F_{adh} das Adhäsionsvermögen des einzelnen Bakteriums bereits sehr gut quantifiziert, besitzt E_{adh} für das Verständnis des Ablösevorgangs des Bakteriums von der Oberfläche eine ebenfalls zentrale Bedeutung, da sie die Gesamtheit aller Interaktionen (d.h., die zwischen Bakterium und Substrat wechselwirkenden Kräfte) bei der Ablösung der bakteriellen Zelle von der ZVK-Oberfläche beschreibt [254].

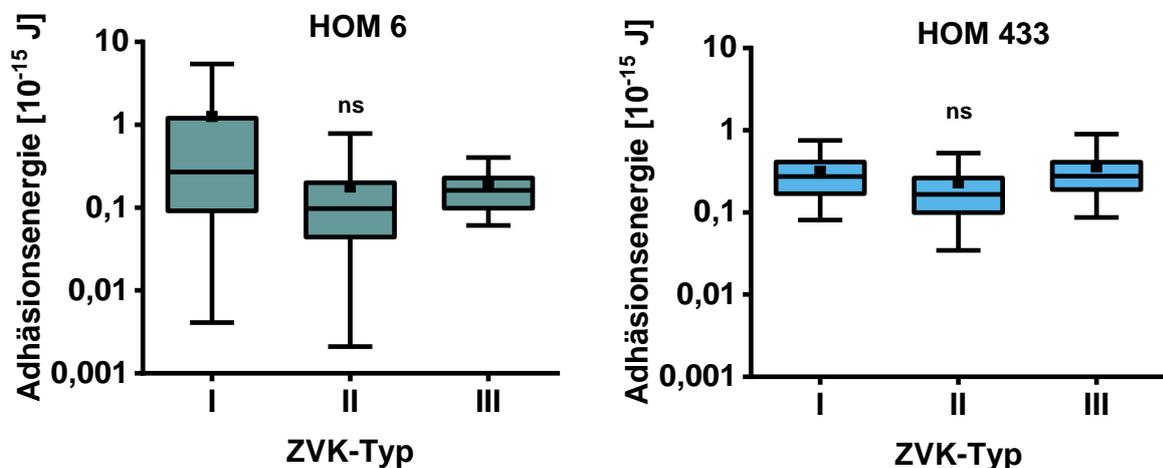


Abbildung 15: Adhäsionsenergien von *S. aureus* HOM 6 und HOM 433 auf den ZVK-Typen I bis III.

(a) Werte für die Adhäsionsarbeit E_{adh} aller untersuchten HOM 6- und HOM 433-Zellen auf den ZVK-Typen I bis III, die aus den Rückzugskurven der Kraft-Distanz-Messungen bestimmt wurden. Boxen enthalten jeweils 60 Werte von sechs individuellen Zellen (Zehn Werte pro Zelle) mit Median (horizontale Linie), Mittelwert (Geschlossenes Quadrat), Interquartilabstände (25 % - 75 %) und Antennen mit 5 % und 95 % des Datenbereiches. ns nicht signifikant (Kruskal-Wallis Test mit Dunn-Test innerhalb der HOM-Gruppe).

Die Adhäsionsenergie von individuellen bakteriellen Zellen und der ZVK-Oberfläche bewegte sich für HOM 6 und HOM 433 auf den ZVK Typen I-III in der Regel zwischen 0,1-1 fJ (s. Abb. 15) und war in der Größenordnung für Adhäsionsenergien, die mit *S. aureus*-Zellen auf anderen Substratoberflächen berechnet wurden [253]. Für HOM 6 ergaben sich durchschnittliche Werte von $1,26 \pm 1,82$ fJ auf ZVK-Typ I, $0,18 \pm 0,24$ fJ auf ZVK-Typ II und $0,18 \pm 0,11$ fJ auf ZVK-Typ III. Ähnlich dazu zeigten auch individuelle Bakterien von HOM 433 vergleichbare Adhäsionsenergien auf den Oberflächen der einzelnen ZVK-Typen. Dabei ergaben sich für HOM 433 durchschnittliche Werte für E_{adh} in Höhe von $0,32 \pm 1,96$ fJ auf ZVK-Typ I, $0,24 \pm 0,26$ fJ auf ZVK-Typ II und $0,36 \pm 0,26$ fJ auf ZVK-Typ III. Interessanterweise zeigte sich beim Vergleich der Adhäsionsenergien von HOM 6 und HOM 433 ein signifikanter Unterschied auf ZVK-Typ III (s. Tab. 12), ein potenziell wichtiges Detail bei der Beurteilung der Adhäsionsstärke bei diesen, ansonsten mit nN-Adhäsionskräften, ähnlich stark adhärenen HOM-Stämmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide untersuchten *S. aureus*-Stämme ein deutliches Adhäsionsvermögen auf Polyurethan-basierten ZVK-Oberflächen aufwiesen, welches anhand ihrer Adhäsionskraft und Adhäsionsenergie mit individuellen Bakterienzellen quantifiziert werden konnte. Ebenso konnte im Rahmen dieser Untersuchungen ein zellindividuelles sowie positionsabhängiges Adhäsionsvermögen auf dem ZVK verdeutlicht werden. Die stets hohen Adhäsionskräfte in allen Kraft-Distanz-Kurven lassen eine allgemein starke Adhäsion von *S. aureus* auf den ZVK-Typen ableiten.

4.3 Bakterielle *Snap-in*-Kräfte auf ZVKs und der Einfluss von humanem Blutplasma (HBP)

Ein wichtiger Parameter bei der Kontaktentstehung des Bakteriums zur ZVK-Oberfläche ist das *Snap-in*-Event (engl. *Snap-in* für „In-Kontakt-Schnappen“). Dabei handelt es sich um eine Unregelmäßigkeit bzw. Diskontinuität in der Annäherungsphase der Kraft-Distanz-Kurve. Diese Diskontinuität entsteht durch die Verbiegung des Federbalkens, wenn das Bakterium, vor Beendigung der Annäherungsphase, nahezu spontan mit seinen Zellwand-Makromolekülen an die ZVK-Oberfläche bindet. Während die zuvor beschriebenen Adhäsionsparameter den Ablösevorgang des Bakteriums von der Oberfläche beschreiben, analysiert man mit dem *Snap-in*-Event den bakteriellen Anhaftungsmechanismus an die Oberfläche. Bei diesem Event lässt sich die Höhe der maximalen *Snap-in*-Kraft, F_{Snap} , zwischen Bakterium und ZVK quantifizieren.

F_{Snap} -Werte aus den Annäherungsphasen der Kraft-Distanz-Kurven auf den Oberflächen von ZVK-Typen I-III zeigten für HOM 6 F_{Snap} -Werte in Höhe von $502,40 \pm 359$ pN, $166,67 \pm 199$ pN und $913,43 \pm 362$ pN auf den ZVK-Typen I, II bzw. III. Für HOM 433 lagen die Werte bei $337,17 \pm 216$ pN, $129,99$

± 67 pN und $209,05 \pm 153$ pN (s. Abb. 16). Die *Snap-in*-Kräfte traten somit auf allen getesteten Polyurethan-ZVK-Oberflächen im mittleren dreistelligen pN-Bereich auf. Dies lässt darauf schließen, dass beide HOM-Stämme dazu in der Lage sind, Kontaktpunkte zur ZVK-Oberfläche herzustellen, bevor der Zellkörper der Bakterienzelle, durch die eigentliche Beendigung der Annäherungsphase, mit der Substratoberfläche in Kontakt gebracht wurde. Niedrige *Snap-in*-Kräfte für beide HOM-Stämme auf ZVK-Typ II waren dabei für HOM 6 signifikant kleiner als auf ZVK-Typ III und für HOM 433 signifikant kleiner als auf ZVK-Typ I. Die hohen F_{Snap} -Werte für HOM 6 auf ZVK-Typ III standen im Vergleich auch zu ZVK-Typ I in einem Kontrast, da auf diesen beiden ZVK-Typen für HOM 6 gleichartige Adhäsionskräfte beobachtet wurden, was darauf hindeutet, dass das Bakterium während des Annäherungsprozesses und während des Ablösevorgangs unterschiedliche Affinitäten zur ZVK-Oberfläche besitzt.

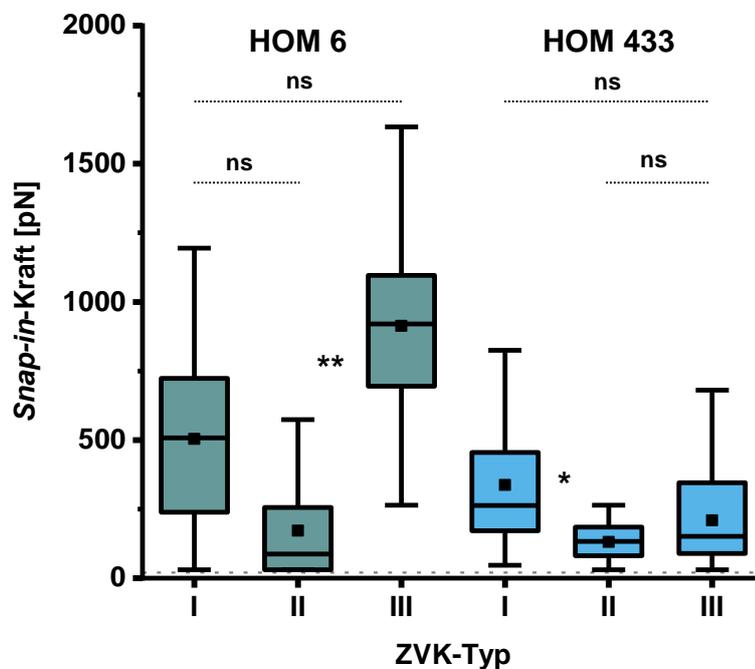


Abbildung 16: Snap-in-Kräfte von *S. aureus* HOM 6 und HOM 433 auf den Oberflächen von ZVK-Typ I-III.

Die Annäherungsphasen von Kraft-Distanz-Kurven von HOM 6- und HOM 433-Zellen auf den ZVK-Typen I bis III wurde hinsichtlich der *Snap-in*-Kraft analysiert. Boxen der Box-Plot-Diagramme enthalten jeweils Kraftwerte von sechs Bakterien mit jeweils 10 Daten pro individueller Bakterienzelle, und jeweils den Median (horizontale Linie), Mittelwert (geschlossene Box) und Interquartilabstände (25% - 75%) und Antennen mit 5% und 95% des Datenbereiches. ns, nicht signifikant; signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test).

Vor dem Hintergrund, dass in der medizinischen Anwendung Implantate wie ZVKs nach Insertion in eine großvenöse Blutbahn binnen Sekunden mit Plasmaproteinen beschichtet werden [17], wurde der

Einfluss von humanem Blutplasma auf das *Snap-in*-Event zwischen Bakterium und der ZVK-Oberfläche untersucht. Bereits früher konnte schon gezeigt werden, dass adsorbierte Blutplasmaproteine auf Substratoberflächen zu einem veränderten Anhaftungsvermögen von *S. aureus* auf Polyurethan-Substraten führen [70]. Für die hier durchgeführten AFM-Experimente wurden die ZVK-Oberflächen daher in humanem Blutplasma (HBP) behandelt, als Kontrolle diente PBS (pH 7,4). Die ermittelten Werte für F_{Snap} auf den PBS-vorbehandelten ZVK-Fragmenten lagen für HOM 6 bei 885 ± 338 pN, 356 ± 238 pN und 450 ± 237 pN auf den ZVK-Typen I, II und III (s. Abb. 17 mittlere Spalte). Auffälligkeiten gab es in der Häufigkeitsverteilung der Werte für F_{Snap} . So zeigten die F_{Snap} -Daten auf ZVK-Typ I die geringste Abweichung vom Mittelwert, wohingegen bei ZVK-Typ II Häufungen der F_{Snap} -Werte entweder bei 20-200 pN oder bei 500-700 pN vorlagen. Ein direkter Vergleich zu den F_{Snap} -Werten auf unbehandelten ZVK-Oberflächen aus Abb. 16 ergab Folgendes: So konnten, einerseits, auf den ZVK-Typen I und II Steigerungen der F_{Snap} -Werte nach einer Behandlung der ZVK-Oberfläche mit PBS beobachtet werden, und andererseits eine Verringerung dieser Werte für ZVK-Typ III (vgl. Abb. 17 linke Spalte). Im deutlichen Kontrast zu den Beobachtungen auf den PBS-behandelten und unbehandelten ZVKs standen die ermittelten Kräftewerte auf den HBP-behandelten ZVKs. Hierbei wurden in den Kraft-Distanz-Kurven nur selten *Snap-in*-Events beobachtet. Da das hier verwendete AFM-Setup keine Kräfte-Werte unterhalb von 20 pN aufzeigen konnte und somit eine begrenzte Auflösegenauigkeit besitzt, wurden sämtliche Nullwerte in der Annäherungskurve, die einem Fehlen des *Snap-in*-Events entsprechen, auf 20 pN gesetzt. Die auf diese Weise angepassten Werte für F_{Snap} lagen für die ZVK-Typen I, II, und III bei 23 ± 12 pN, 21 ± 5 pN bzw. 20 ± 2 pN. Insgesamt lagen die Werte für F_{Snap} eng beieinander und verteilten sich auf unter 100 pN (s. Abb. 17 rechte Spalte).

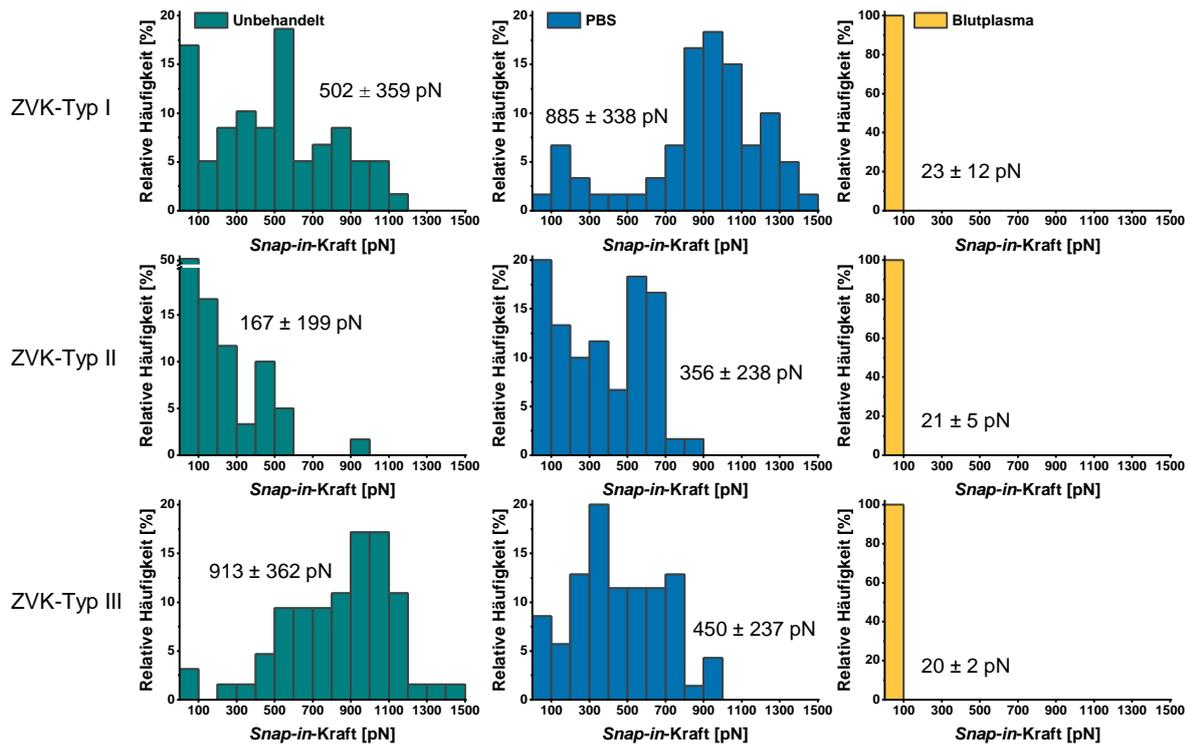


Abbildung 17: Einfluss von ZVK-adsorbierten Blutplasmakomponenten auf die Snap-in-Kraft von *S. aureus*.

Die Snap-in-Kräfte von *S. aureus* HOM 6 wurden nach 30 min Behandlung in PBS (mittlere Spalte) und HBP (rechte Spalte) auf den ZVK-Typen I bis III untersucht. Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten der Snap-in-Kräfte aus jeweils 60-70 Kraft-Distanz-Kurven, darunter auch Werte auf unbehandelten ZVK-Typen (linke Spalte, vgl. Abb. 16). Die Einteilung der Snap-in-Kräfte im jeweiligen Histogramm erfolgte in Klassen (engl. bins) mit einer Klassengröße von 100 pN. Für die Berechnung der mittleren Snap-in-Kräfte (s. Einfügungen) wurden die Werte unterhalb der Detektionsgrenze des verwendeten AFM-Setups auf 20 pN gesetzt.

4.4 Untersuchung des Einflusses von HBP auf die Oberflächentopografie und adhäsiven Eigenschaften von ZVKs am Beispiel von ZVK-Typ II

Um den Einfluss von humanem Blutplasma (HBP) auf die Adhäsionsstärke von *S. aureus* auf ZVK-Oberflächen zu untersuchen, ist es wichtig, zunächst den Einfluss der adsorbierten Blutplasmakomponenten auf die Oberflächentopografie und die adhäsiven Eigenschaften der ZVKs zu charakterisieren. Dies wurde am Beispiel von ZVK-Typ II durchgeführt, wobei als Messsonde ein herkömmlicher Federbalken mit Messspitze verwendet wurde. Als Negativkontrolle zur Biokonditionierung mit HBP dienten ZVK-Fragmente, die in PBS behandelt wurden.

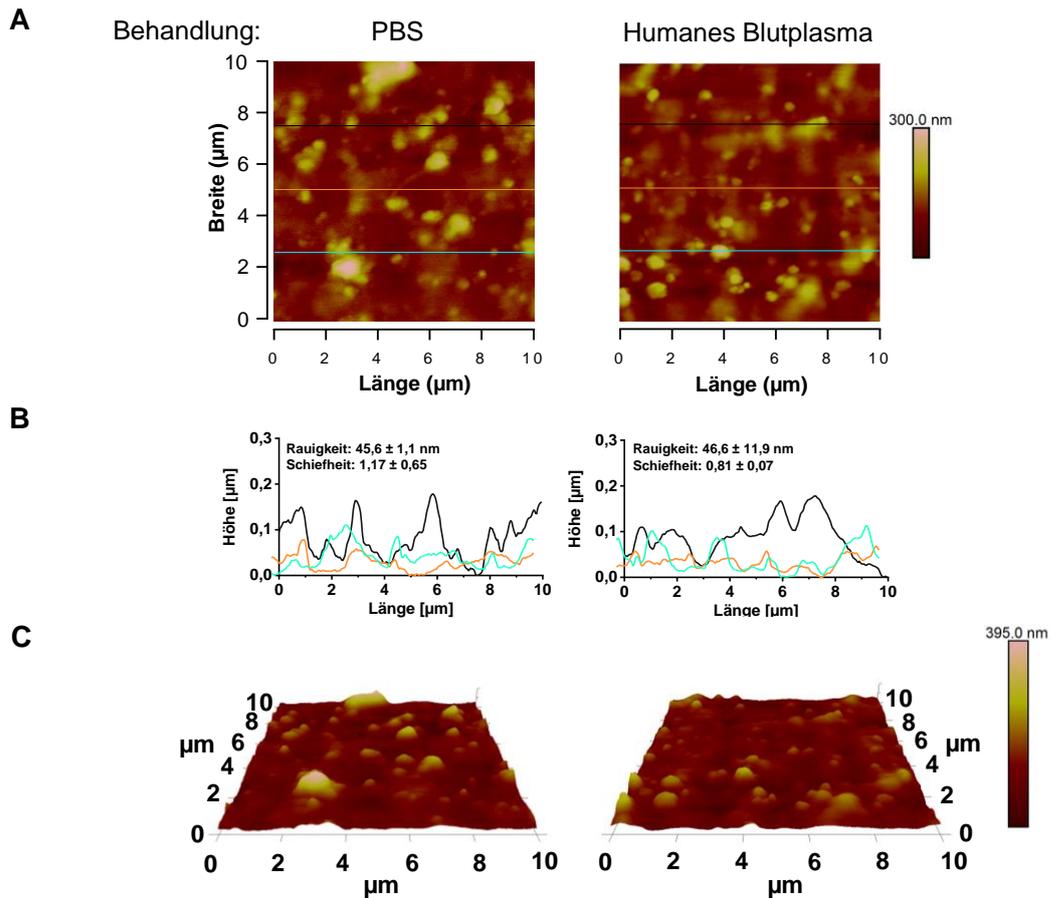


Abbildung 18: Der Einfluss von adsorbierten Blutplasmakomponenten auf die Topografie der ZVK-Oberfläche.

Die ZVK-Oberfläche wurde im PF-QNM-Modus, nach Behandlung des ZVK Typ II in PBS (I) oder in humanem Blutplasma (II), in Flüssigkeit (PBS) abgebildet. Dargestellt sind (a) 2D- und (c) 3D- Topografien auf einem Areal von $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, und (b) der Höhenverlauf entlang der X-Achse an ausgewählten Y-Positionen aus (a). (b) Werte für die RMS-Rauigkeit und Schiefheit mit Mittelwert und Standardabweichung aus drei Versuchsreplikaten sind angegeben.

Die Behandlung des ZVKs mit PBS führte auf der ZVK-Oberfläche zu zahlreichen rundlichen Erhebungen (s. Abb. 18 A und C, links), die ohne eine Behandlung der ZVK-Oberfläche im Vorfeld der AFM-Messungen in Flüssigkeit nur vereinzelt in der Topografie ausgemacht wurden (vgl. Abb. 11). Auch auf der Blutplasma-behandelten ZVK-Oberfläche konnten diese Strukturen vermehrt ausfindig gemacht werden (s. Abb. 18 A und C, rechts). Wurden verschiedene Höhensektionen auf den abgebildeten ZVK-Oberflächen betrachtet, so erkannte man nach PBS-Behandlung meist einen wellenförmigen Verlauf mit sich wiederholenden Wellenbergen und -tälern in der Oberfläche (s. Abb. 18 B, links). Dieser wellenförmige Verlauf war auch auf dem HBP-behandelten ZVK zu erkennen, jedoch mit häufigen weichen Übergängen zwischen zwei Wellenbergen (s. Abb. 18 B, rechts). Die RMS-Werte der ZVK-Oberflächen von ZVK-Typ II betragen nach PBS-Behandlung $45,6 \pm 1,1$ nm, und nach HBP-Behandlung $46,6 \pm 11,9$ nm und waren somit untereinander und zum RMS-Wert auf dem

gleichen ZVK-Typ ohne Behandlung ($50,8 \pm 7,1$ nm; vgl. Tab. 11) vergleichbar, was auf eine vergleichbare Oberflächenrauigkeit zwischen den Konditionen schließen lässt. Die Werte für die Schiefheit hingegen waren mit $1,17 \pm 0,65$ (PBS-Behandlung) und $0,81 \pm 0,07$ (HBP-Behandlung) zwar zueinander vergleichsweise ähnlich, wiesen aber im Vergleich zu den Schiefheitswerten der unbehandelten Oberflächen für diesen ZVK-Typ ($1,69 \pm 0,67$), insbesondere für die HBP-behandelte Oberfläche, deutlich kleinere Werte auf. Die geringe Schiefheit auf den behandelten ZVK-Fragmenten lässt sich vermutlich auf ihre gleichmäßigeren Oberflächen mit einer breit verteilten Anzahl an Oberflächenerhebungen zurückführen, die auf dem nicht-behandelten ZVK-Fragmenten noch als Ausreißer in die Höhendaten eingingen.

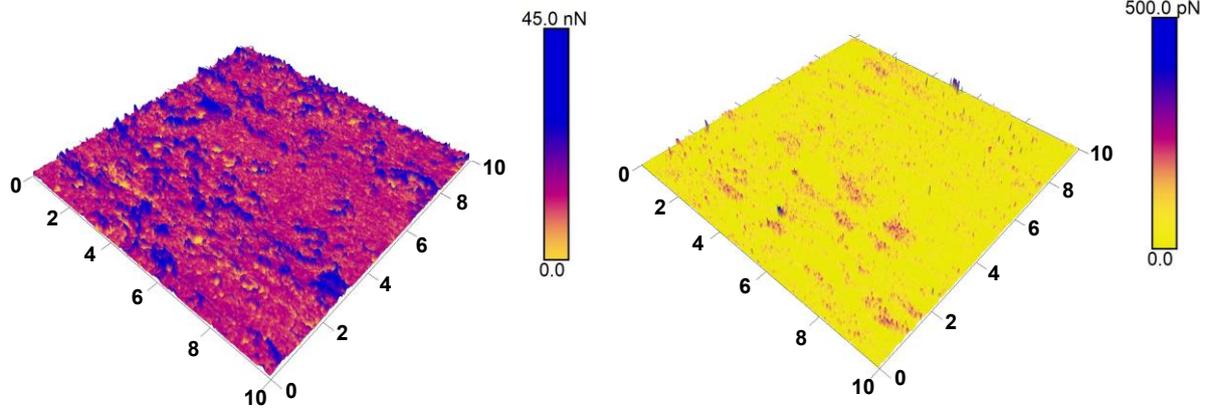
Der hier verwendete PF-QNM-Modus erlaubt es neben der Oberflächentopografie simultan auch adhäsive Eigenschaften der Katheteroberfläche zu bestimmen und als Karte der lokalen Adhäsionskräfte zwischen der Oberfläche und der AFM-Messspitze darzustellen. Auf PBS-behandelten Fragmenten des ZVK-Typ II konnten starke Adhäsionskräfte im erhöhten nN-Bereich auf dem nahezu gesamten untersuchten Areal beobachtet werden, dabei gab es lokale Stellen mit größeren Maxima für die Adhäsionskräfte als auf dem übrigen Areal (s. Abb. 19 A, links). Es konnten mittlere Adhäsionskräfte in Höhe von $13,42 \pm 5,83$ nN, $12,65 \pm 5,66$ nN und $11,29 \pm 4,98$ nN auf drei verschiedenen Arealen des ZVKs bestimmt werden, was auf eine starke Interaktion zwischen der Messspitze und der PBS-behandelten ZVK-Oberfläche hindeutet (s. Abb. 19 B, oben).

Die Beschichtung der ZVK-Oberfläche mit HBP hingegen bewirkte einen starken Rückgang der Adhäsionskräfte zwischen der Messspitze und der Substratoberfläche. Die Adhäsionskräfte waren auf dem gesamten Areal stark vermindert und stark adhärenz Regionen oder Punkte, die auf dem nicht-biokonditioniertem ZVK beobachtbar waren, konnten hier nicht nachgewiesen werden bzw. waren auf Werte < 500 pN beschränkt (s. Abb. 19 A, rechts). Die Werte für F_{adh} lagen hier entweder im Bereich des messtechnischen Hintergrundrauschens oder andernfalls im zweistelligen bis gering-dreistelligen pN-Bereich (s. Abb. 19 B, unten). Die durchschnittlichen Adhäsionskräfte auf drei verschiedenen Arealen dieses HBP-beschichteten ZVK-Typs lagen bei $0,06 \pm 0,27$ nN, $0,07 \pm 0,08$ nN und $0,07 \pm 0,05$ nN.

A

ZVK-Typ II

ZVK-Typ II + Humanes
Blutplasma



B

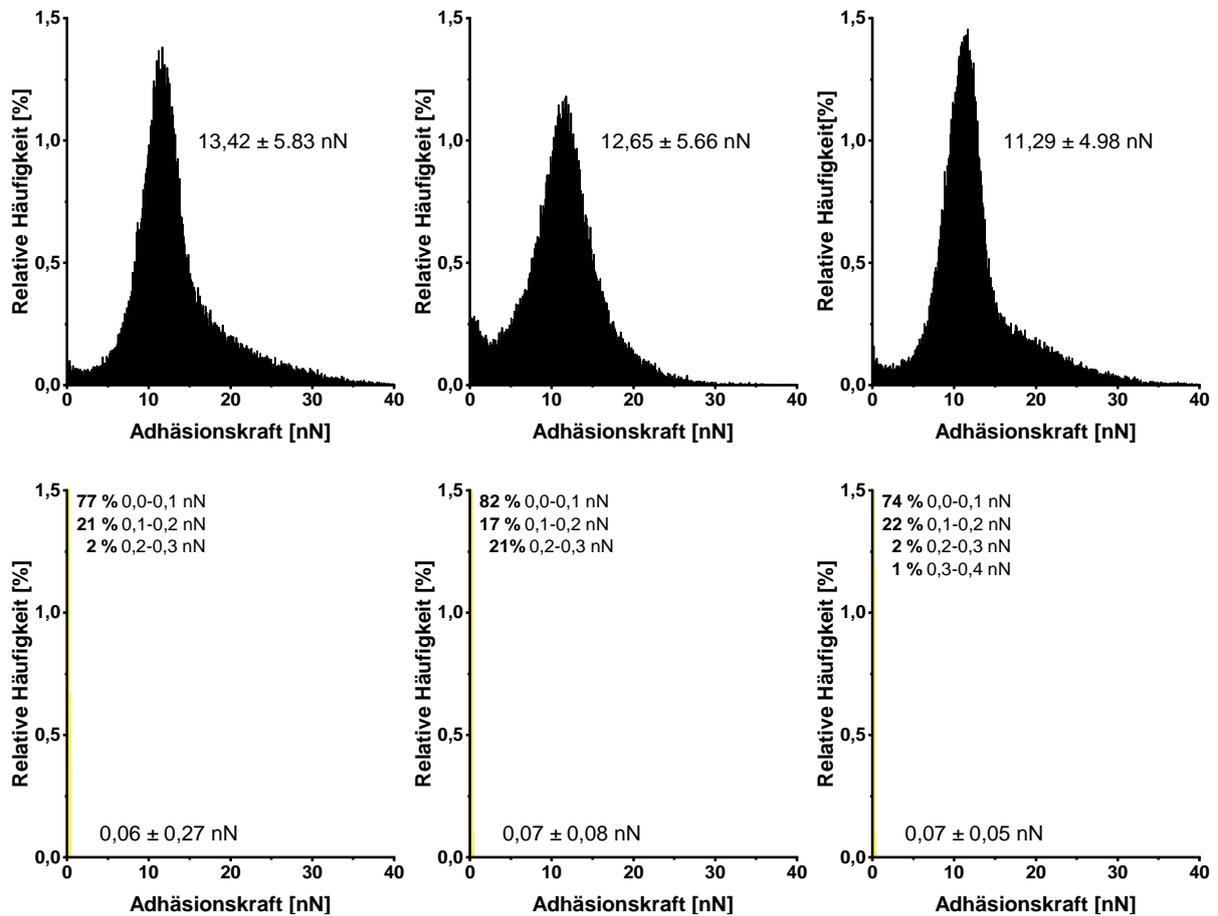


Abbildung 19: Adhäsionskräfte zwischen AFM-Messspitze und ZVK-Oberfläche ohne oder mit adsorbierten Blutplasmakomponenten.

(A) Adhäsionskarten der ZVK-Oberfläche von ZVK-Typ II wurden im PF-QNM-Modus nach Behandlung in PBS (links) oder HBP (rechts) mit einer Polykarbonat-Messspitze erstellt. Aufnahme erfolgte jeweils auf einem ZVK-Areal 10 μm x 10 μm in PBS. (B) Relative Häufigkeit der Adhäsionskräfte auf drei verschiedenen Arealen des ZVK-Typ II nach einer Behandlung in PBS

(schwarz) oder HBP (gelb). Die Einteilung der Adhäsionskräfte aus jeweils 65.536 Kraft-Distanz-Kurven pro Histogramm erfolgte in Klassen mit einer Klassengröße von 100 pN.

4.5 Untersuchung des Einflusses von HBP auf die Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf ZVKs

Um den Einfluss der Blutplasma-Beschichtung auf behandelten ZVK-Oberflächen hinsichtlich der Adhäsionskraft von *S. aureus* zu ermitteln, wurden in einem ersten Schritt die F_{adh} -Werte individueller Bakterien auf PBS- oder HBP-behandelten ZVK-Fragmenten quantifiziert. In einem zweiten Schritt wurden Bakterienzellen mit HBP behandelt, um die Adhäsionskraft ebenfalls unter dieser physiologisch vermutlich hoch relevanten Kondition zu bestimmen. Es wurden für unbehandelte Bakterienzellen des Stammes HOM 6 F_{adh} -Werte in Höhe von $5,41 \pm 2,54$ nN, $4,48 \pm 3,94$ nN bzw. $2,37 \pm 1,81$ nN auf den ZVK-Typen I, II und III bestimmt (s. Abb. 20 A, blaue Boxen). Eine Beschichtung der ZVK-Oberfläche mit HBP resultierte darin, dass die F_{adh} -Werte für HOM 6 auf allen ZVK-Modellen stark reduziert wurden (s. Abb. 20 A, orangene Boxen). Die Beträge für HOM 6 lagen nun bei $0,71 \pm 0,93$ nN, $0,10 \pm 0,83$ nN bzw. $0,42 \pm 0,77$ nN auf den ZVK-Typen I, II bzw. III. Dabei waren die bakteriellen Adhäsionskräfte auf HBP-behandeltem ZVK-Typ II signifikant kleiner als auf ZVK-Typ I. Dies steht interessanterweise im Einklang mit den tendenziell reduzierten, bakteriellen Adhäsionskräften auf unbehandelten Oberflächen von ZVK-Typ II im Vergleich zu Typ I (vgl. Abb. 14). Um den adhäsionsreduzierenden Effekt von HBP auf *S. aureus* auch mit einem klinischen ZVK-Isolat zu demonstrieren, wurden die Adhäsionskräfte von HOM 433 auf ZVK-Typ III bestimmt. HOM 433-Zellen zeigten dabei auf PBS-behandeltem ZVK-Oberflächen eine durchschnittliche Adhäsionskraft in Höhe von $1,20 \pm 0,99$ nN und nach HBP-Behandlung eine durchschnittliche Adhäsionskraft in Höhe von $0,10 \pm 0,20$ nN (s. Abb. 20 B). Insgesamt kam es damit bei HOM 6 zu einer 7,6-fachen (für ZVK-Typ I), 45-fachen (für ZVK-Typ II) und 5,6-fachen (für ZVK-Typ III) Abnahme der durchschnittlichen Adhäsionskraft auf den HBP-behandelten ZVK-Oberflächen, sowie eine 12-fache Abnahme für HOM 433 auf ZVK-Typ III.

Als nächstes wurde die Bakteriensonde mit HBP behandelt und Kraft-Distanz-Messungen auf HBP-beschichteten ZVK-Oberflächen durchgeführt. Dies sollte die bakterielle Adhäsion in einem potenziell hämatogenen Infektionsweg nachbilden, da bei dieser Interaktion zwischen Bakterium und ZVK-Oberfläche (im Blutgefäß des Patienten) beide Seiten mit Blutplasmakomponenten in Kontakt kommen. Unter dieser Kondition wurden für die individuelle, HBP-behandelte *S. aureus*-Bakterienzellen sehr geringe Adhäsionskräfte (40 ± 39 pN) auf HBP-beschichteter Substratoberfläche von ZVK-Typ III ermittelt, wohin im Vergleich unbehandelte Bakterienzellen auf dieser Substratoberfläche stärker (304 ± 287 pN) binden konnten (s. Abb. 20 C).

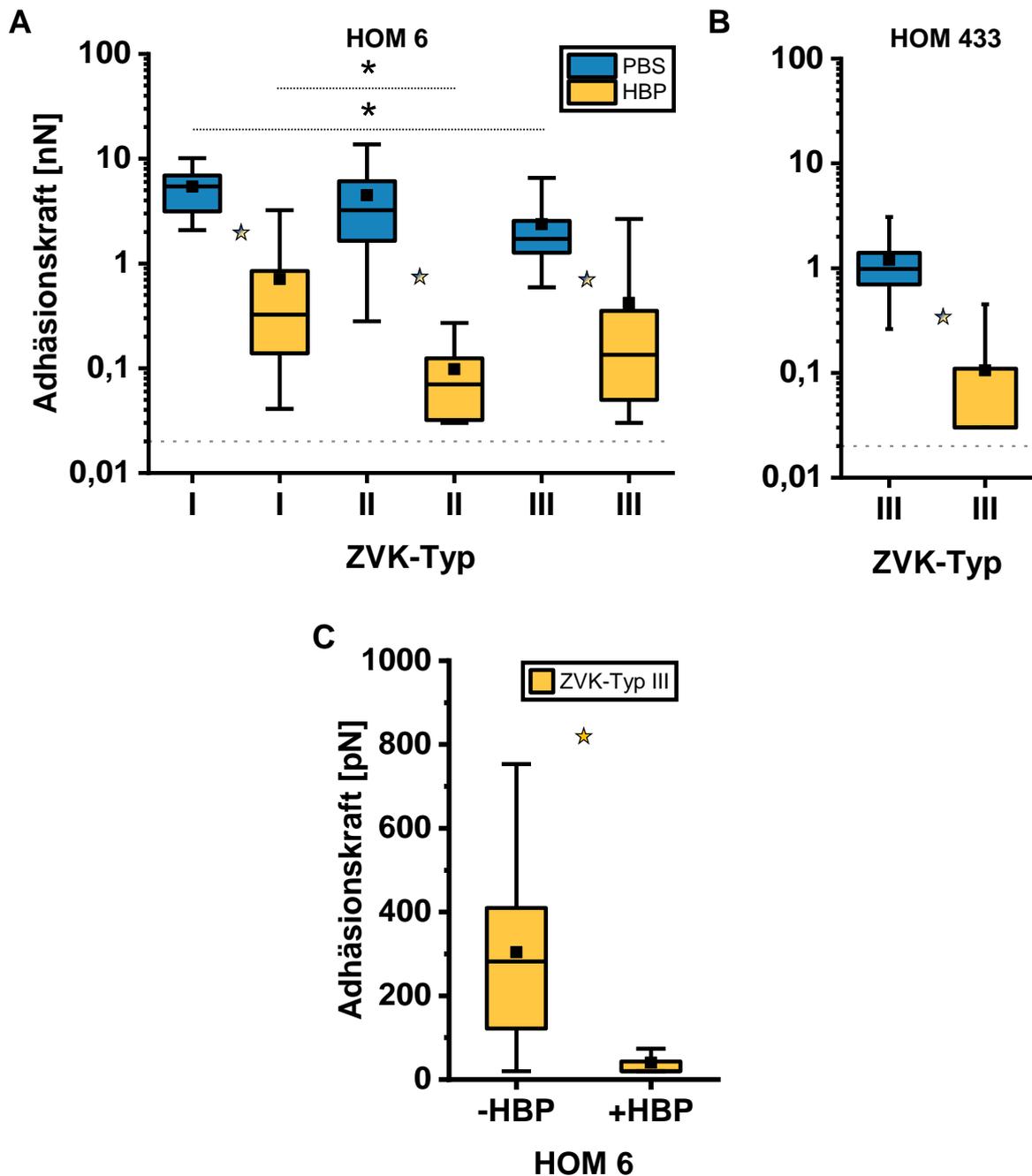


Abbildung 20: Einfluss von humanen Blutplasmakomponenten auf die Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf ZVK-Oberflächen.

Die Oberflächen der ZVK-Typen I-III wurden für 30 min mit PBS (blau) oder in HBP (orange) behandelt. Adhäsionskräfte wurden mit (A) HOM 6- und (B) HOM 433-Bakterienzellen bestimmt. (C) HOM 6-Bakteriensonden wurden für 30 min in HBP behandelt oder unbehandelt und die Adhäsionskräfte auf HBP-behandelten ZVK-Oberflächen bestimmt. Boxen der Box-Plot-Diagramme bestehen aus jeweils 40-60 Daten aus vier bis sechs Zellen, und enthalten jeweils den Median (horizontale Linie), den Mittelwert (geschlossene Quadrate), den Interquartilsabständen (25 % - 75 %) und Antennen mit 5 % und 95 % des Datenbereiches. Punktlinie stellt die Detektionsgrenze des verwendeten AFM-Setups dar. ns nicht signifikant; * $P < 0,05$ (Mann-Whitney U-Test (farblichgekennzeichnete Sternchen) und Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test (schwarze Sternchen). Adaptiert nach [108].

4.6 Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf explantierten, nicht-infektiösen ZVKs

Die gute Durchführbarkeit von AFM-Kraft-Distanz-Messungen auf ZVKs und auf HBP-behandelten ZVKs sollte als Basis dafür dienen, die bakteriellen Adhäsionskräfte im nächsten Schritt auf explantierten, nicht-infektiösen ZVKs zu quantifizieren. Diese Art der Biokonditionierung erlaubt es, die bakterielle Adhäsion auf einer physiologisch hoch-relevanten Grenzfläche zu untersuchen. Dafür wurden explantierte ZVKs derselben Modelle wie die oben beschriebenen ZVK-Typen I und II getestet. Die Adhäsionskräfte auf ZVK-Typ I erreichten Beträge in Höhe von 229 ± 639 pN für HOM 6 und 300 ± 720 pN für HOM 433, und auf ZVK-Typ II in Höhe von 527 ± 952 pN für HOM 6 und 313 ± 658 pN für HOM 433 (s. Abb. 21 A). Dabei waren die Adhäsionskräfte auf beiden ZVK-Typen im vergleichbaren Größenbereich, wobei HOM 6 tendenziell stärker an ZVK-Typ II binden konnte als an ZVK-Typ I. Stammspezifische Unterschiede zwischen HOM 6 und HOM 433 konnten insgesamt nicht beobachtet werden und somit war das Adhäsionsvermögen des Laborstamms mit dem des klinischen HOM 433 an die *ex situ*-ZVK-Oberfläche vergleichbar.

Wurden die Mittelwerte mit den Medianen der bakteriellen Adhäsionskräfte auf den explantierten ZVKs verglichen, so erkannte man ihre starke Abweichung voneinander (s. Abb. 21 A). Dies stand im Einklang mit der Beobachtung, dass vereinzelt starke Adhäsionskräfte auf bestimmten Arealen beider ZVK-Typen bestimmt wurden, welche einen starken Einfluss auf die mittlere Adhäsionskraft ausübten. Rückzugskurven enthüllten häufig nahezu fehlende Interaktionsevent mit geringen Adhäsionskräften (s. Abb. 21 B, links) und vereinzelt spezifischere Interaktionen zwischen Bakterium und explantiertem ZVK (s. Abb. 21 B, rechts).

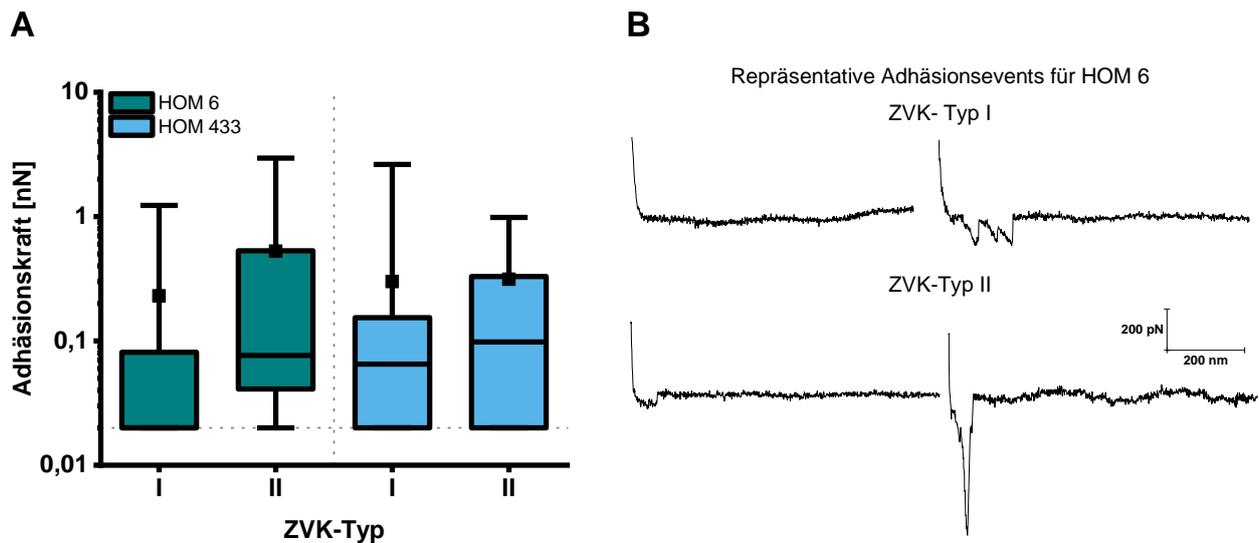


Abbildung 21: Die Adhäsionskräfte von *S. aureus* HOM 6 und HOM 433 auf explantierten ZVKs.

Explantierte ZVKs von ZVK-Typ I und II wurden von Patienten erhalten, denen die ZVKs aufgrund nicht-infektiöser Ereignisse entfernt werden mussten. Teilstücke dieser ZVKs wurden in einer Glaspetrischale befestigt und für die Kraft-Distanz-Messungen mit einem Tropfen PBS überschichtet. Die ZVK-Fragmente wurden anschließend mit *S. aureus*-Messsonden in Hinblick auf (A) die Adhäsionskräfte getestet. (B) Repräsentative Rückzugskurven. Boxen der Box-Plot-Diagramme bestehen aus jeweils 50 Datenwerten von fünf Zellen mit 10 Datenwerten pro Zelle, und enthalten den Median (horizontale Linie), den Mittelwert (geschlossenes Quadrat), den Interquartilabständen (25 % - 75 %) und Antennen mit 5 % und 95 % des Datenbereiches. Horizontale Punktlinie kennzeichnet die Detektionsgrenze des verwendeten AFM-Systems. Teilabbildung A adaptiert nach [108].

4.7 Humanes Serumalbumin und Fibrinogen und ihre Einflüsse auf die Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf ZVKs

Zwei wichtige Komponenten des Blutplasmas sind Humanes Serumalbumin (HSA), das mit Abstand häufigste Protein im Blutplasma, sowie humanes Fibrinogen (HFg), ein wesentlicher Bestandteil der Blutgerinnung sowie ein wichtiger Ankerpunkt (Ligand) für *S. aureus* bei der Adhäsion an humane Wirtsstrukturen wie etwa auf den Oberflächen von Endothelzellen [52,195]. Beide Proteine wurden hinsichtlich der Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf ZVK-Substraten untersucht, nachdem diese mit den entsprechenden Proteinen *in vitro* behandelt worden waren. Dabei wurden Katheterfragmente von ZVK-Typ II und verschiedene Konzentrationen von HSA (0,4 mg/ml, 4 mg/ml, 40 mg/ml) oder HFg (0,4 mg/ml) für diese Untersuchungen ausgewählt (s. Abb. 22 A und B). Eine Behandlung mit jeweils beiden Blutplasmabestandteilen führte zu einer klaren Reduktion der Adhäsionskräfte von HOM 6. So induzierte eine Behandlung von ZVK-Typ II mit 40 mg/ml HSA eine Reduzierung der Werte für F_{adh} von 4478 ± 3943 pN bei PBS auf 134 ± 356 pN, was einen Faktor-Unterschied von 33,4 entspricht (s.

Abb. 22 A). Interessanterweise konnten für HOM 6 ähnlich geringe F_{adh} -Werte bei niedrigeren HSA-Konzentrationen quantifiziert werden (173 ± 594 pN für 4 mg/ml HSA und 127 ± 424 pN für 0,4 mg/ml HSA), was darauf schließen lässt, dass diese Konzentrationen von HSA bereits ausreichen, um die adhäsiven Eigenschaften der Substratoberfläche zu verändern und dadurch hohe Adhäsionskräfte auf ZVK-Typ II signifikant zu reduzieren. Eine ebenfalls signifikante, aber nicht ganz so starke Minimierung von F_{adh} wurde durch die Behandlung von ZVK-Typ II mit 0,4 mg/ml humanem Fibrinogen hervorgerufen, einer physiologisch relevanten Blutplasmakonzentration dieses Proteins. Hierbei wurde für HOM 6 eine mittlere Adhäsionskraft in Höhe von 369 ± 425 pN bestimmt (s. Abb. 22 B).

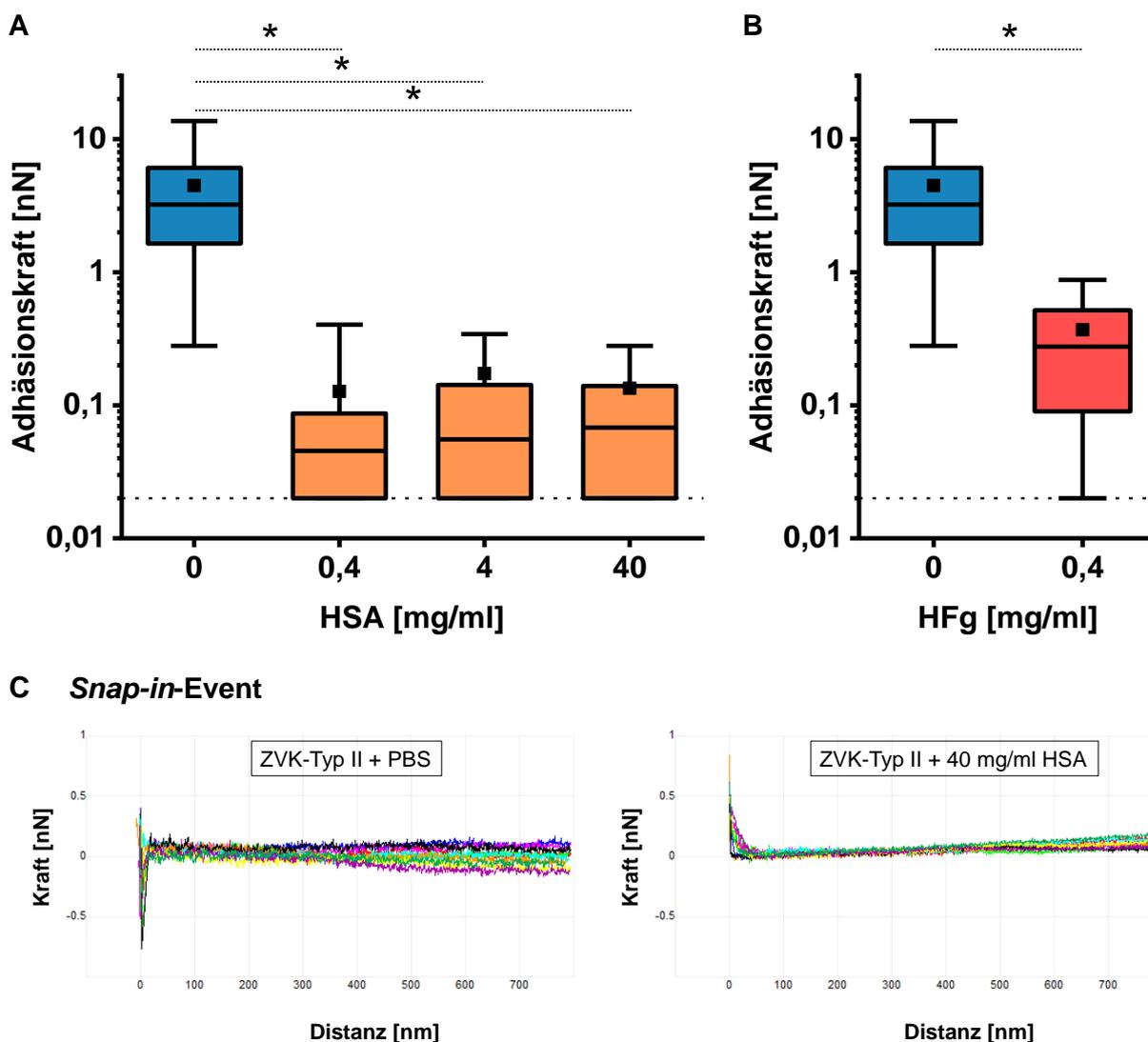


Abbildung 22: Einfluss von HSA und HFg auf die Adhäsionskraft von *S. aureus* auf ZVKs und Modulation des Snap-in-Events durch HSA.

Schlauchfragmente des ZVK-Typs II wurden mit (A) HSA (40 mg/ml, 4 mg/ml oder 0,4 mg/ml) oder (B) HFg (0,4 mg/ml) beschichtet und mit HOM 6-Bakteriensonden auf die Adhäsionskraft getestet und mit PBS-behandelten ZVK-Substratoberflächen verglichen. Boxen der Box-Plot-Diagramme enthalten

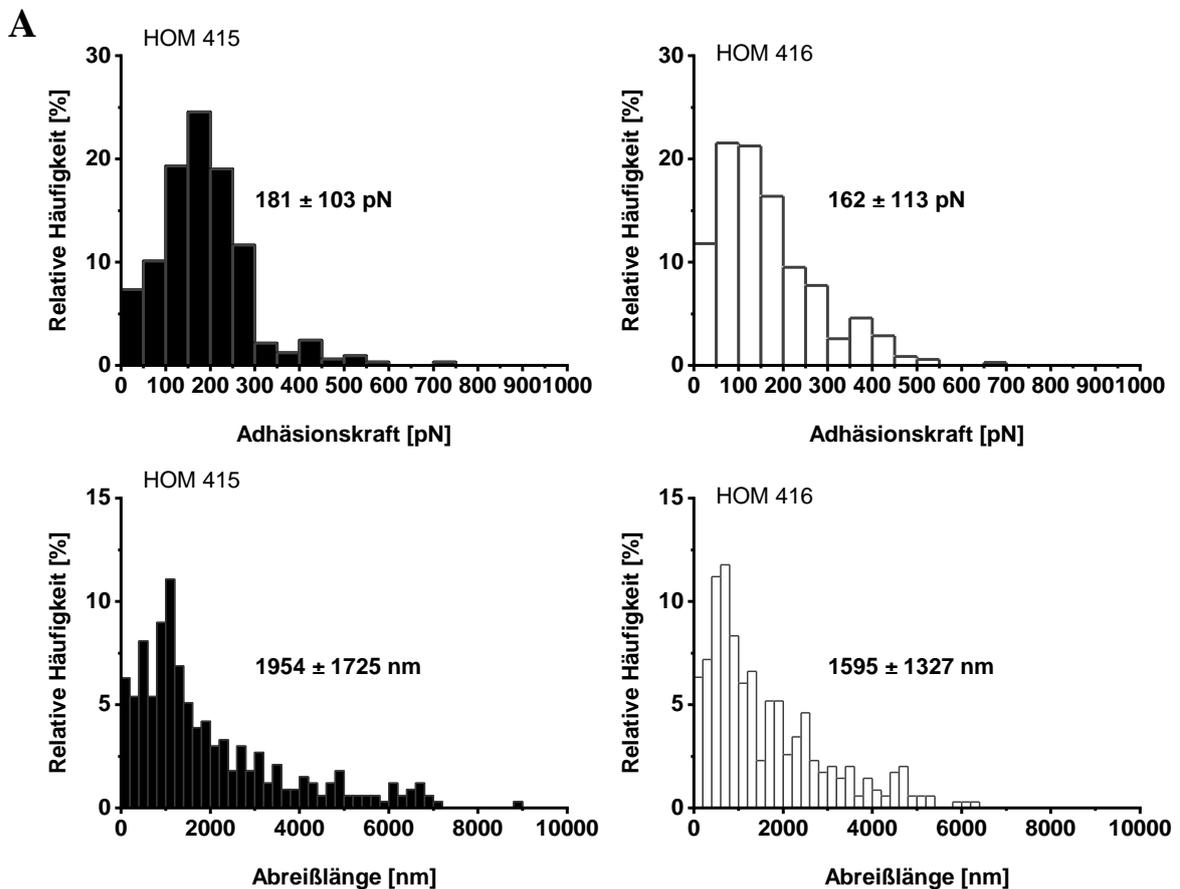
jeweils 60 Datenwerte von sechs individuellen Zellen mit jeweils 10 Werten pro Zelle. Boxen enthalten jeweils den Median (horizontale Linie), den Mittelwert (geschlossenes Quadrat), Interquartilabstände (25 % - 75 %) und Antennen mit 5 % und 95 % des Datenbereiches. * $P < 0,05$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test). (C) Überlagerung von zehn Annäherungskurven einer jeweils repräsentativen Bakterienzelle (links) mit *Snap-in*-Events auf PBS-behandelter ZVK-Oberfläche und (rechts) ohne *Snap-in*-Events auf HSA (40 mg/ml)-beschichteter ZVK-Oberfläche von ZVK-Typ II. Punktlinien kennzeichnen die Detektionsgrenze des verwendeten AFM-Systems. Teilabbildungen A und B adaptiert nach [108].

Die Untersuchung der *Snap-in*-Events in den Annäherungsphasen der Kraft-Distanz-Kurven zeigte bereits große Unterschiede zwischen PBS- und HBP-behandelten ZVK-Fragmenten (vgl. Abb. 17). Da HSA einen starken negativen Effekt auf die Adhäsionskraft von *S. aureus* ausübte, sollte auch sein potenzieller Einfluss auf den Annäherungsvorgang des Bakteriums zur Substratoberfläche und auf die *Snap-in*-Kraft untersucht werden. Interessanterweise konnten auf HSA-beschichteten Schlauchfragmenten des ZVK-Typs II keine *Snap-in*-Events ausgemacht werden, während nach einer Behandlung der ZVK-Oberfläche mit PBS deutliche *Snap-in*-Events mit scharfen *Snap-in*-Peaks beobachtet wurden (s. Abb. 22 C).

4.8 Bestimmung der Adhäsionsstärke zwischen *S. aureus* HOM 415 und der Endothelialzelllinie Ea.hy926

Die Invasion und Überlebensfähigkeit von *S. aureus* in eukaryonten Zellen ist stark abhängig vom Wirtszelltyp und vom bakteriellen Isolat. Dabei ist die Adhäsionsfähigkeit des Bakteriums an den jeweiligen Zelltyp eine Grundvoraussetzung für die rezeptorvermittelte Invasionsfähigkeit des Bakteriums. Um sichere Aussagen zur intrazellulären Überlebensfähigkeit von *S. aureus* in eukaryonten Zellen zu treffen, sollten im Vorfeld mögliche Unterschiede in der Adhäsionsstärke (d.h., Parameter wie Adhäsionskraft und Abreißlänge) der zur Untersuchung in Betracht kommenden Bakterienstämme festgestellt werden. Aus Vorarbeiten des IMMH war bereits bekannt, dass die Überlebensfähigkeit von *S. aureus* DSM20231, einem Derivat des aus humanem Pleuraerguss gewonnenen *S. aureus*-Isolats 533 R4, in eukaryonten Zellen stark abhängig vom Hitzeschockprotein ClpC ist [87]. In dieser Arbeit wurden daher die Adhäsionskräfte und Abreißlängen von *S. aureus* DSM20231 (HOM 415) und der homologen *clpC*-Mutante (HOM 416) ermittelt. Dafür wurden einzelzellkraftspektroskopische Kraft-Distanz-Kurven auf flachen Zellarealen, den Lamellipodien, der Endothel-Zelllinie Ea.hy926 durchgeführt. Ein Vergleich der Adhäsionskräfte zwischen den beiden HOM-Stämmen zeigte, dass ihre Werte für F_{adh} vergleichbar hoch waren. Die Adhäsionskräfte für HOM 415 bewegten sich bei 181 ± 103 pN und die Werte für HOM 416 lagen bei 162 ± 113 pN. Auch waren die mittleren Abreißlängen mit 1954 ± 1726 nm für HOM 415 und 1595 ± 1327 nm für HOM 416 in einem vergleichbaren

Längenbereich und nicht signifikant voneinander unterschiedlich (s. Abb. 23 A). Ein Vergleich der Rückzugsevents der Kraft-Distanz-Kurven verdeutlichte das Vorkommen von kurzen Interaktionen mit einem scharfen Adhäsionspeak und von langen Interaktionen mit sowohl scharfem Peak (Adhäsionskraft) als auch einem „Kräfte-Plateau“, einer gleichbleibenden Interaktionskraft zwischen Bakterium und der Endothelzelle bei der Rückfahrt der Bakterien-sonde von der Oberfläche, bis der Kontakt zwischen diesen beiden Zelltypen komplett abreißt (s. Abb. 22 B). Die Kurven verdeutlichten, dass beide bakteriellen Stämmen spezifische Interaktionen mit Bindepartnern auf den Ea.hy926-Zellen ausüben konnten und eine langanhaltende Bindung mit der Endothelzellmembran [260] (engl. membran tetherings), oder mit Komponenten der extrazellulären Matrix der eukaryonten Wirtszelle ausbilden konnten.



B

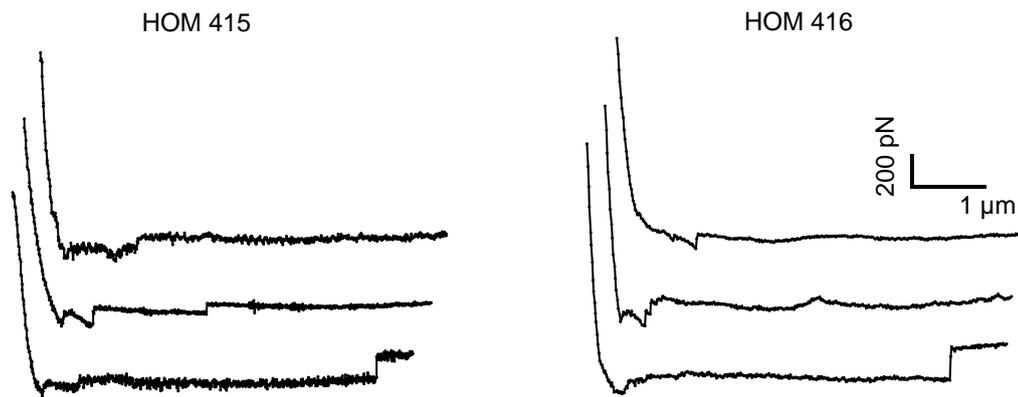


Abbildung 23: Untersuchung der Adhäsionskraft und Abreißlänge von *S. aureus* HOM 415 und der homologen $\Delta clpC$ -Mutante HOM 416 auf humanen Endothelzellen.

Einzelzell-kraftspektroskopische Messungen von *S. aureus*-HOM 415 (DSM20231 Wildtyp) und HOM 416 $\Delta clpC$ aus der stationären Wachstumsphase auf Endothelzellen des Typs Ea.Hy926. (A) Adhäsionskräfte und Abreißlängen von sechs individuellen Bakterienzellen. Die Histogramme setzen sie jeweils aus den ermittelten Datenwerten von insgesamt 384 Kraft-Distanz-Kurven von sechs unterschiedlichen Bakterienzellen (64 Datenwerte pro Bakterium) zusammen. (B) Exemplarische Rückzugskurven zwischen Bakterium und dem Lamellipodium der Endothelzelle. Adaptiert nach [107].

4.9 Bestimmung der Adhäsionsstärke von *C. albicans* auf nativem oder speichelbeschichtetem Zahnschmelz

Ein wichtiger Faktor bei der Kolonisierung der Mundhöhle, wie etwa die Zahnoberfläche, ist die initiale mikrobielle Adhäsion, die auch als erster Schritt der Biofilmbildung in Zahnkavitäten von hoher Relevanz ist. Der opportunistische Hefepilz *Candida albicans* steht im Fokus solche Oberflächen zu besiedeln und bei Kindern S-ECC auszulösen, die vor allem Kinder unter 3 Jahren oder zwischen 4-6 Jahren betrifft [301]. Im Fokus dieses Teils der Arbeit standen die Generierung von FluidFM-basierten Hefesonden und die Quantifizierung der zellindividuellen Adhäsion von *C. albicans* auf Zahnschmelz-Prüfkörpern. Die auf diese Weise generierte Hefesonde wurde auf einen flachen Zahnschmelzprüfkörper überführt und die Adhäsionsparameter F_{adh} , L_{abr} (Abreißlänge), und E_{adh} bestimmt. Zunächst wurden *C. albicans*-Zellen aus einer Übernachtskultur unbehandelt (das bedeutet ohne vorherige Behandlung in Speichel) auf natürlichem und speichelbehandeltem Enamel für kurze Oberflächenkontaktzeiten (0 s und 5 s) auf ihre F_{adh} -Werte hin getestet (s. Abb. 24 A).

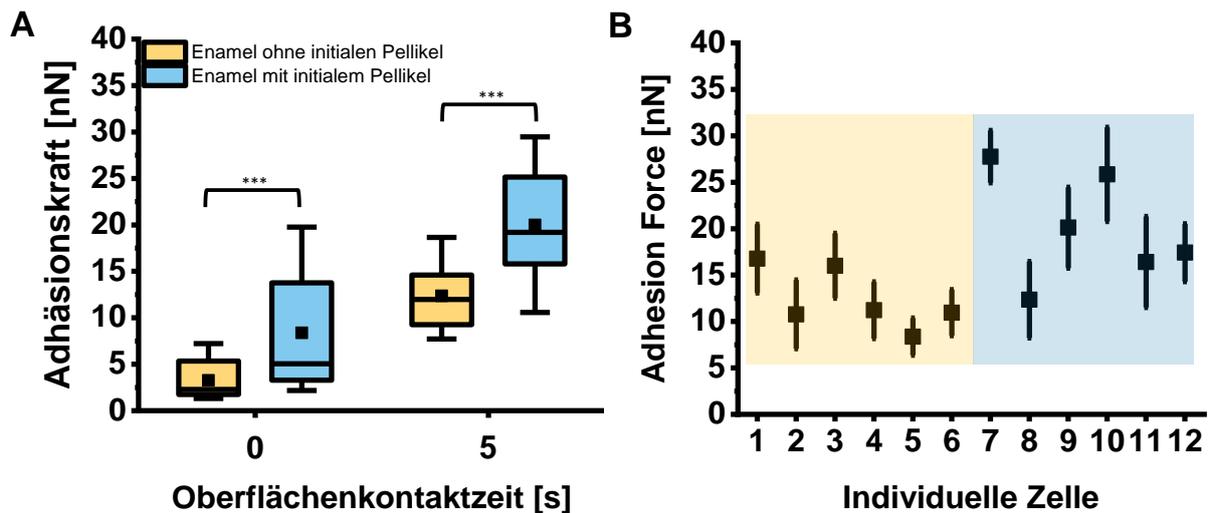


Abbildung 24: Adhäsionskräfte von unbehandelten *C. albicans*-Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern mit oder ohne Speichelpelikel.

Dargestellt sind (A) die Adhäsionskräfte von *C. albicans* ATCC 10231- Zellen auf unbehandeltem oder speichel-behandeltem Zahnschmelz für die Oberflächenkontaktzeiten 0 s und 5 s. Boxen der Box-Plot-Diagramme enthalten jeweils den Median (horizontale Linie), den Mittelwert (geschlossenes Quadrat), die Interquartilabstände (25 % - 75 %) und Antennen mit 5 % und 95 % des Datenbereichs. Jede Box enthält 30 Datenpunkte von insgesamt sechs individuellen Zellen (5 Datenpunkte/ Zelle). *** $P < 0,001$ (Mann-Whitney U-Test mit den F_{adh} -Mittelwerten der individuellen Zellen). (B) Adhäsionskräfte von individuellen Hefezellen für eine Oberflächenkontaktzeit von 5 s. Farblich hinterlegte Bereiche kennzeichnen eine Behandlung des Zahnschmelzes ohne (orange) oder mit (blau) Speichel. Mittelwerte (geschlossenes Quadrat) und Standardabweichungen (Antennen) wurden aus jeweils fünf Datenpunkten ermittelt. Adaptiert nach [109].

Die hier gezeigten Daten, die in Abhängigkeit der Kontaktzeit bestimmt wurden, verdeutlichten eine signifikante Steigerung der Adhäsionskräfte zwischen *C. albicans* und Zahnschmelz durch eine Steigerung der Kontaktzeit von $t = 0$ s auf $t = 5$ s. Bei Betrachtung der Oberflächenkontaktzeit $t = 0$ s ergaben sich F_{adh} -Werte in Höhe von $3,3 \pm 2,1$ nN auf unbehandeltem Zahnschmelz und in Höhe von $8,4 \pm 6,2$ nN auf speichelbehandeltem Zahnschmelz (s. Abb. 24 A). Dies lässt vermuten, dass adsorbierte Speichelkomponenten auf dem Zahlschmelz dazu beitragen, die Adhäsionskraft von *C. albicans* auf dieser biokonditionierten Zahnoberfläche signifikant zu erhöhen. Eine Erhöhung der Oberflächenkontaktzeit auf $t = 5$ s resultierte in einer allgemeinen Steigerung der F_{adh} . Die entsprechenden Werte lagen hier bei $12,4 \pm 3,6$ nN auf unbehandeltem Zahnschmelz und bei $20,0 \pm 6,0$ nN für speichelbehandelten Zahnschmelz. Somit ergaben sich auch diese Oberflächenkontaktzeit erhöhte Adhäsionskräfte auf speichelbehandeltem Zahnschmelz. Ein genauerer Blick auf die individuelle Adhäsionsstärke einzelner *C. albicans*-Zellen auf Zahnschmelz verriet, dass die mittleren Adhäsionskräfte auf speichelbehandeltem Zahnschmelz insgesamt höher lagen als auf den unbehandelten Zahnschmelzoberflächen (s. Abb. 24 B). Die insgesamt starke Adhäsion des Hefepilzes im nN-Bereich auf Zahnschmelz veranlasst zu tiefergehende Analysen der Rückzugsevents der Kraft-

Distanz-Kurven. Hierbei zeigte sich, dass, ungeachtet der vorliegenden Zahnschmelzoberflächenkondition, eine ausgeprägte Interaktion von *C. albicans* mit Zahnschmelz vorlag mit ausgeprägten Adhäsionspeaks und Sägezahn-förmigen Kurvenverläufen (s. Abb. 25 A).

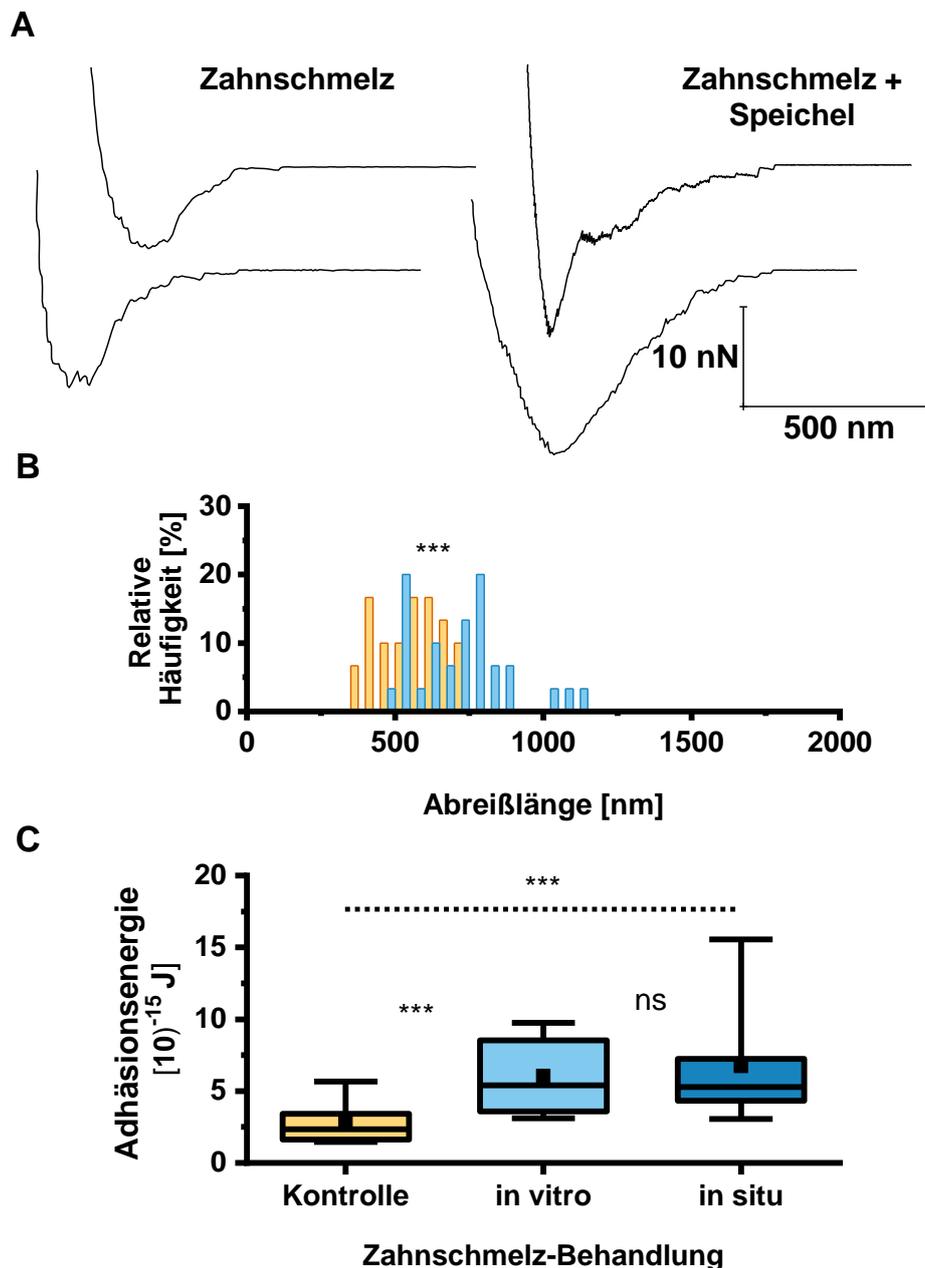


Abbildung 25: Rückzugskurven, Abreißlängen und Adhäsionsenergien von unbehandelten *C. albicans*-Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern.

(A) Repräsentative Rückzugskurven aus der FluidFM-basierten Einzelzellkraftspektroskopie von *C. albicans* ATCC 10231 auf natürlichem (links) und speichelbehandeltem Zahnschmelz (rechts). (B) Abreißlängen für einen Oberflächenkontaktzeit von $t = 5 \text{ s}$ auf unbehandeltem (orange) oder

speichelbehandeltem (blau) Zahnschmelz. Histogramm enthält Klassen mit einer Klassenbreite von 50 nm. ***, $P < 0,001$ (Mann-Whitney U-Test). (C) Adhäsionsenergien zwischen Hefezellen und unbehandelten, speichelbehandelten oder *in situ*-behandeltem Zahnschmelz-Prüfkörpern. Boxen des Box-Plot-Diagramms enthalten Median (horizontale Linie) und Mittelwert (geschlossenes Quadrat) sowie Interquartilabstände (25 % - 75 %) und Antennen mit 90 % des Datenbereichs. Jede Box enthält 30 Datenpunkte von sechs individuellen Zellen. ns, nicht signifikant. ***, $P < 0,001$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test). Adaptiert nach [109].

Interessanterweise zeigten sich auf speichelbehandeltem Zahnschmelz für die Abreißlänge L_{Abr} , die den Abstand markiert, bei dem die letzten Bindungen zwischen *C. albicans* und der Zahnschmelzoberfläche gebrochen werden, mit $720,9 \pm 167,3$ nm im Vergleich zu einem L_{Abr} -Wert von $558,8 \pm 111,2$ nm auf unbehandeltem Zahnschmelz erhöhte Werte (s. Abb. 25 B). Die Untersuchung der Adhäsionsenergie E_{adh} zeigte für eine Oberflächenkontaktzeit von $t = 5$ s auf speichelbehandeltem Zahnschmelz eine 2,2-fache Erhöhung des Betrags im Vergleich zu unbehandeltem Zahnschmelz. Um die Adhäsionsenergie auch auf physiologisch noch relevanterem Speichelpellikel zu bestimmen, wurden Kraft-Distanz-Kurven auf *in situ*-generierten 3-Minuten-Pellikeln auf Zahnschmelz-Prüfkörpern getestet. Dabei wurden eine 2,5-fache Erhöhung von E_{adh} im Vergleich zum unbehandelten Enamel und ähnliche Werte im Vergleich zu *in vitro*-generierten Speichelbelägen auf Zahnschmelz festgestellt (s. Abb. 25 C).

4.10 Bestimmung der Adhäsionsstärke von speichelbehandelten *C. albicans*-Zellen auf Zahnschmelz

In der Mundhöhle zirkulierende *C. albicans*-Zellen sind, im Gegensatz zu im Labor kultivierten Zellen, sowohl unmittelbar nach Eintritt als auch bei bereits etablierter Persistenz in der Mundhöhle mit Speichelkomponenten bedeckt. Daher wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob durch eine Behandlung der *C. albicans*-Zelloberfläche mit humanem Speichel die Adhäsion des Organismus an Zahnschmelz beeinflusst wird. Dafür wurden Übernachtskulturen von *C. albicans* in einer humanen Speichellösung, einer Speichelmixtur aus zusammengeführten Speichelproben gesunder Probanden, inkubiert. Dabei wurde, ähnlich wie zuvor bei den unbehandelten *C. albicans*-Zellen, Adhäsionskräfte im nN-Bereich sowie eine generelle Steigerung der Adhäsionskraft auf Zahnschmelz-Prüfkörpern durch eine Erhöhung der Kontaktzeit beobachtet. Für eine Oberflächenkontaktzeit von zunächst $t = 0$ s lagen auf unbehandeltem Zahnschmelz-Prüfkörpern die Adhäsionskräfte bei $1,6 \pm 0,5$ nN und auf speichelbehandelten Prüfkörpern bei $6,0 \pm 2,0$ (s. Abb. 26 A). Für eine Oberflächenkontaktzeit von $t = 5$ s erreichten die Werte für F_{adh} auf unbehandeltem Zahnschmelz einen Betrag von $6,5 \pm 1,5$ nN und auf speichelbehandeltem Zahnschmelz, deutlich höher, einen Betrag von $17,7 \pm 6,8$ nN.

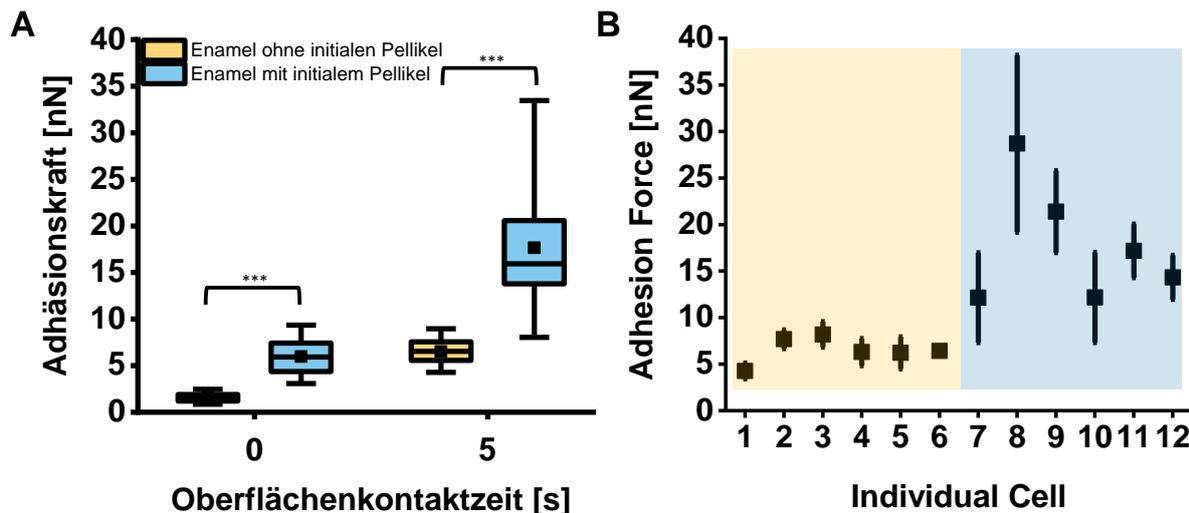


Abbildung 26: Adhäsionskräfte von speichelbehandelten *C. albicans*-Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern mit oder ohne Speichelpellikel.

Dargestellt sind (A) die Adhäsionskräfte von speichelbehandelten *C. albicans*-Zellen auf unbehandeltem oder speichelbehandeltem Zahnschmelz-Prüfkörpern für die Oberflächenkontaktzeiten 0 s und 5 s. Boxen der Box-Plot-Diagramme enthalten jeweils den Median (horizontale Linie), den Mittelwert (geschlossenes Quadrat), die Interquartilabstände (25 % - 75 %) sowie Antennen mit 90 % des Datenbereiches. Jede Box enthält 30 Datenpunkte von insgesamt sechs individuellen Zellen. *** $P < 0,001$ (Mann-Whitney U-Test mit den F_{adh} -Mittelwerten der individuellen Zellen). (B) Adhäsionskräfte von individuellen Hefezellen. Farblich hinterlegte Bereiche kennzeichnen eine Beschichtung des Zahnschmelzes ohne (orange) oder mit (blau) Speichel. Mittelwerte (geschlossenes Quadrat) und Standardabweichungen (Antennen) wurden aus jeweils fünf Datenpunkten ermittelt. Adaptiert nach [109].

Vergleichbar mit unbehandelten *C. albicans*-Zellen, zeigten speichelbehandelte Zellen signifikant höhere Adhäsionskräfte auf speichelbehandeltem Zahnschmelz als auf unbehandeltem Zahnschmelz (s. Abb. 26 rechts). Rückzugskurven aus der Einzelzellkraftspektroskopie zeigten auch unter diesen Bedingungen ausgeprägte Adhäsionspeaks und sägezahnförmige Kurvenverläufe sowohl auf der unbehandelten als auch auf der speichelbehandelten Enameloberfläche (s. Abb. 27 A). Abreißlängen erreichten auf unbehandeltem Zahnschmelz einen Mittelwert bei $479,4 \pm 105,1$ nm und auf speichelbehandeltem Zahnschmelz bei $703,2 \pm 215,9$ nm, woraus gefolgert werden kann, dass adsorbierte Speichelkomponenten auf der Enameloberfläche die maximale Interaktionslänge zwischen Hefezellen und Zahnschmelzoberfläche erhöhen (s. Abb. 27 B). Die starke Interaktion machte sich auch für E_{adh} von speichelbehandelten *C. albicans*-Zellen bemerkbar. Im Vergleich zu unbehandelten Zahnschmelzoberflächen waren auf speichelbehandeltem Zahnschmelz die Beträge um einen Faktor > 4 größer. Zusätzlich wurde E_{adh} auch auf *in situ*-behandeltem Zahnschmelz bestimmt. Die Werte für E_{adh} waren vergleichbar mit denen auf *in vitro*-speichelbehandeltem Zahnschmelz, und zeigten, dass die *in*

in vitro-generierten 3-Minuten-Speichelbeläge auf Zahnschmelz, hinsichtlich der adhäsiven Eigenschaften für Hefezellen, mit den *in situ*-Pellikel vergleichbar waren (s. Abb. 27 C).

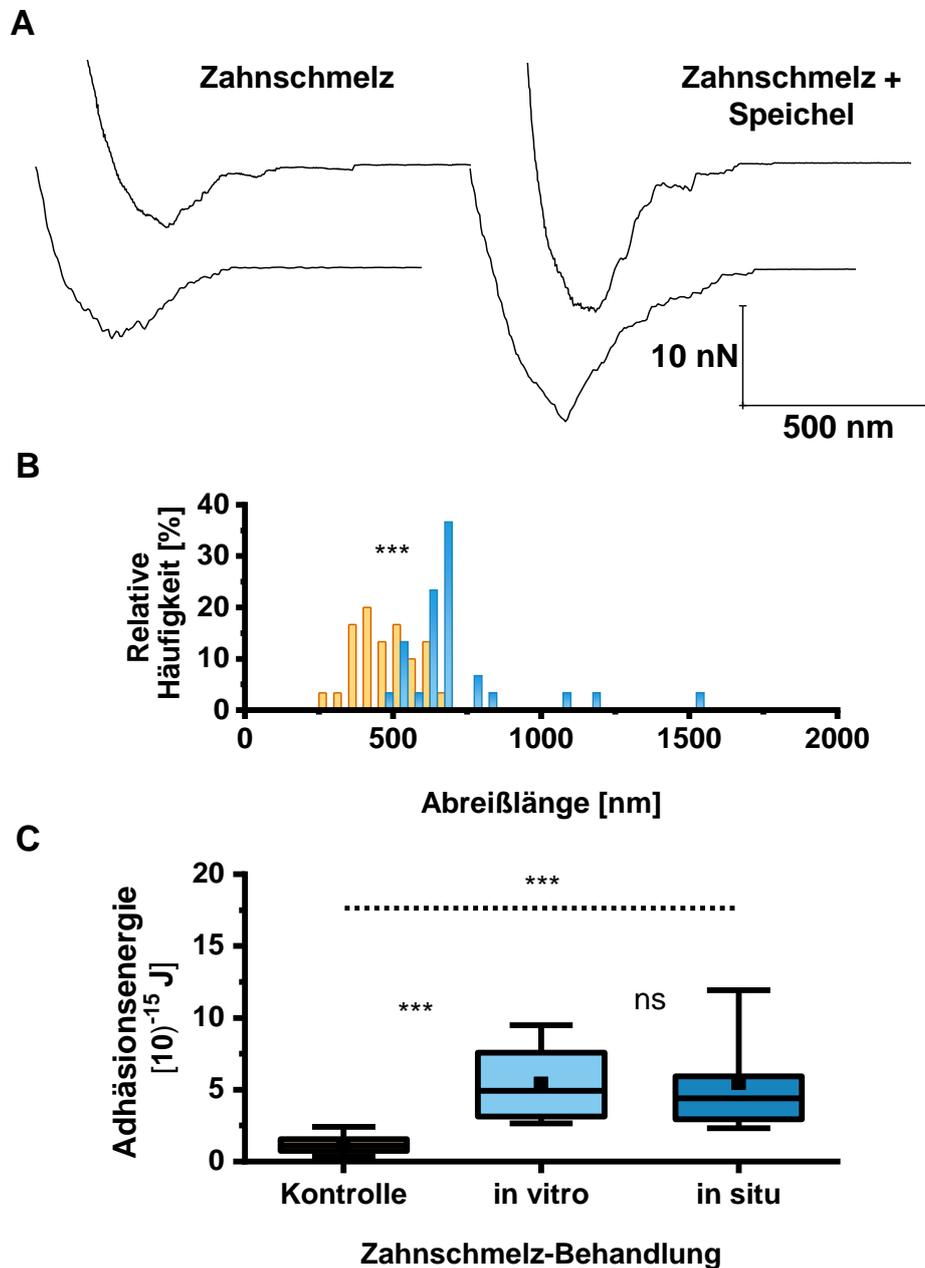


Abbildung 27: Rückzugskurven, Abreißlängen und Adhäsionsenergien von speichelbehandelten *C. albicans*-Zellen auf Zahnschmelz-Prüfkörpern.

(A) Repräsentative Rückzugskurven aus der FluidFM-basierten Hefezellen-Einzelzellkraftspektroskopie auf natürlichem (links) und speichelbehandeltem Enamel (rechts). (B) Abreißlängen für einen Oberflächenkontaktzeit von $t = 5$ s auf unbehandeltem (orange) oder speichelbehandeltem (blau) Enamel. Histogramm weist Klassen mit einer Klassenbreite von 50 nm aus. ***, $P < 0,001$ (Mann-Whitney U-Test). (C) Adhäsionsenergie zwischen *C. albicans*-Zellen und unbehandelten, speichelbehandelten oder *in situ*-behandelten Zahnschmelz-Prüfkörpern. Boxen des Box-Plot-Diagramms enthalten den Median (horizontale Linie), den Mittelwert (geschlossenes

Quadrat), die Interquartilabstände (25 % - 75 %) und Antennen mit 5 % und 95 % des Datenbereichs. Jede Box enthält 25-30 Datenpunkte von fünf bis sechs individuellen Zellen. ns, nicht signifikant. ***, $P < 0,001$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test). Adaptiert nach [109].

Die Einzelzell-kraftspektroskopischen Experimenten mit *C. albicans* belegen, dass sowohl unbehandelte als auch speichelbehandelte Hefezellen mit hohen Adhäsionskräften auf den Pellikeln des Enamel anzuhaften vermögen. Ein detaillierter Blick auf Rückzugskurven sollte nun Hinweise darauf geben, ob die adsorbierten Speichelkomponenten auf der *C. albicans*-Zelloberfläche den Adhäsionsmechanismus verändern. Dafür wurden AFM-Rückzugskurven aus Kraft-Distanz-Messungen von unbehandeltem und speichelbehandeltem *C. albicans* auf Zahnschmelz überlagert und gegenübergestellt. Ausgewertet wurden dabei die Kurven auf den *in situ*-formierten Pellikeln auf Zahnschmelz, um die potenziell unterschiedlichen Adhäsionsmechanismen bei möglichst physiologischer Oberflächenbeschaffenheit des Enamel zu vergleichen. Hier konnte beobachtet werden, dass die Werte für F_{adh} für unbehandelte Hefezellen bei $21,1 \pm 10,0$ nN und für speichelbehandelte Hefezellen bei $15,7 \pm 8,6$ nN und somit in einem noch vergleichbaren Größenbereich lagen. Interessanterweise aber konnten Unterschiede in der lokalen Position von F_{adh} beobachtet werden, die für unbehandelte Hefezellen bei $197,4 \pm 45,8$ nm lagen und für speichelbehandelte Hefezellen auf $298,0 \pm 59,3$ nm verschoben wurden (s. Abb. 28). Dies indiziert, dass die Länge der involvierten Adhäsionsmoleküle beim Auftreten des Adhäsionspeaks unterschiedlich ist.

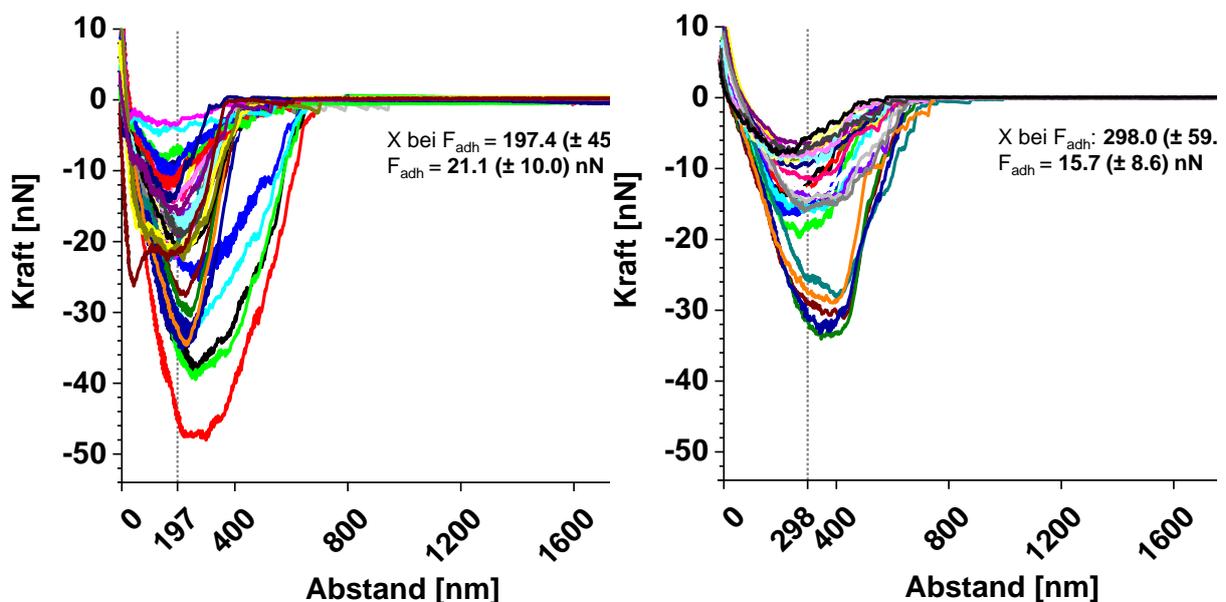


Abbildung 28: Überlagerung von Kraft-Distanz-Kurven von unbehandelten oder speichelbehandelten *C. albicans*-Zellen auf *in situ*-Pellikeln des Zahnschmelzes.

Überlagerungen der Rückzugsphasen von Kraft-Distanz-Messungen zwischen *C. albicans* und Zahnschmelz. Einzelne Kurven stammen von (links) unbehandelten *C. albicans*-Zellen ($n = 35$) und von (rechts) speichelbehandelten *C. albicans*-Zellen ($n = 25$). Dargestellt sind der mittlere Abstand der Adhäsionskraft (X bei F_{adh}) vom Nullpunkt ($X = 0$) und die mittlere Adhäsionskraft (F_{adh}). [109].

5 Diskussion

5.1 Die Oberflächeneigenschaften von ZVK-Typ I-III

Polyurethan(PU)-basierte Zentrale Venenkatheter sind neben den Silikon-basierten Kathetertypen die am meisten verwendeten ZVKs unter den klinisch-großvenösen Zugängen [296]. Neben ihrer großen Biostabilität und Biokompatibilität bei der Behandlung von Patienten bilden PU-basierte ZVKs aber auch ein Risiko für Thrombosen und Infektionen, da sie Oberflächeneigenschaften und Irregularitäten aufweisen können, die die Adhäsion von nosokomialen Keimen, darunter von opportunistisch-pathogenen Bakterien wie *S. aureus* begünstigen [282,296]. Aus diesen Gründen liefern quantitative Daten über die Oberflächenrauigkeit, Irregularitäten auf der Oberfläche, Hydrophobizität und Adhäsionseigenschaften der ZVKs wichtige Hinweise für eine Interpretation der Adhäsionsstärke (und somit des mechanischen Zusammenhalts) zwischen Bakterien und ZVK.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Oberflächentopografien der ZVK-Typen I-III mit dem Rasterkraftmikroskop und die Hydrophobizität über Kontaktwinkel-Messungen untersucht. Ein Vergleich zwischen den ZVK-Typen zeigte, dass die mit dem Rasterkraftmikroskop untersuchten Areale der ZVKs im nativen Zustand, d.h. bevor es zu einem Kontakt mit Flüssigkeit in Form einer Vorbehandlung kam, eine raue Oberfläche aufwiesen. Dies steht im Einklang mit ähnlichen Erkenntnissen aus früheren Arbeiten, die demonstrierten, dass native ZVK-Oberflächen, darunter auch ein namensgleiches Modell von ZVK Typ-II, mit irregulären, körnigen Oberflächenstrukturen durchsetzt waren [29,30,263,296]. Die hier untersuchten ZVK-Typen besaßen teilweise Welligkeiten in der Oberfläche und körnige Strukturen, die wenigen hundert nm Höhe erreichten. In einem möglichen Adhäsionsszenario auf der ZVK-Oberfläche könnten solche Begebenheiten den Mikroorganismen Schutz vor mechanischen Scherkräften geben, wenn etwa einzelne Hautkeime bei der ZVK-Insertion beim Patienten an den ZVK binden und sich so vor mechanischen Scherkräften beim Penetrieren des Gewebes, oder, nach Insertion des ZVKs ins Blutgefäß, durch den Blutstrom schützen können. Die in den Topografien beobachteten markanten Wellenhöhen und die breiten Wellenabstände könnten die ersten kleineren Poren im ZVK darstellen und eine Einlagerung von einzelnen Mikroorganismen und somit die Entstehung von Mikrokolonien begünstigen. Darüber hinaus zeigten die AFM-Bilder auch Unterschiede in den Oberflächentopografien der drei ZVK-Typen. Es ist zu erwarten, dass firmenindividuelle Herstellungsverfahren zur Gewinnung der PU-basierten ZVKs zu unterschiedlich

gestalteten ZVK-Oberflächen führen: Eine Studie von Bovas und Kollegen von 2018 stellte die Bedeutung des PU-Härtegrades für die Oberflächentopografie heraus [29]. Die SHORE A-Härte, benannt nach Albert F. Shore, die häufig zur Bestimmung des Härtegrades von Elastomeren verwendet wird, ist hilfreich bei der Einordnung des Härtegrades von PU-Polymeren, die für ZVKs verwendet werden. Dabei entsprechen 0 SHORE einer hohen Eindringtiefe von 2,5 mm eines Indenters (ein Kegelstumpf mit einer μm -Stirnfläche) in die Substratoberfläche und 100 SHORE einer Eindringtiefe von 0 mm. Für die Herstellung vieler ZVKs wird thermoplastisches Polyurethan mit einer geringen Eindringtiefe verwendet, wie etwa Pellethane[®] mit der Shore-A-Härte 85, jedoch gibt es auch zahlreiche andere Härtegrade, die ausgewählt werden könnten [29]. Weiterhin kann bei der Produktion von Polyurethan-Granulat im Herstellungsprozess der ZVKs, die dort angewandte Schmelztemperatur die Beschaffenheit der späteren ZVK-Oberfläche bereits beeinflussen, da gezeigt werden konnte, dass Variationen der Schmelztemperatur im Bereich zwischen 185-200 °C zu differenzierbaren Oberflächentopografien, Rauigkeiten und Oberflächen-Hydrophobizitäten führten [29]. Dazu passen auch die unterschiedlichen Wasserkontaktwinkel, die im Rahmen dieser Arbeit auf den ZVK-Typen I-III bestimmt wurden. Solche Unterschiede könnten durch individuelle Herstellungsprotokolle der Unternehmen entstanden sein. Die hier untersuchten ZVK-Exemplare waren zwar stets hydrophob, jedoch waren durchaus Unterschiede in den Wasserkontaktwinkeln erkennbar. So konnten für ZVK-Typ I im Vergleich zu den beiden anderen ZVK-Typen, die nahezu identische Wasserkontaktwinkel aufwiesen, ein 9,1 %-höherer Wasserkontaktwinkel ermittelt werden, was auch als ein Hinweis dafür gesehen werden kann, dass Oberflächen dieses ZVK-Typs für Bakterien mit mehrheitlich hydrophoben Zellwandeigenschaften wie etwa *S. aureus* [231] eine höhere Attraktivität besitzen. Schließlich könnten Inkorporationen von weiteren Molekülen im Polyurethan-Festkörper zu unterschiedlichen Oberflächen führen. Beispielsweise wird das Kontrastmittel Bariumsulfat zur Erleichterung bildgebender medizinischer Verfahren als Modifikation in ZVKs verwendet [282]. Dieser inkorporierte Hilfsstoff kann in wässriger Umgebung leicht aus dem ZVK herausgelöst werden und eine inhomogene ZVK-Oberfläche mit teilweise löchrigen Strukturen hinterlassen. In einer Studie mit Tripellumen-ZVKs von Arrow (derselbe Markenname wie ZVK-Typ I) wurde Bariumsulfat detektiert, während in einem Modell von B. Braun (Certofix Trio; namensgleiches Modell des hier verwendeten ZVK-Typs II), keines auffindbar war [277]. Ob allerdings bei der Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten ZVK-Modelle auch Bariumsulfat verarbeitet wurde, lässt sich allein aufgrund der topografischen ZVK-Daten, die hier gewonnen wurden, nicht beurteilen.

Das AFM wurde auch dazu genutzt, um die Topografie des ZVKs nach dessen Behandlung in HBP oder PBS darzustellen, wie im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel von ZVK-Typ II dargestellt wurde. Auf beiden, behandelten Oberflächen konnten auffällig viele körnige Strukturen (Erhebungen auf der Oberfläche) beobachtet werden, deren Erscheinung ein Resultat des 30-minütigen Kontakts des ZVKs mit der Flüssigkeit sein könnte. Der im Vergleich zu unbehandelten ZVKs zeitlich verlängerte Kontakt mit der Flüssigkeit löst auf behandelten ZVKs vermutlich eine Konformationsänderung des

oberflächennahen PUs aus [166,228]. Da das Co-Block-Polymer PU aus hydrophoben und hydrophilen Segmenten besteht, ist es aufgrund des Wasserkontaktes sehr wahrscheinlich zu einer Mikrophasen-Segregation dieser Segmente und somit zu einer Reorganisation der Oberfläche gekommen [5]. Unklar ist, ob solche Oberflächenänderungen, erstens, nachteilig für den Patienten sind und/oder, zweitens, eine Infektion mit Krankenhauskeimen begünstigen. Eine Bestimmung des Härtegrades könnte hier einen Vergleich mit Pellethane® ermöglichen, und aufzeigen, ob die dynamischen Veränderungen mit dem Härtegrad korrelieren. Interessanterweise zeigte eine ältere Arbeit, dass Pellethane® eine große Widerstandsfähigkeit gegen Oberflächenveränderungen im Vergleich zu anderen Polyurethan-Typen aufwies [50]. Initiale, dynamische Veränderungen werden u.a. durch eine hydrophobe Oberfläche und eine feste kristalline Struktur des Materials aktiv unterdrückt. Ob dynamische ZVK-Oberflächen, wie ZVK-Typ II, die Infektion mit Krankenhauskeimen begünstigen, lässt sich anhand der Quantifizierung der Adhäsionsstärke individueller *S. aureus*-Zellen aus dieser Studie nicht eindeutig sagen, da die Adhäsionsstärke bereits auf nativem Substrat sehr hoch war. Aus Sicht des Patienten wäre es auch interessant, diesen ZVK-Typ, auch im Vergleich zu den anderen ZVK-Typen dieser Arbeit, auf das Thromboserisiko zu testen.

Interessanterweise zeigte sich eine starke Adhäsion der AFM-Messspitze aus Quarz-ähnlichem Material⁵ auf der ZVK-Oberfläche. Basierend auf den großen Werten für die Adhäsionskraft wäre es denkbar, dass die Messspitze über zwischenmolekulare Kräfte mit der ZVK-Oberfläche interagiert. In Flüssigkeiten ist die Messspitze vermutlich als hydrophil einzustufen, da auch chemisch ähnliche SiO₂-Messspitzen in Flüssigkeit mit stabilen Lagen von Wassermolekülen überlagert werden und somit als hydrophil gelten [58,283]. Durch stabile Wassermoleküle auf der Oberfläche der AFM-Spitze und der Exposition hydrophiler (polarer) Komponenten des ZVKs könnte es zu attraktiven Bindungen kommen. Auch der Kontaktradius der AFM-Spitze (30 nm) und die Oberflächenrauigkeiten der ZVK-Oberfläche könnten zu dieser Interaktion beitragen. Im starken Kontrast dazu konnten auf der HBP-beschichteten ZVK-Oberfläche die großen Adhäsionskräfte nicht mehr detektiert werden, obwohl die Wahl der AFM-Spitze dieselbe war und die Rauigkeit von ZVK-Typ II nach der Behandlung in HBP vergleichbar war wie bei PBS. Es lässt sich vermuten, dass bei einer 30-minütigen Behandlung des ZVK-Oberfläche mit Blutplasma die gesamte Oberfläche lückenlos und aufgrund der hohen Proteinkonzentrationen in HBP, vermutlich mehrschichtig mit makromolekularen Biokomponenten, wie HSA, aufgebaut ist [252]. Es ist zu erwarten, dass sich dadurch die ZVK-Oberfläche hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften stark geändert hatte und attraktive chemische Anteile des ZVKs für eine unspezifische (physikalische) Bindung der AFM-Messspitze zur Substratoberfläche nicht mehr zur Verfügung standen. Stattdessen würden humane Blutplasmaproteine die Oberfläche bedecken, und, wie im Falle von Albumin aus dem Blutplasma von Rindern, die Oberfläche durch die Exposition von negativ-geladenen Proteindomänen vermutlich negativ laden [156]. Einen wahrscheinlichen Grund dafür liefern

⁵ aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zu Silizium-Dioxid (SiO₂) hat diese Messspitze eine vermutlich ähnliche Hydrophobizität wie herkömmliche Messspitzen aus SiO₂ (Herstellerangabe)

die negativ-geladenen Domänen der adsorbierten Proteine. Zwischen diesen und der AFM-Spitze könnte es im extremen Fall dann zu einer kurzweitrreichenden elektrostatischen Repulsion aufgrund eines negativen-geladenen Doppellayers bei der Annäherung der AFM-Spitze an das Substrat kommen, ähnlich wie es zwischen Siliziumnitrid-AFM-Spitzen und negativ-geladenen Aluminiumoberflächen bei hohen pH-Werten beobachtet wurde [37]. Zusätzlich könnten stabile Lagen von Wassermolekülen, die sich als ein Wasser-Netzwerk auf hydrophilen, HBP-beschichteten Substratoberfläche lagern können, die Penetration der Energiebarriere durch die Messspitze erschweren. Darüber hinaus bleibt ungeklärt, ob und inwiefern sich hydrophobe Effekte auf den Adhäsionsprozess zwischen der AFM-Spitze und dem ZVK-Substrat auswirken. Daher wäre es interessant, die Oberflächentopografie und adhäsiven Eigenschaften dieses ZVK-Typs II auch im nativen hydrophoben Zustand, etwa durch AFM-Messungen in Luft ohne dessen Immersion in Flüssigkeit, oder in Flüssigkeit mit einer hydrophoben Messspitze zu bestimmen.

5.2 Die Adhäsions- und Annäherungsstärke von *S. aureus* auf ZVKs

In dieser Arbeit wurde die Adhäsionsstärke von *S. aureus* in Form von individuellen bakteriellen Zellen auf den drei handelsüblichen, Polyurethan-basierten ZVK-Typen I bis III quantifiziert. Um die Adhäsionseigenschaften von *S. aureus* hierbei möglichst detailliert zu beschreiben, ist es wichtig, neben der Rückzugskurve der Kraft-Distanz-Messungen auch die Annäherungskurve zu beurteilen. Während die Rückzugskurve Einblicke über die Natur und Stärke des Ablösevorgangs des Bakteriums von der Oberfläche gibt, erhält man bei der Annäherungskurve Information darüber, ob eine Adhäsion durch ein spontanes In-Kontakt-Springen von bakteriellen Zellwandmolekülen, d.h., durch ein *Snap-in*-Event des Bakteriums, an die Substratoberfläche stattfindet [2,42,267,290].

5.2.1 Adhäsionskräfte und Adhäsionsenergien von *S. aureus* auf ZVKs

Die Einzelzell-kraftspektroskopische Bestimmung der Adhäsionsstärke von *S. aureus* auf hydrophoben und hydrophilen Oberflächen führte bereits zu grundlegenden Erkenntnissen über Anhaftungs- und Ablöseprozesse dieses Keims auf Modellsubstratoberflächen [172,253,256,269,268]. Aus diesen Erkenntnissen konnte man ableiten, dass die Anzahl der anbindungsfähigen zellwandgebundenen/assoziierten Adhäsionsfaktoren die Höhe der Adhäsionskraft von *S. aureus* ausmachen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Adhäsionskräfte und die Adhäsionsenergien von *S. aureus* HOM 6 und HOM 433 auf den ZVK-Typen I-III aus den Rückzugskurven der Kraft-Distanz-

Messungen bestimmt. Die Werte für F_{adh} mit Durchschnittswerten zwischen 2-5 nN lassen auf eine vergleichsweise hohe Attraktivität der ZVK-Oberfläche für *S. aureus*-Adhäsion schließen [36]. Der Ablösevorgang mit dem steilen Verlauf der Rückzugskurve bis zum Erreichen des Adhäsionspeaks erinnert an die sehr glatte (engl. „cup-shaped“) Form der Rückzugskurven bei den starken Adhäsionsereignissen von *S. aureus* auf hydrophoben Siliziumoberflächen [172,253,256,268]. Auch die Werte für die Adhäsionsenergie auf den ZVK-Typen waren zu den Beträgen für E_{adh} auf hydrophoben Siliziumwafern vergleichbar [253]. Da die initiale Adhäsion von *S. aureus* auf hydrophoben Oberflächen hauptsächlich über hydrophobe Interaktionen erfolgt, ist es möglich, dass dieselben Interaktionen auch auf den ZVK-Typen I-III greifen. Hierfür sprechen die ermittelten Wasserkontaktwinkel Θ_a von $> 90^\circ$ auf den ZVK-Oberflächen, die ein eindeutiges Indiz für die hydrophobe Oberflächenbeschaffenheit der ZVKs darstellen. Wie zuvor auf hydrophoben Siliziumoberflächen beobachtet [172,258], zeigte sich auch in dieser Arbeit, dass die Höhe der Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf dem ZVK stark vom Adhäsionsvermögen des individuellen Bakteriums abhängig war. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass dieselbe individuelle Bakterienzelle ein sehr variables Adhäsionsvermögen mit zum Teil markant unterschiedlichen Adhäsionskräften auf verschiedenen Stellen desselben ZVK-Substrates aufwies. Für große Adhäsionskräfte ist es entscheidend, dass eine größtmögliche Anzahl an zellwandgebundenen Adhäsionsfaktoren von *S. aureus* mit der ZVK-Oberfläche interagieren können, wie etwa auf sehr glatten hydrophoben Siliziumoberflächen, wo zellwandgebundene Adhäsionsfaktoren simultan an die Oberfläche binden. Größere Rauigkeiten der Oberfläche könnten zu einer Variation der Maxima von F_{adh} auf der ZVK-Oberfläche führen, indem die Bakterienzelle stellenweise mit vielen Arealen des Substrates zeitgleich in Kontakt zu treten vermag und F_{adh} groß wird, oder mit nur sehr wenigen und die Anbindungsmöglichkeiten sowie F_{adh} reduziert werden. Eine nicht-gleichmäßige Verteilung der zellwandgebundenen Adhäsionsfaktoren, u.a. in Nanoclustern, auf der Oberfläche von *S. aureus* mag dazu führen, dass auch die Welligkeit der ZVK-Oberfläche darüber entscheidet, ob adhärenente Stellen des Bakteriums die Oberfläche erreichen oder nicht [258]. Schließlich können positionsabhängige Adhäsionskräfte auch auf eine chemisch heterogene Substratoberfläche hindeuten, sodass die Interaktionen zwischen Bakterium und ZVK heterogene Werte für F_{adh} erreichen, anders etwa als auf gleichmäßigen funktionalisierten Oberflächen wie silanisierte Silizium-Oberflächen, die nahezu identischen F_{adh} auf verschiedenen Arealen produzieren lassen [172,267]. Auch ist nicht auszuschließen, dass die Substratoberfläche im zeitlichen Rahmen der AFM-Messungen dynamischen Veränderungen ausgesetzt war, die durch eine Phasentrennung der harten und weichen Domänen des Polyurethans über den Kontakt mit dem physiologischen Puffer über die Zeit induziert wurde [30].

Da *S. aureus* für seine genetische und phänotypische Heterogenität bekannt ist, wurden in dieser Arbeit die Adhäsionskräfte des Gesamtgenom-sequenzierten Laborstamms HOM 6 (N315) und die des frisch von einer ZVK-Oberfläche gewonnenen klinischen Isolats HOM 433 ermittelt. Die Ergebnisse der Einzelzell-kraftspektroskopischen Untersuchungen verdeutlichten, dass die mittleren Adhäsionskräfte

von N315 auf den untersuchten ZVK-Typen I-III keinen signifikanten Unterschied zu den F_{adh} -Werten von HOM 433 zeigten. Für das Isolat N315 ist bekannt, dass es Gene für eine Vielzahl verschiedener Oberflächenadhäsine, wie etwa Protein A, ClfA und -B, oder FnBPA und -B besitzt [158]. Diese werden mehrheitlich in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien exprimiert, wie etwa nach 2,5 h-Wachstumszeit für FnBPB oder 1-2 h für ClfB [26,195,241,298]. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass diese Zellwand-gebundenen Adhäsionsfaktoren der N315-Zellen, die in den hier dargestellten Adhäsionsstudien aus exponentiellen Wachstumsphasen gewonnen wurden, ebenfalls eine Rolle bei der Adhäsion an ZVKs spielen. Es darf davon ausgegangen werden, dass diese Adhäsine auch beim klinischen Isolat HOM 433 eine mehr oder weniger wichtige Rolle spielen. Eine Ganzgenomanalyse von HOM 433 mit anschließender, softwarebasierter Identifizierung von Offenen Leserastern, die für Adhäsionsproteine kodieren, könnte in Zukunft zumindest Gewissheit über die Existenz der entsprechenden Gene in diesem Isolat bringen.

Insgesamt ergänzt die hier ermittelte große Adhäsionsstärke von *S. aureus* auf Polyurethan-basierten ZVKs die Ergebnisse früherer Arbeiten aus semi-quantitativen Adhäsionsassays auf demselben Materialtyp [145,155]. Sie passt auch ins Bild anderer Studien, in denen demonstriert wurde, dass *S. aureus* in der Lage war, an verschiedene ZVK-Kunststoffmaterialien zu binden, darunter, interessanterweise, nicht nur an Polyurethan, sondern auch an (silikonisiertes) Latex und PVC, und dass das Adhäsionsvermögen von *S. aureus* dabei sogar stärker war als bei der klinisch ebenfalls relevanten Spezies *S. epidermidis* [168].

5.2.2 Der bakterielle Annäherungsprozess auf ZVKs und die Ermittlung der *Snap-in*-Kraft

In dieser Arbeit konnten *Snap-in*-Kräfte von *S. aureus* auf unbehandelten oder PBS-behandelten ZVK-Oberflächen im erhöhten pN- bis vereinzelt im nN-Bereich detektiert werden. Sie waren in vergleichbaren Dimensionen wie die *Snap-in*-Kräfte auf hydrophoben Silizium-Oberflächen, wobei die Beträge in dieser Studie etwas geringer ausfielen als die großen Werte für F_{Snap} auf Silizium bei etwa 4,2 nN. Dagegen waren die F_{Snap} -Werte hier weit größer als auf hydrophilen Silizium-Oberflächen (0,06 nN), die eher als unattraktiv für eine *S. aureus*-Adhäsion gelten [172,256,268]. Einzelne *Snap-in*-Kräfte auf den ZVK-Oberflächen waren je nach Position der Bakterionsonde auf dem ZVK größer oder kleiner, ein mögliches Indiz für den Einfluss der heterogenen Oberflächentopografie auf die *Snap-in*-Kraft, ähnlich wie zuvor bei der Adhäsionskraft. Das Auftreten des *Snap-ins* auf den nativen ZVKs als auch auf den PBS-behandelten ZVKs gibt wichtige Einblicke in die Kontaktentstehung zwischen Bakterium und der ZVK-Oberfläche: Durch das Auftreten des *Snap-ins* wird erstmalig evident, dass *S. aureus* mithilfe seiner Oberflächenmakromoleküle, wie den proteinösen Adhäsinen oder Teichonsäuren, dazu

in die Lage versetzt wird, die ZVK-Substratoberfläche zu binden, noch bevor der eigentliche Zellkörper des Bakteriums mit der Oberfläche des ZVKs in Kontakt kommt [259,268]. Diese Art der Anbindung ist vermutlich ähnlich wie bei den *Salivarius*-Streptokokken, die mit ihren Oberflächenfibrillen Substratoberflächen mit verschiedenen Hydrophobizitäten anbinden können, wohingegen Bakterienzellen ohne solche Fibrillen dazu nicht in der Lage sind [276].

Auch die Auswirkungen der HBP-Behandlung der ZVK-Oberflächen auf die *Snap-in*-Kraft von *S. aureus* waren ähnlich deutlich wie bei der Adhäsionskraft. Es zeigte sich eine einschneidende Minimierung der mittleren Werte für F_{Snap} auf den drei HBP-konditionierten ZVK-Typen I-III im Vergleich zu den PBS-behandelten Varianten. Auffällig war dabei nicht nur die Minimierung der Kraft, sondern auch das oft komplette Ausbleiben des *Snap-in*-Events. Diese Beobachtung ist ein starkes Argument dafür, dass die Zellwand-gebundenen Adhäsine von *S. aureus* den durch das HBP-Coating hervorgerufenen Ladungswiderstand nicht überwinden konnten und es der Aufdrückkraft des AFMs bedurfte, um eine Adhäsion einzuleiten. Es ist zu vermuten, dass es sich bei dieser Form der Adhäsion zwischen Bakterium und HBP-beschichtetem ZVK um eine reversible, „floating adhesion“ (engl. für „schwebende Adhäsion“) im Gegensatz zu einer festen, „tether-coupled adhesion“ (engl. für „über Anbindungen verankerte Adhäsion“) handelt [276]. Dabei verbliebe das Bakterium in der Brownschen Teilchenbewegung, da die makromolekularen Adhäsine die repulsive Energiebarriere der HBP-beschichteten ZVK-Oberfläche nicht durchbrechen können. Möglicherweise machen die sehr seltenen *Snap-in*-Events auf HBP-beschichteten ZVKs die bakterielle Annäherung dann zu einem stochastischen Prozess, bei dem die Zelle über viele Anbindungsversuche die richtige Adhäsionsstelle auf der HBP-Schicht des ZVKs findet.

5.3 Der Einfluss von HBP und ausgewählten HBP-Proteinen auf die Adhäsion von *S. aureus* auf ZVKs

5.3.1 Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf HBP-beschichteten ZVKs

Sobald ein Medizinprodukt, wie der ZVK, in die Blutbahn inseriert wird, erfährt es innerhalb von wenigen Sekunden eine Überschichtung der Oberfläche mit Blutplasmakomponenten [17]. Einen Konsens darüber, inwiefern diese Komponenten die Adhäsion von *S. aureus* beeinflussen, d.h., ob negativ oder positiv, gibt es bisher jedoch nicht [52,138,155,279]. In dieser Arbeit konnte der Einfluss adsorbierter Blutplasmakomponenten auf Polyurethan-basierten ZVKs hinsichtlich der bakteriellen Adhäsionskraft von *S. aureus* quantifiziert werden. Adsorbierte Blutplasmakomponenten führten zu einer starken Reduzierung der Haftkraft des Bakteriums auf der ZVK-Oberfläche. Diese Erkenntnisse spiegeln die Ergebnisse vergangener Arbeiten wider, die einen negativen Effekt von Blutplasma oder -

serum auf die Adhäsion von *S. aureus* auf Polymeroberflächen beschrieben [120,155,213]. Von Neuheit allerdings ist hier (i) die Bestimmung der Adhäsionskräfte F_{adh} und (ii) die Entdeckung, dass F_{adh} auf den HBP-beschichteten ZVKs um ein Vielfaches (≥ 10 mal) kleiner war als auf PBS-vorbehandelten ZVKs. Es ist davon auszugehen, dass die adsorbierten Blutplasma-Proteine die hochaffinen Bindungsstellen der ZVK-Oberfläche zur Anhaftung von bakteriellen Adhäsionsfaktoren belegen, und selbst keine attraktiven Interaktionspartner für die Adhäsionsfaktoren darstellen. Vermutlich werden dabei hydrophobe Bindestellen verdeckt, da diese für nN-große Adhäsionskräfte von *S. aureus* verantwortlich sind [172,253,268]. Die Adhäsionskräfte auf den HBP-beschichteten ZVKs könnten dann von der Verfügbarkeit von Rezeptor-Liganden-Interaktionen, wie etwa zwischen Clfs bzw. FnBPs und Hfg abhängig sein. Eine mögliche physikalische Erklärung für die minimierten Adhäsionskräfte auf den HBP-beschichteten ZVKs liefert die reduzierte Oberflächenhydrophobizität der ZVK-Oberfläche nach einer Behandlung mit HBP, da *S. aureus* bekannterweise eine reduzierte Adhäsionsstärke auf hydrophilen Oberflächen besitzt [253,267]. Einzelne Blutplasma-Proteine konnten in anderen Studien die Hydrophobizität von Oberflächen verringern, indem sie mit hydrophoben Aminosäuren an die Oberfläche banden und polare Aminosäuren nach Außen exponierten [143,156]. Im Grunde vergrößert sich auf solchen hydrophilen Oberflächen die Potenzialbarriere H im Vergleich zu hydrophoben Oberflächen. Es ist zu vermuten, dass eine HBP-Beschichtung das Oberflächenpotenzial des ZVKs und dadurch die Potenzialbarriere H ebenfalls erhöht, die so groß wird, dass das Bakterium sie im Vergleich zum unbeschichteten ZVK bei der Anhaftung an die Oberfläche nicht überwinden kann, selbst wenn das Bakterium für eine gewisse kurze Zeit mit der Oberfläche in Kontakt steht. Dies steht im Einklang mit Experimenten, die zeigten, dass durch chemische Modifikation entstandene hydrophile ZVK-Oberflächen eine Reduzierung von adhärenenten Bakterien bewirkten [47,137,251]. Weiterhin kann eine potenziell negativ-geladene ZVK-Oberfläche zu einer elektrostatischen Repulsion von *S. aureus*, dessen Zelloberfläche auch mit einer negativen Nettoladung versehen ist, führen, ähnlich wie in Gegenwart von anionischen Sulfonat-Gruppen auf Polyurethan-Polymeren, die häufig einfache Ablöseereignisse von zuvor adhärenenten *S. aureus*-Zellen verursachten [70]. Vermutlich könnte eine Vergrößerung (i) der Aufdrückkraft, mit der das Bakterium in AFM-Messungen auf die ZVK-Oberfläche gepresst wird, oder (ii) der Oberflächenkontaktzeit zwischen Bakterium und ZVK die Adhäsionskräfte auf dem HBP-beschichteten ZVK durchaus gewichtig beeinflussen. Eine Vergrößerung der Oberflächenkontaktzeit zwischen Bakterium und Substrat könnte zu einer registrierbaren Erhöhung der Adhäsionskraft von *S. aureus* auf HBP-behandelten ZVK führen, ähnlich wie sie auf hydrophilen Silizium-Oberflächen mit dieser Bakterienart beobachtet wurde [172]. Würde man in der Einzelzell-Kraftspektroskopie Rückzugskurven mit stark-spezifischen Interaktionen produzieren, wäre das ein wichtiger Hinweis darauf, dass nach Penetration der Potenzialbarriere spezifische Liganden-Interaktion mit adsorbierten HBP-Bestandteilen wie Fibrinogen oder dem von-Willebrand-Faktor, für die *S. aureus* ja spezifische Interaktionspartner exprimiert, ausgebildet wurden.

5.3.2 HSA und HFg und ihre Bedeutung für die Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf ZVKs

Die Beobachtung, dass es nach einer Oberflächenbeschichtung der ZVKs mit HBP zu einer drastischen Abnahme der Adhäsionskräfte von *S. aureus* kam, führte zu weiteren Adhäsionsexperimenten, die sich mit dem Ablösevorgang des Bakteriums von der ZVK-Oberfläche in Gegenwart von HSA oder HFg beschäftigten. Anhand von Vorarbeiten des IMMH konnte bereits gezeigt werden, dass sich in Proteinextrakten, die sich mithilfe von Natriumdodecylsulfat von HPB-behandelten ZVK gewinnen ließen, ein Protein mit ~ 60 kDa-Größe in großer Zahl identifiziert werden konnte, bei dem es sich vermutlich um HSA handelte (Masterarbeit Willeit, 2018). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass HSA-Proteinkonzentrationen in Höhe von 400 µg/ml schon zu einer starken Reduzierung der Adhäsionskraft von *S. aureus* auf verschiedenen Stellen von ZVK-Typ II führten, woraus abzulesen war, dass die ZVK-Oberfläche bereits bei dieser niedrigen Proteinkonzentrationen ausreichend breit mit HSA beschichtet worden war. Untersuchungen mit dem verwandten Albumin-Protein aus Rind (BSA) auf anderen Oberflächen zeigten bereits, dass bei geringen BSA-Konzentrationen (≤ 1 mg/ml) Mica-Oberflächen einlagig und bei höherer Konzentration (~ 5 mg/ml) mehrlagig mit dem Protein gesättigt worden waren [1,252]. Es konnte in dieser Arbeit quantitativ demonstriert werden, dass HSA die Adhäsion von *S. aureus* auf dem HSA-beschichteten ZVK im Durchschnitt auf ≤ 200 pN reduziert. Die Werte für F_{adh} auf HSA-behandeltem ZVK waren zu den meisten Werten auf HBP-behandeltem ZVK vergleichbar, was stark darauf hindeutet, dass HSA für die F_{adh} -reduzierende Eigenschaften für *S. aureus* auf dem HBP-beschichteten ZVK verantwortlich war. Dieses Bild passt zu den Erkenntnissen von Dickinson *et al.* [70], wonach Albumin in Zellanzahl-quantifizierenden Adhäsions-Assays die bleibende Anhaftung von *S. aureus* auf Polyurethan verringert hatte, und auch zu einer anderen Forschungsarbeit, in der unter Verwendung einer physiologischen Konzentration von Albumin eine zehnfache Reduzierung der Adhäsion von *S. aureus* auf Silikonkathetern beobachtet wurde [83]. Diese Erkenntnisse untermauern die Vorschläge von anderen Kollegen, Albumin als ein anti-adhäsives Coating gegen bakterielle Krankheitserreger umfangreich zu testen [146,176,235].

Interessanterweise zeigte sich eine ähnliche Reduzierung der F_{adh} -Werte auf dem ZVK auch nach einer Behandlung des Substrats mit HFg. Diese HFg-vermittelte Minimierung der Adhäsionskräfte im Vergleich zu unbeschichtetem ZVK ist auf den ersten Blick verwunderlich, da *S. aureus* mit den Clfs und Fnbps Adhäsine exprimiert, die eine spezifische Bindung zu HFg vermitteln [196,291], und da Zellzahl-quantifizierende Adhäsionsassays aus früheren Arbeiten einen positiven Effekt von HFg auf die Adhäsion von *S. aureus* auf implantierbaren Materialien demonstriert hatten [83,123,127]. Solche Assays, in denen Oberflächen in bakterielle Lösungen eingetaucht wurden, oder umgekehrt, Bakterienlösungen auf Oberflächen gegeben wurden, um schließlich die Anzahl adhärenter Bakterien

zu bestimmen, lassen allerdings eine Bewertung von Adhäsionskräften nicht zu. Während in Zellzahl-quantifizierenden Adhäsions-Assays die spezifische Adhäsion an HFg meist erst nach einer Vorbehandlung der Substratoberfläche mit BSA (zur Reduzierung der unspezifischen Zelladsorption) getestet wird [159], ermöglichten die hier gezeigten AFM-Experimente erstmalig die Quantifizierung der tatsächlichen bakteriellen Adhäsionskräfte auf ZVKs in Gegenwart von HFg. Die ermittelten Adhäsionskräfte lieferten interessante Entdeckungen auf der individuellen Zellebene, dass auf der einen Seite (i) eine unspezifische bakterielle Adhäsion an PBS-behandelte ZVKs höhere Adhäsionskräfte verursacht als die HFg-vermittelte spezifische Adhäsion, aber dass auf der anderen Seite (ii) substratgebundenes HFg häufiger stärkere Interaktionen zwischen dem individuellen Bakterium und dem ZVK aufweist als HSA, in dessen Gegenwart nur selten ausgeprägte Adhäsionsereignisse auf der ZVK-Oberfläche zu beobachten waren. Die stärkeren spezifischen Interaktionen zwischen HFg und *S. aureus* sind vermutlich auf die zahlreichen Fg-bindenden Adhäsine zurückzuführen, während solche Bindungen zwischen HSA und Adhäsinen nicht oder nur im begrenzten Umfang möglich sind. In einem nächsten Schritt sollte die Adhäsionsstärke von *S. aureus*-Stämmen mit einer fehlenden Fg-Bindungsaktivität beurteilt werden, und ob dabei eine weitere Reduzierung der Adhäsionskräfte auf Fg-beschichtetem ZVK erfolgt. Dafür eignet sich beispielsweise *S. aureus*-Newman $\Delta clfAB$, welches nur zu einer schwachen Adhäsion auf Fg-beschichteten Substratoberflächen in Zellzahl-quantifizierenden Adhäsionsassays fähig ist [90]. Diese Mutante eignet sich ebenfalls zur Beurteilung der Adhäsionsstärke auf nativen ZVK-Oberflächen, genauso wie *S. aureus* $\Delta srtA$, die keine Sortase A produziert, die die kovalente Verbindung der adhäsiven MSCRAMMs in die Zellwand katalysiert, und *S. aureus* $\Delta tagO$, einem Stamm mit einem Defekt in der Synthese von Wandteichonsäuren. Diese beiden Mutanten führten bereits zu einer Reduzierung der Adhäsionsstärke von *S. aureus* auf hydrophoben Silizium-Oberflächen [259].

Eine in Hinblick auf die *in vivo*-Situation relevante Limitierung dieser AFM-basierten Untersuchungen ist allerdings, dass die Bestimmung der zellindividuellen Adhäsionsstärke der Bakterien unter Ausschluss von Scherkräften stattfand. Im Gefäßsystem auftretende Flüsse üben auf die ZVK-adhärenenten Bakterien einen mechanischen Stress aus, auf den die Bakterien mit einer mechanisch-induzierten, spezifischen Adhäsion zu humanen Wirtsligandenproteinen reagieren können. Eine außergewöhnliche Eigenschaft von verschiedenen bakteriellen Adhäsinen ist dabei das Umschalten von Slip-Bonds zu Catch-Bonds bei erhöhten Zugkräften, wobei die Dissoziationslebensdauer dieser Bindung mit der auf sie ausgeübten Kraft bis zu einer maximalen Interaktionskraft gesteigert wird [184,199,271]. Man spricht auch von einer Kraft-induzierten Adhäsion. Das AFM ermöglicht es, die Zugkraft auf den AFM-Federbalken während der Rückwärtsbewegung [Zugkraft (pN/s) = Federkonstante (pN/nm) * Geschwindigkeit (nm/s)] schrittweise zu erhöhen [122,183,285]. Zukünftige Untersuchungen sollten daher die Existenz von Catch-Bonds zwischen *S. aureus* und HFg-beschichteten ZVKs beleuchten. Da die Zugkraft in dieser Arbeit zwischen *S. aureus* und allen Oberflächenbedingungen des ZVKs konstant bei ~ 12.500 pN/s gehalten wurde, entspricht dies einem

eher geringen mechanischen Stress für das Bakterium, während ein höherer mechanischer Stress bei Zugkräften ab > 35.000 pN/s zu erwarten ist [122,285].

5.3.3 Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf explantierten Katheteroberflächen

Flussbedingungen im Blut sowie die Verweildauer von Implantaten im Körper beeinflussen die Zusammensetzung der Proteinbeschichtungen, die sich auf ihnen bilden, markant und können u.a. eine Konformationsänderung der bereits adsorbierten Proteine auslösen [17,104]. Dieses gilt im Besonderen auch für ZVKs, die dem Blutplasma gegenüber exponiert werden. Die Adhäsionskräfte von *S. aureus* auf den explantierten ZVK-Substratoberflächen resultierten im Vergleich zu den nicht-behandelten oder PBS-behandelten ZVKs in einer klaren Verringerung der F_{adh} -Werte, ähnlich wie sie auf den ZVK-Fragmenten nach einer HBP-Vorbehandlung *in vitro* beobachtet worden waren. Dies deutet darauf hin, dass der explantierte ZVK ähnliche Adhäsionseigenschaften für *S. aureus* aufwies wie HBP-behandelte ZVKs. Die unter dynamischen Bedingungen in der menschlichen Vene adsorbierten Blutplasmaproteine auf dem explantierten ZVK waren vermutlich verantwortlich für den negativen Effekt auf die Adhäsionskraft, und reduzierten diese auf eine ähnliche Weise wie entsprechende Blutplasmakomponenten, die unter statischen Inkubationsbedingungen an die ZVK-Oberfläche adsorbiert wurden. Allerdings fanden sich unter den vielen hier beobachteten niedrigen Adhäsionskräften gelegentlich auch erhöhte Adhäsionskräfte, die bis in den geringen, einstelligen nN-Bereich hineinreichten. Eine der Ursachen für diese gelegentlich starken Interaktionskräfte könnte sein, dass unter Fluss adsorbierte Proteine eine Konformation eingenommen haben, wie etwa elongierte Fasern des von-Willebrand-Faktors, die von *S. aureus*-Adhäsinen, wie dem vWbp, nur in dieser Konformation gebunden werden können, und dieses Adhäsionsevent daher bevorzugt auf explantiertem ZVKs aber nicht auf *in vitro*-behandelten ZVKs erfolgt [54,210]. Des Weiteren ist es möglich, dass einzelne oder im Extremfall auch fragmentierte Ligandenproteine als Ankerstrukturen für *S. aureus* auf dem explantierten ZVK fungieren, wie etwa geringe Konzentrationen von Fibronectin, die auf explantierten Kathetern bereits gefunden werden konnten [281]. Auch ist es denkbar, dass aufgrund der mechanischen Belastung des ZVKs bei der Behandlung von Patienten Unregelmäßigkeiten, Brüche und Risse auf dem ZVK, wie sie bereits in elektronenmikroskopischen Studien beschrieben wurden, entstehen, die die Kontaktfläche für das adhärierende Bakterium erhöhen und es dadurch zu lokal erhöhten Adhäsionskräften kommt [155].

5.3.4 Dekoration der Bakterienzelloberfläche mit HBP und Auswirkungen auf die Adhäsionskraft

Zwei wichtige Eigenschaften bei einer hämatogenen Ausbreitung des Bakteriums von entfernt liegenden Infektionsherden und einer dadurch entstehenden Adhäsion an den ZVK sind (i) das Einwirken von adsorbierenden humanen Blutplasmafaktoren auf die Zelloberfläche von *S. aureus* und (ii) die Adhäsion des Bakteriums an Blutzellen wie die Thrombozyten, über die sich *S. aureus* ebenfalls an den ZVK anlagern kann. Interessanterweise resultiert die Dekoration der Bakterienoberfläche mit HBP in einer weiteren Minimierung der Adhäsionskräfte auf HBP-behandelten ZVK-Oberflächen im Vergleich zu unbehandelten Bakterienzellen. Es ist wahrscheinlich, dass die bakteriellen Oberflächenadhäsine, wie die ClfAs oder die FnbpAs, durch gelöste Proteine aus dem HBP, wie etwa Fg, gebunden werden [291], wodurch die Adhäsine für eine Interaktion mit immobilisiertem Fg nicht mehr zur Verfügung stünden. Dieser Befund lässt vermuten, dass disseminierte Bakterien im Blut unter zumindest statischen Bedingungen ein nur sehr schwaches Adhäsionsvermögen auf ZVKs besitzen, sobald diese im Blutgefäß verweilen. Solch eine Situation könnte entstehen, wenn das Bakterium lokal vor Scherkräften geschützt ist. Was im Rahmen dieser Arbeit noch nicht untersucht werden konnte, ist der Einfluss von ZVK-adhärenenten Thrombozyten (Plättchen) auf die bakteriellen Adhäsionskräfte des Bakteriums an den ZVK. Weiterführende AFM-Studien könnten hierzu plättchenreiches Blutplasma zur Behandlung der ZVK-Oberflächen verwenden.

5.4 Zusammenfassende Diskussion zur bakteriellen Adhäsionsstärke von *S. aureus* an unbeschichtete und biokonditionierte ZVKs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die AFM-basierte Einzelzellspektroskopie mit *S. aureus* auf authentischen ZVK-Oberflächen durchgeführt und die bakterielle Adhäsionsstärke auf diesem Implantat-Typ bestimmt. Es wurden starke Adhäsionskräfte und hohe Adhäsionsenergien zwischen *S. aureus* und den unbeschichteten nativen ZVK-Oberflächen detektiert. In Relation hohe Werte wurden auch für die *Snap-in*-Kräfte ermittelt, die vermutlich durch das spontane Anbinden von zellwandgebundenen Adhäsionsfaktoren des Bakteriums an die Oberfläche während einer Annäherung des Bakteriums zum ZVK entstehen. Diese Beobachtungen liefern starke Indizien für eine hohe Attraktivität von *S. aureus* für ZVK-Oberflächen. Die *in vitro*-vermittelte Adsorption von humanem Blutplasmakomponenten auf dem ZVK reduzierte die unspezifischen bakteriellen Adhäsionskräfte und markierte einen Übergang zu schwachen Interaktionen oder spezifischen Adhäsionsevents. Der Vergleich mit explantierten, nicht-infektiösen Kathetern zeigte einen erstaunlich ähnlichen Effekt mit ebenfalls geringen Adhäsionskräften, was darauf hindeutet, dass die Adhäsionseigenschaften des *in*

vivo-beschichteten ZVKs ähnlich sind wie jene des *in vitro*-HBP-behandelten ZVKs. Experimente mit einzelnen Blutplasmakomponenten, wie zunächst mit HSA, lieferten die niedrigsten Werte für die Adhäsionskräfte. Diese Beobachtung zeigte auf, dass die bakterielle Adhäsion von *S. aureus* an den ZVK durch wirtseigene Faktoren in HBP verringert werden kann. Sinnvoll wären daher zusätzlich durchführbare Adhäsionsstudien mit weiteren CRBSI-assoziierten Krankenhauskeimen und HSA als Testkandidat für eine anti-adhäsive Beschichtung von Implantaten. Im Vergleich zu HSA- zeigten HFg-beschichtete ZVK-Oberflächen eine stärkere Interaktion mit den Bakteriensonden, wobei die Adhäsionskräfte im Vergleich zu unbeschichteten oder PBS-behandelten ZVK-Oberflächen reduziert wurden. Dadurch lässt sich spekulieren, dass die Adhäsion von *S. aureus* an den HFg-beschichteten ZVK nicht unbedingt von der Höhe der Adhäsionskraft abhängt, sondern von der Verfügbarkeit der passenden Wirtsliganden, wie etwa Fg oder Fn, und der passenden bakteriellen Adhäsine, wie etwa Fnbp oder Clfs. Überraschenderweise bewirkte eine Beschichtung der Bakterienzelle mit HBP eine weitere Reduzierung der Adhäsionskraft von *S. aureus* auf HBP-beschichtetem ZVK, was ein Hinweis dafür sein kann, dass die zellwandgebundenen Adhäsine von *S. aureus* durch gelöste HBP-Komponenten bedeckt wurden und für eine Adhäsion an potenzielle oberflächengebundene Liganden nicht mehr zur Verfügung standen.

5.5 Die Adhäsionsstärke von *S. aureus* auf Endothelzellen

Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass die Überlebensfähigkeit von *S. aureus* DSM20231 in eukaryonten Zellen stark abhängig vom Hitzeschockprotein ClpC ist [87]. Da die Invasion und Überlebensfähigkeit von *S. aureus* in eukaryonten Zellen vermutlich auch über die Anzahl adhärenter Bakterien beeinflusst wird, sollte im Rahmen dieser Dissertation das Adhäsionsverhalten von *S. aureus* DSM20231 und dessen isogener *clpC*- Mutante per Einzelzellkraftspektroskopie untersucht werden. Hierzu wurden in dieser Arbeit die Adhäsionskräfte und Abreißlängen von Stationäre-Phase-Bakterienzellen erstmalig auf der Endothelzelllinie Ea.hy926 ermittelt. Die hier ermittelten Werte waren vergleichbar für beide *S. aureus*-Stämme, was auf eine ausgeglichene Adhäsionsstärke auf Endothelzellen hindeutet. Anhand von Kraft-Distanz-Kurven konnte verbildlicht werden, dass beide bakteriellen Stämmen spezifische Interaktionen mit Bindepnartnern auf den Ea.hy926-Zellen ausüben konnten und dabei vermutlich langanhaltende Bindungen mit der Endothelzellmembran (engl. *Membran Tetherings*) eingingen bzw. mit hochmolekularen Komponenten der extrazellulären Matrix der Endothelzellen interagierten. Aus diesen Befunden lässt sich folgern, dass beide Bakterienstämme eine ähnliche sowie spezifische Adhäsionsstärke auf Ea.hy926-Zellen besaßen und, dass das jene Hitzeschockprotein ClpC keine bemerkenswerte Funktion in diesem initialen Prozess der bakteriellen Besiedlung von Endothelzellen einnimmt. Die hier bestimmten Adhäsionskräfte und Abreißlängen sind zudem vergleichbar mit den quantifizierten Daten von *S. aureus* Newman auf Endothelzellen der menschlichen Nabelvene, sogenannte HUVEC (engl. human umbilical vein endothelial cells) [285], was darauf schließen lässt, dass primäre Endothelzellen (HUVECs) sich in Hinblick auf die Interaktion zu Bakterien sehr ähnlich verhalten wie Endothelzellen einer etablierten Zellkultur (Ea.hy926). Diese Beobachtung ist nicht zuletzt insofern bemerkenswert, da für die Interaktion von *S. aureus* mit Keratinozyten in Hinblick auf Adhäsion und Internalisierung zum Teil deutliche Unterschiede zwischen primären Zellen und den Zellen einer etablierten Zelllinie beobachtet werden konnten [33]. Des Weiteren konnte mit diesen Versuchen der Nachweis geliefert werden, dass mit dem am IMMH zur Verfügung stehenden AFM-Setup auch Kraft-Distanz-Messungen auf eukaryonten Zellen möglich sind.

5.6 Die Adhäsionsstärke des opportunistischen Hefepilzes *C. albicans* auf Zahnschmelzprüfkörpern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Adhäsionsstärke von individuellen *C. albicans*-Zellen auf Rinderzahnschmelzprüfkörpern, die als Modells substrat für den menschlichen Zahnschmelz dienen, ermittelt. Dabei wurde die Adhäsionsstärke von *C. albicans*-Hefestadien auf der unbehandelten Zahnschmelzoberfläche oder nach Pellikelbildung auf dem Enamel quantifiziert. Darüber hinaus wurden auch die Zellen u.a. in einer Speichellösung vorbehandelt, um den Effekt einer Speicheldekoration der *C. albicans*-Zelle auf die Adhäsionsparameter zu untersuchen. Da sich bei der Adhäsion von *C. albicans* auf Zahnschmelz, interessanterweise, keine *Snap-in*-Events wie bei *S. aureus* auf ZVKs beobachten ließen, konzentrierten sich die Auswertungen hier auf die Quantifizierung der Adhäsionskräfte, -energien und der Abreißlängen.

5.6.1 Die Adhäsionsstärke von unbehandelten *C. albicans*-Zellen auf Zahnschmelzprüfkörpern und der Einfluss von Pellikel

In der Mundhöhle sind Zahnoberflächen dem Speichelfluss und der Adsorption von Speichelproteinen ausgesetzt, wobei es innerhalb von Sekunden bis Minuten nach der Zahnreinigung zu einer Biokonditionierung der Zahnoberfläche durch Speichelkomponenten und zur Ausbildung eines initialen Pellikels kommt [273]. Um der Realität möglichst nahe kommende Rahmenbedingungen zu schaffen, wurden die Adhäsionskräfte von einzelnen *C. albicans*-Zellen auf Rinderzahnschmelzprüfkörpern mit oder ohne einem Pellikel bestimmt. Diese Untersuchungen brachten für native Zahnschmelzprüfkörper F_{adh} -Werte im geringen nN-Bereich hervor, die in ihrer Größenordnung mit F_{adh} -Werten desselben *C. albicans*-Morphotyps auf hydrophoben und hydrophilen Dodecylphosphat-Oberflächen oder nanostrukturiertem Gold vergleichbar waren [64,219]. Darüber hinaus war die Adhäsionsstärke von unbehandelten *C. albicans*-Zellen auf *in vitro*-beschichtetem Enamel und auf den Pellikeln der *in situ*-getragenen Zahnschmelzprüfkörper ausgeprägter als auf unbehandeltem Zahnschmelz. Die hier erstmalig präsentierten Befunde, dass die Adhäsionsenergien auf *in vitro*-beschichtetem Enamel in sehr ähnlicher Weise auch auf *ex situ*-Zahnschmelz beobachtet werden konnten, lassen vermuten, dass die Speicheladsorption an Zahnschmelz *in vitro* auf ähnliche Weise erfolgt wie *in situ* bzw. dass sie sich zumindest auf die Adhäsionsstärke von *C. albicans* gleich auswirkt. Ähnlich zu anderen Keimen, wie auch *S. aureus*, sind zellwandgebundene Adhäsionsfaktoren [67,135] die primären Vermittler der Adhäsion von Hefezellen und werden nach ihrer Anbindung an die Oberfläche bei der Ablösung der mikrobiellen Zelle von der Oberfläche in der Regel zunächst gestreckt und entfaltet, bevor es zu ihrer Ablösung vom Untergrund kommt. Eine vor kurzem erschienene AFM-basierte SCFS-Studie

demonstrierte schon die Wichtigkeit solcher Adhäsine für das Adhäsionsverhalten von Hefezellen der *Candida*-Spezies *C. glabrata* auf Substratoberflächen wie PDMS oder Polythiourethan [147]. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Adhäsionskräfte von *C. albicans* auf unbehandeltem und speichelbehandeltem Zahnschmelz zeigten zudem eine signifikante Erhöhung der F_{adh} -Werte mit einer steigenden Oberflächenkontaktzeit. Diese Beobachtungen sind in Einklang mit früheren Befunden für diese Hefeart auf hydrophilen oder hydrophobisierten Glasoberflächen [219], bei Zell-zu-Zell-Interaktionen mit Makrophagen-Oberflächen [80], oder auf molekularer Ebene beim Adhäsionsverhalten vom *C. albicans*-Protein Als5 auf hydrophoben Substratoberflächen [10]. Sowohl bei der Adhäsion an unbehandelten als auch an speichelbehandelten Enamel ist es wahrscheinlich, dass makromolekulare Adhäsionsfaktoren, wie die Als-Proteine, sowohl für die Adhäsion von *C. albicans* an das native Material als auch an proteinöse Oberflächenstrukturen beteiligt waren [9,88,98]. So konnte für das Als-Protein Als1 bereits gezeigt werden, dass es in Koordination mit der Endoglukanase Bgl2 und dem Zellwandprotein Ecm33, eine wichtige Rolle bei der Anhaftung von *C. albicans*-Hefezellen an speichelbehandelten Zahnschmelz-Modellsubstraten, wie Hydroxylapatit (HAP), der Mineralkomponente des Zahnschmelzes, spielt [266]. In Vorläuferstudien durchgeführte Zellzahlbestimmende Adhäsionsassays zeigten zudem, dass Hefezellen in höherer Anzahl an Speichelbehandelte als an unbehandelte HAP-Oberflächen binden konnten [41,266]. Potenzielle Liganden für *C. albicans* im Speichel-Pellikel sind basische prolinreiche Proteine (bPRPs) wie IB-6, das Calciumbindende Protein Statherin und Bpifa2 [129,205,272]. Die Adhäsionsstärke der Hefezellen zeigten dabei überraschenderweise größere Variationen auf den Pellikeln auf, was möglicherweise dem Umstand geschuldet ist, dass die beprobten Areale auf dem Zahnschmelz eine unterschiedliche Dichte an Speichelliganden aufwiesen, die für die Adhäsion mit *C. albicans* zur Verfügung standen. Interessanterweise konnten solche größeren Variationen in der Adhäsionsstärke auch schon für speichelbehandelte Bakterienzellen der Art *Streptococcus mutans* auf unbeschichtetem HAP beobachtet werden [254]. Die Befunde lassen vermuten, dass die Adhäsion von unbehandelten *C. albicans*-Zellen an unbeschichteten Zahnschmelz eher über unspezifische Interaktionen und einer simultanen Bindung von Adhäsinen verläuft, die zu einer eher geringen Variation in der Adhäsionsstärke führen, während bei der Interaktion mit dem Speichelpellikel, abhängig von der Verfügbarkeit der Liganden im Speichelpellikel, mit einer größeren Variation in der Anzahl gebundener Adhäsine zu rechnen ist [112,135,205]. Dieses Szenario ist auch in Einklang mit der gelegentlich in dieser Arbeit beobachteten starken Vergrößerung der Abreißlänge auf einigen Arealen des Speichelbehandelten Zahnschmelzes, bei der vermutlich schwach-gebundene Speichelproteine mit der Hefeoberfläche in Kontakt kamen. Eine abschließende Beurteilung des Effekts vom Pellikel auf die Adhäsionsfähigkeit von *C. albicans* an Zahnoberflächen anhand der hier präsentierten Beobachtungen sollte jedoch noch nicht durchgeführt werden, da initiale Pellikel sich in ihrer Proteinzusammensetzung zwischen Individuen markant voneinander unterscheiden können [272], und jedes individuelle Pellikel eine eigene Anzahl an adhäsiven Bindepartnern für Hefezellen beherbergen könnte. Hinweise darauf, dass Unterschiede in der

Zusammensetzung von Pellikel einen relevanten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten haben könnten, werden u.a. durch eine Studie von Samaranyake und Kollegen gegeben, in der in Zellzahlbestimmenden Adhäsionsassays ein reduziertes Adhäsionsvermögen von *C. albicans* auf Acrylharz-Zahnimplantanten mit maturierten 18 h-Pellikel im Vergleich zur PBS-Kontrolle demonstriert wurde [239]. Um einen eindeutigen Bezug zwischen der SCFS und jenen zellquantitativen Adhäsionsversuchen herzustellen, sollten zukünftige SCFS-Studien auch Adhäsionskräfte auf maturierten, 18 h-Pellikeln des Zahnschmelzes mit einbeziehen. Auch sollten weiterführende SCFS-Studien mit *C. albicans*-Deletionsmutanten durchgeführt werden, denen einzelne oder mehrere relevante Adhäsionsfaktoren fehlen. Alternativ könnten auch größere Gruppen von Zellwandgebundenen Adhäsionsfaktoren entfernt werden, wie etwa durch die Proteinase Trypsin und Proteinase K, oder es könnte Einfluss auf ihre Integrität und Mannosylierung genommen werden, wie etwa durch α -Mannosidase und durch Periodate, wodurch das Adhäsionsvermögen der Zelle auch dramatisch gesenkt werden könnte. Dadurch wäre es möglich, beteiligte Adhäsine und dominierende Adhäsionsmechanismen hinter den starken Adhäsionskräften von *C. albicans* auf Speichelbeschichtetem Zahnschmelz zu entschlüsseln.

5.6.2 Der Effekt einer Speicheldekoration der Zelloberfläche auf die Adhäsionsstärke von *C. albicans* auf Zahnschmelzprüfkörpern

Ähnlich wie die Zahnschmelzoberfläche *in vivo* mit dem Speichelpellikel beschichtet wird, stehen *C. albicans*-Zellen, die in der oralen Kavität zirkulieren, durchgehend mit gelösten Speichelkomponenten in Kontakt. Nach einer Speichelbehandlung von *C. albicans*-Hefezellen konnten Adhäsionskräfte auf unbeschichtetem Zahnschmelz im geringen nN-Bereich detektiert werden, die geringer waren als F_{adh} auf Pellikel. Die erhöhten Adhäsionskräfte auf dem Pellikel des Enamel erinnern an die SCFS-Messungen mit *Mutans*-Streptokokken, bei denen sich die Anzahl bindungsfähiger Adhäsionsfaktoren an das Enamel-Modellsubstrat HAP nach einer Behandlung der Bakterienzellen mit Speichelproteinen vergrößerte [254]. Während allerdings in den Experimenten von Spengler *et al.* [254] die Adhäsionskräfte auf diese Weise auf unbehandeltem HAP vergrößert wurden, führte die Speichelbehandlung der Hefezellen auf unbehandeltem Zahnschmelz tendenziell zu einer Verschlechterung der Adhäsion. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die zellwandgebundenen Adhäsionsfaktoren in *C. albicans*, die für die Oberflächenadhäsion an nativen Zahnschmelz wichtig waren, durch die unspezifische Adsorption von Speichelkomponenten an die Zelloberfläche in ihrer Bindungsaktivität inhibiert wurden. Solch ein Effekt würde dazu führen, dass nur wenige freie Adhäsine zur Verfügung stehen, und die adsorbierten Speichelkomponenten selbst nur geringfügig zur Adhäsion beitragen, während bei *S. mutans* die Adhäsionskräfte auf HAP grundsätzlich sehr gering (im erhöhten

dreistelligen pN-Bereich) sind und adsorbierte Speichelkomponenten diese Adhäsionskräfte vermutlich vergrößern können. Überraschend war die starke Adhäsionsfähigkeit der *C. albicans*-Zellen auf den Speichelpellikeln, die für diese Substratoberfläche im Vergleich zu unbehandelten Zellen auch nach Speichelbehandlung erhalten blieb. Diese Adhäsionsstärke wurde auch auf *in-situ*-Pellikeln bestätigt. Dies spricht dafür, dass selbst nach einer Adsorption von Speichelkomponenten an die Zelloberfläche der Hefe, eine vermutlich große Anzahl an freien Adhäsinen für die Anhaftung an den Pellikel existierte. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Unterscheidungsfähigkeit der Adhäsine zwischen gelösten und immobilisierten Speichelproteinen sein, ähnlich wie es für die Bakterienart *Streptococcus gordonii* gezeigt wurde, welche immobilisierte PRPs von gelösten zu unterscheiden vermochte, und die letztere Form nicht band [101,205]. Solche Unterscheidungsfähigkeiten sind allerdings bei anderen Speichelproteinen möglicherweise nicht gegeben, wie etwa bei gelöstem Fibronectin, das auch in Speichel vorzufinden ist [274] und welches an die Zellwand der Hefezelle binden kann und dadurch die Bindefähigkeit der Adhäsine an immobilisierten Fibronectin maßgeblich verringert [149].

Anhand der AFM-Rückzugskurven konnte auf den Pellikeln des Enamel eine qualitative Veränderung des Adhäsionspeaks nach Speichelbehandlung der Hefezellen detektiert werden. Der Adhäsionspeak entspricht der Adhäsionskraft, und die Distanz, bei der diese auftritt, ist von der Länge der zellwandgebundenen Adhäsionsfaktoren abhängig. Bei speichelbehandelten *C. albicans*-Zellen traten die Adhäsionskräfte bei einer größeren Distanz als bei unbehandelten Zellen auf und die Beträge für die Adhäsionskraft waren tendenziell geringer. Dies deutet darauf hin, dass kürzere Adhäsine, die zwar die Adhäsion von unbehandelten Zellen auf Speichelpellikel vermitteln können, nach Adsorption von Speichelkomponenten an ihre Oberflächen diese Bindungsfähigkeit verlieren. Stattdessen würden nur noch längere, möglicherweise spezifische Adhäsionsfaktoren der Hefe die Bindungsfähigkeit an den Pellikel beibehalten. Interessanterweise entspricht die Distanz bei der *C. albicans* seinen Adhäsionspeak auf *in situ*-Pellikeln hatte, der Distanz von Adhäsionspeaks bei Als1-Proteinen, wenn diese in Einzelmolekül-Kraftspektroskopien mithilfe einer funktionalisierten AFM-Messspitze auf der Hefenzellwand gestreckt werden [125]. Als1 spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von *C. albicans* an speichelbeschichtete HAp-Oberflächen [266], daher wäre es sinnvoll in SCFS-Experimenten die Distanz der Adhäsionspeaks von *C. albicans als1 Δ/Δ*-Mutanten auf *in situ*-Pellikel zu untersuchen. Sollte die Vorhersage zutreffen, dass hauptsächlich Als1 die Adhäsion der speichelbehandelten Hefe an Pellikel vermittelt, so könnte eine Deletion von *als1* zu einer starken Abnahme des Adhäsionspeaks und somit der Adhäsionskraft führen.

5.7 Zusammenfassende Diskussion zur Adhäsionsstärke von *C. albicans* auf Zahnschmelz und potenzielle Adhäsionsmechanismen

Die hier durchgeführte Einzelzellkraftspektroskopie mit *C. albicans* auf Zahnschmelz-Prüfkörpern verdeutlichte ein simultanes Anbinden von Adhäsionsfaktoren an die natürliche als auch an die speichelbeschichtete Zahnschmelzoberfläche, wobei die größeren Adhäsionskräfte auf den Speichelpellikeln bestimmt wurden. Es ist möglich, dass die Nanorauigkeit der Zahnschmelzoberfläche, vorrangig auch nach einer Formierung des Pellikels, beim Anbinden der Adhäsine eine Rolle spielt. Zuvor konnte gezeigt werden, dass ein *in situ*-gebildeter Pellikel auf Zahnschmelz globuläre Agglomerate im nm-Bereich aufweist [113]. Eine kürzlich gemachte Entdeckung gibt zudem den Hinweis, dass Goldoberflächen, die mit Nanopartikeln beladen wurden und dadurch die Rauigkeit der Oberfläche erhöhten, die Adhäsionskräfte von *C. albicans* im Vergleich zur unbeladenen Goldoberfläche vergrößern konnten [64]. Die dort bestimmten Rückzugsphasen der Kraft-Distanz-Kurven erinnern dabei stark an die hier dargestellten Rückzugskurven zwischen *C. albicans* und Pellikel-beschichtetem Zahnschmelz, was auf einen ähnlichen Adhäsionsmechanismus hindeuten könnte. Ob diese Nanorauigkeit synergistisch mit spezifischen Interaktionen zwischen Adhäsinen und Speichelliganden die Adhäsionskräfte positiv beeinflussen, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* eine große Adhäsionsstärke (betrachtet wurden nN-Adhäsionskraft und fJ-Adhäsionsenergie) auf dem Zahnschmelz aufweist, wodurch gefolgert werden kann, dass dieser opportunistische Krankheitsreger in seinem Hefestadium ein großes Repertoire an adhäsiven Virulenzfaktoren besitzt, um die Zahnoberfläche zu besiedeln. Dies kann von großer Bedeutung in kariösen Zahnkavitäten sein, in denen der Pilz vor den Scherkräften des Speichelflusses geschützt ist. Es kann gemutmaßt werden, dass diese Kavitäten und der Flusstransport zum Zahn wichtig für die Adhäsion dieser kolonisierenden Spezies sind, da Hefezellen keine *Snap-in*-Events in den Kraft-Distanz-Kurven dieser Arbeit erkennen ließen, und somit nur schwierig eine mögliche Potenzialbarriere zum Zahnschmelz durchbrechen könnten. Speziell auf dem dort vorhandenen Speichelpellikel wird *C. albicans* dann allerdings adsorbierte Speichelliganden für sich nutzen können, um die Adhäsion zu gewährleisten und zu festigen.

5.8 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Adhäsionsstärke der kolonisierenden opportunistischen Erregerarten *S. aureus* und *C. albicans* auf klinisch-relevanten Oberflächen erstmalig charakterisiert werden. Die mit diesen Untersuchungen gewonnenen Daten könnten die Richtung für weiterführende Experimente vorgeben, um zukünftig präventative Maßnahmen gegen eine Besiedlung von abiotischen oder biotischen Oberflächen durch diese potenziellen Krankheitserreger zu ergreifen.

Zum einen hat sich humanes Serumalbumin als ein potenzielles anti-adhäsives Coating für ZVKs erwiesen. Um dieser Rolle jedoch gerecht zu werden, müssen zuerst weitere potenzielle bakterielle Kontaminanten von ZVKs und Auslöser von CRIBSIs mittels Einzelzellkraftspektroskopie untersucht werden. Weitere wichtige Krankheitserreger, die in der Lage sind, Biofilme auf Venenkathetern zu bilden, sind *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* sowie *Escherichia coli* [48,53,103,182,240]. Darüber hinaus sollten die Materialoberflächen von kommerziell vertriebenen ZVKs auf ihre Biostabilität hin untersucht werden. Mechanische Eigenschaften der heute verfügbaren ZVKs sollten vor und nach einer Verweildauer im Blutgefäß analysiert werden und auf Risse, Brüche und artifizielle Poren untersucht werden.

Zur Reduzierung von Kinderkaries könnte ein Pellikel-Management auf Zahnschmelz helfen, die Adhäsionsstärke von *C. albicans* zu minimieren und somit die Präsenz dieses Krankheitserregers in der oralen Kavität zu verringern. Natürliche Polyphenole sind vielversprechende Substanzen in der präventativen Zahnmedizin, die die *in situ*-Biofilmbildung von Bakterien auf Zahnschmelz stark verringern und Gegenstand der aktuellen Forschung sind [299]. Diese Polyphenole könnten gegebenenfalls auch die Adhäsion und Biofilmbildung von *C. albicans* reduzieren. Als weiterführende Experimente sollte zudem die Adhäsionsstärke von *C. albicans* auf Keratinozyten des Zahnfleisches und auf bukkalen Zellen mittels Einzelzell-Kraftspektroskopie bestimmt werden, da das weiche Gewebe der Mundhöhle zum Kolonisierungsspektrum von *C. albicans* gehört und als Krankheitsherd zur Entstehung von Karies durch die Übertragung von Hefezellen auf etwa okklusale Zahnoberflächen fungieren könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Absolom DR, Zingg W, Neumann AW (1987) Protein adsorption to polymer particles: Role of surface properties. *J Biomed Mater Res* 21:161–171
2. Abu-Lail NI, Camesano TA (2003) Role of Lipopolysaccharides in the Adhesion, Retention, and Transport of *Escherichia coli* JM109. *Environ Sci Technol* 37:2173–2183
3. Achkar JM, Fries BC (2010) Candida Infections of the Genitourinary Tract. *Clin Microbiol Rev* 23:253–273
4. Aggarwal V, Bakhshi H, Ecker N, Parvizi J, Gehrke T, Kendoff D (2014) Organism Profile in Periprosthetic Joint Infection: Pathogens Differ at Two Arthroplasty Infection Referral Centers in Europe and in the United States. *J Knee Surg* 27:399–406
5. Agnihotri A, Garrett JT, Runt J, Siedlecki CA (2006) Atomic force microscopy visualization of poly(urethane urea) microphase rearrangements under aqueous environment. *J Biomater Sci Polym Ed* 17:227–238
6. Alam F, Kumar S, Varadarajan KM (2019) Quantification of Adhesion Force of Bacteria on the Surface of Biomaterials: Techniques and Assays. *ACS Biomater Sci Eng* 5:2093–2110
7. Alhussein F, Fürstenberg J, Gaupp R, Eisenbeis J, Last K, Becker SL, Papan C (2020) Human infections caused by *Staphylococcus argenteus* in Germany: genetic characterisation and clinical implications of novel species designation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 39:2461–2465
8. Alonso JL, Goldmann WH (2003) Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. *Life Sci* 72:2553–2560
9. Alsteens D, Dupres V, Klotz SA, Gaur NK, Lipke PN, Dufrêne YF (2009) Unfolding Individual Als5p Adhesion Proteins on Live Cells. *ACS Nano* 3:1677–1682
10. Alsteens D, Beaussart A, Derclaye S, El-Kirat-Chatel S, Park HR, Lipke PN, Dufrêne YF (2013) Single-cell force spectroscopy of Als-mediated fungal adhesion. *Anal Methods* 5:3657
11. An YH, Stuart GW, McDowell SJ, McDaniel SE, Kang Q, Friedman RJ (1996) Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a crosslinked albumin coating in vitro. *J Orthop Res* 14:846–849
12. Anderson NL, Anderson NG (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics MCP* 1:845–867
13. Appelgren P, Ransjö U, Bindslev L, Espersen F, Larm O (1996) Surface heparinization of central venous catheters reduces microbial colonization in vitro and in vivo: results from a prospective, randomized trial. *Crit Care Med* 24:1482–1489
14. Arciola CR, An YH, Campoccia D, Donati ME, Montanaro L (2005) Etiology of Implant Orthopedic Infections: A Survey on 1027 Clinical Isolates. *Int J Artif Organs* 28:1091–1100
15. Ashraf H, Samiee M, Eslami G, Ghodse Hosseini MR (2007) Presence of *Candida Albicans* in Root Canal System of Teeth Requiring Endodontic Retreatment with and without Periapical Lesions. *Iran Endod J* 2:24–28

16. Atela I, Coll P, Rello J, Quintana E, Barrio J, March F, Sanchez F, Barraquer P, Ballus J, Cotura A, Prats G (1997) Serial surveillance cultures of skin and catheter hub specimens from critically ill patients with central venous catheters: molecular epidemiology of infection and implications for clinical management and research. *J Clin Microbiol* 35:1784–1790
17. Baier RE (1977) THE ORGANIZATION OF BLOOD COMPONENTS NEAR INTERFACES. *Ann N Y Acad Sci* 283:17–36
18. Barberi J, Spriano S (2021) Titanium and Protein Adsorption: An Overview of Mechanisms and Effects of Surface Features. *Materials* 14:1590
19. Barbu EM, Mackenzie C, Foster TJ, Höök M (2014) SdrC induces staphylococcal biofilm formation through a homophilic interaction. *Mol Microbiol* 94:172–185
20. Bar-Or Y (1990) The effect of adhesion on survival and growth of microorganisms. *Experientia* 46:823–826
21. Beaussart A, Alsteens D, El-Kirat-Chatel S, Lipke PN, Kucharíková S, Van Dijck P, Dufrêne YF (2012) Single-Molecule Imaging and Functional Analysis of Als Adhesins and Mannans during *Candida albicans* Morphogenesis. *ACS Nano* 6:10950–10964
22. Beaussart A, El-Kirat-Chatel S, Sullan RMA, Alsteens D, Herman P, Derclaye S, Dufrêne YF (2014) Quantifying the forces guiding microbial cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Nat Protoc* 9:1049–1055
23. Bertini G, Elia S, Ceciari F, Dani C (2013) Reduction of catheter-related bloodstream infections in preterm infants by the use of catheters with the AgION antimicrobial system. *Early Hum Dev* 89:21–25
24. Bilge Hakan Şen, Safavi KE, Spångberg LSW (1997) Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol* 42:513–520
25. Binnig G, Quate CF, Gerber Ch (1986) Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* 56:930–933
26. Bjä– Rklind A, Arvidson S (1980) MUTANTS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AFFECTED IN THE REGULATION OF EXOPROTEIN SYNTHESIS. *FEMS Microbiol Lett* 7:203–206
27. Bjornson HS, Colley R, Bower RH, Duty VP, Schwartz-Fulton JT, Fischer JE (1982) Association between microorganism growth at the catheter insertion site and colonization of the catheter in patients receiving total parenteral nutrition. *Surgery* 92:720–727
28. Boudjemaa R, Briandet R, Revest M, Jacqueline C, Caillon J, Fontaine-Aupart M-P, Steenkeste K (2016) New Insight into Daptomycin Bioavailability and Localization in *Staphylococcus aureus* Biofilms by Dynamic Fluorescence Imaging. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4983–4990
29. Bovas BC, Karunamoorthy L, Chuan FB (2018) Effect of extrusion process melt temperature on polyurethane catheter surfaces. *Mater Manuf Process* 33:180–185
30. Braun U, Lorenz E, Weimann C, Sturm H, Karimov I, Ettl J, Meier R, Wohlgemuth WA, Berger H, Wildgruber M (2016) Mechanic and surface properties of central-venous port catheters after removal: A comparison of polyurethane and silicon rubber materials. *J Mech Behav Biomed Mater* 64:281–291
31. Brown S, Santa Maria JP, Walker S (2013) Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 67:313–336

32. Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC (2007) Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthod* 77:331–336
33. Bur S, Preissner KT, Herrmann M, Bischoff M (2013) The Staphylococcus aureus Extracellular Adherence Protein Promotes Bacterial Internalization by Keratinocytes Independent of Fibronectin-Binding Proteins. *J Invest Dermatol* 133:2004–2012
34. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, Handel G, Gosau M (2010) Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater* 6:2307–2313
35. Busscher HJ, van der Mei HC (2006) Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. *Clin Microbiol Rev* 19:127–141
36. Busscher HJ, van der Mei HC (2012) How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathog* 8:e1002440
37. Butt H-J, Cappella B, Kappl M (2005) Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf Sci Rep* 59:1–152
38. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA (2018) The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 16:143–155
39. Calderone RA, Fonzi WA (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9:327–335
40. Caminero A, Calvo E, Valentín E, Ruiz-Herrera J, López JA, Sentandreu R (2014) Identification of *Candida albicans* wall mannoproteins covalently linked by disulphide and/or alkali-sensitive bridges: Covalently linked *Candida albicans* wall mannoproteins. *Yeast* 31:137–144
41. Cannon RD, Nand AK, Jenkinson HF (1995) Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiol Read Engl* 141 (Pt 1):213–219
42. Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ (2018) Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Adv Colloid Interface Sci* 261:1–14
43. Carrer S, Bocchi A, Bortolotti M, Braga N, Gilli G, Candini M, Tartari S (2005) Effect of different sterile barrier precautions and central venous catheter dressing on the skin colonization around the insertion site. *MINERVA Anesthesiol* 71:10
44. Casimero C, Ruddock T, Hegarty C, Barber R, Devine A, Davis J (2020) Minimising Blood Stream Infection: Developing New Materials for Intravascular Catheters. *Med Basel Switz* 7:E49
45. Cavalheiro M, Pereira D, Formosa-Dague C, Leitão C, Pais P, Ndlovu E, Viana R, Pimenta AI, Santos R, Takahashi-Nakaguchi A, Okamoto M, Ola M, Chibana H, Fialho AM, Butler G, Dague E, Teixeira MC (2021) From the first touch to biofilm establishment by the human pathogen *Candida glabrata*: a genome-wide to nanoscale view. *Commun Biol* 4:886
46. Chatterjee I, Becker P, Grundmeier M, Bischoff M, Somerville GA, Peters G, Sinha B, Harraghy N, Proctor RA, Herrmann M (2005) Staphylococcus aureus ClpC is required for stress resistance, aconitase activity, growth recovery, and death. *J Bacteriol* 187:4488–4496
47. Chauhan A, Bernardin A, Mussard W, Kriegel I, Estève M, Ghigo J-M, Beloin C, Semetey V (2014) Preventing Biofilm Formation and Associated Occlusion by Biomimetic Glycocalyxlike Polymer in Central Venous Catheters. *J Infect Dis* 210:1347–1356

48. Chauhan A, Bernardin A, Mussard W, Kriegel I, Estève M, Ghigo J-M, Beloin C, Semetey V (2014) Preventing biofilm formation and associated occlusion by biomimetic glycocalyxlike polymer in central venous catheters. *J Infect Dis* 210:1347–1356
49. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M (2005) Staphylococcus aureus interactions with the endothelium. The role of bacterial “Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost*
50. Chen K-Y, Kuo J-F, Chen C-Y (2000) Synthesis, characterization and platelet adhesion studies of novel ion-containing aliphatic polyurethanes. *Biomaterials* 21:161–171
51. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O (2010) Contribution of Coagulases towards Staphylococcus aureus Disease and Protective Immunity. *PLoS Pathog* 6:e1001036
52. Cheung AL, Fischetti VA (1990) The Role of Fibrinogen in Staphylococcal Adherence to Catheters In Vitro. *J Infect Dis* 161:1177–1186
53. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH (1982) Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces. *Infect Immun* 37:318–326
54. Claes J, Liesenborghs L, Peetermans M, Veloso TR, Missiakas D, Schneewind O, Mancini S, Entenza JM, Hoylaerts MF, Heying R, Verhamme P, Vanassche T (2017) Clumping factor A, von Willebrand factor-binding protein and von Willebrand factor anchor Staphylococcus aureus to the vessel wall. *J Thromb Haemost JTH* 15:1009–1019
55. Cleri DJ, Corrado ML, Seligman SJ (1980) Quantitative Culture of Intravenous Catheters and Other Intravascular Inserts. *J Infect Dis* 141:781–786
56. Cohen N, Sarkar S, Hondroulis E, Sabhachandani P, Konry T (2017) Quantification of intercellular adhesion forces measured by fluid force microscopy. *Talanta* 174:409–413
57. Cole AL, Muthukrishnan G, Chong C, Beavis A, Eade CR, Wood MP, Deichen MG, Cole AM (2016) Host innate inflammatory factors and staphylococcal protein A influence the duration of human Staphylococcus aureus nasal carriage. *Mucosal Immunol* 9:1537–1548
58. Colson J, Andorfer L, Nypelö TE, Lütkeemeier B, Stöckel F, Konnerth J (2017) Comparison of silicon and OH-modified AFM tips for adhesion force analysis on functionalised surfaces and natural polymers. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 529:363–372
59. Cooper GL, Hopkins CC (1985) Rapid diagnosis of intravascular catheter-associated infection by direct Gram staining of catheter segments. *N Engl J Med* 312:1142–1147
60. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711–745
61. Costerton JW (1999) Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284:1318–1322
62. Crawford RJ, Webb HK, Truong VK, Hasan J, Ivanova EP (2012) Surface topographical factors influencing bacterial attachment. *Adv Colloid Interface Sci* 179–182:142–149
63. d’Arcy PF, Woodside W (1973) DRUG ADDITIVES: A POTENTIAL SOURCE OF BACTERIAL CONTAMINATION OF INFUSION FLUIDS. *The Lancet* 302:96

64. Dauben TJ, Dewald C, Firkowska-Boden I, Helbing C, Peisker H, Roth M, Bossert J, Jandt KD (2020) Quantifying the relationship between surfaces' nano-contact point density and adhesion force of *Candida albicans*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 194:111177
65. de Barros PP, Rossoni RD, de Souza CM, Scorzoni L, Fenley JDC, Junqueira JC (2020) *Candida* Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges. *Mycopathologia* 185:415–424
66. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP (2006) Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol* 51:1024–1028
67. de Groot PWJ, Bader O, de Boer AD, Weig M, Chauhan N (2013) Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick. *Eukaryot Cell* 12:470–481
68. Dehullu J, Valotteau C, Herman-Bausier P, Garcia-Sherman M, Mittelviehhaus M, Vorholt JA, Lipke PN, Dufrière YF (2019) Fluidic Force Microscopy Demonstrates That Homophilic Adhesion by *Candida albicans* Als Proteins Is Mediated by Amyloid Bonds between Cells. *Nano Lett* 19:3846–3853
69. De-La-Torre J, Quindós G, Marcos-Arias C, Marichalar-Mendia X, Gainza ML, Eraso E, Acha-Sagredo A, Aguirre-Urizar JM (2018) Oral *Candida* colonization in patients with chronic periodontitis. Is there any relationship? *Rev Iberoam Micol* 35:134–139
70. Dickinson RB, Nagel JA, Proctor RA, Cooper SL (1997) Quantitative comparison of shear-dependent *Staphylococcus aureus* adhesion to three polyurethane ionomer analogs with distinct surface properties. *J Biomed Mater Res* 36:152–162
71. Donohue DS, Ielasi FS, Goossens KVV, Willaert RG (2011) The N-terminal part of Als1 protein from *Candida albicans* specifically binds fucose-containing glycans. *Mol Microbiol* 80:1667–1679
72. Douce RW, Zurita J, Sanchez O, Aldaz PC (2008) Investigation of an Outbreak of Central Venous Catheter–Associated Bloodstream Infection Due to Contaminated Water. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29:364–366
73. Doyle RJ (2000) Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes Infect* 2:391–400
74. Dranginis AM, Rauceo JM, Coronado JE, Lipke PN (2007) A Biochemical Guide to Yeast Adhesins: Glycoproteins for Social and Antisocial Occasions. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:282–294
75. Dufrière YF, Ando T, Garcia R, Alsteens D, Martinez-Martin D, Engel A, Gerber C, Müller DJ (2017) Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat Nanotechnol* 12:295–307
76. Dufrière YF, Persat A (2020) Mechanomicrobiology: how bacteria sense and respond to forces. *Nat Rev Microbiol* 18:227–240
77. Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA (1999) Fibronectin Binding Protein and Host Cell Tyrosine Kinase Are Required for Internalization of *Staphylococcus aureus* by Epithelial Cells. *Infect Immun* 67:4673–4678
78. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:3734–3737

79. Eisenbeis J (2019) Der Einfluss des multifunktionalen extrazellulären Adhäsionsproteins (Eap) von *Staphylococcus aureus* auf die Morphologie und Funktion von eukaryotischen Zellen.
80. El-Kirat-Chatel S, Dufrêne YF (2016) Nanoscale adhesion forces between the fungal pathogen *Candida albicans* and macrophages. *Nanoscale Horiz* 1:69–74
81. Ener B, Douglas LJ (1992) Correlation between cell-surface hydrophobicity of *Candida albicans* and adhesion to buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 99:37–42
82. Entenza J-M, Moreillon P, Senn MM, Kormanec J, Dunman PM, Berger-Bächli B, Projan S, Bischoff M (2005) Role of σ^B in the Expression of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Adhesins ClfA and FnbA and Contribution to Infectivity in a Rat Model of Experimental Endocarditis. *Infect Immun* 73:990–998
83. Espersen F, Wilkinson BJ, Gahrn-Hansen B, Rosdahl VT, Clemmensen I (1990) Attachment of staphylococci to silicone catheters *in vitro*. *APMIS* 98:471–478
84. Fakhrudin KS, Perera Samaranyake L, Egusa H, Chi Ngo H, Panduwawala C, Venkatachalam T, Kumarappan A, Pesee S (2020) *Candida* biome of severe early childhood caries (S-ECC) and its cariogenic virulence traits. *J Oral Microbiol* 12:1724484
85. Falagas ME, Kompoti M (2006) Obesity and infection. *Lancet Infect Dis* 6:438–446
86. Fällman E, Schedin S, Jass J, Andersson M, Uhlin BE, Axner O (2004) Optical tweezers based force measurement system for quantitating binding interactions: system design and application for the study of bacterial adhesion. *Biosens Bioelectron* 19:1429–1437
87. Finke M (2013) Einfluss der HSP100/Clp ATPasen ClpB und ClpC aus *Staphylococcus aureus* auf die Internalisierung und das Langzeitüberleben in eukaryoten Zellen.
88. Finkel JS, Xu W, Huang D, Hill EM, Desai JV, Woolford CA, Nett JE, Taff H, Norice CT, Andes DR, Lanni F, Mitchell AP (2012) Portrait of *Candida albicans* Adherence Regulators. *PLoS Pathog* 8:e1002525
89. Fleury OM, McAleer MA, Feuillie C, Formosa-Dague C, Sansevere E, Bennett DE, Towell AM, McLean WHI, Kezic S, Robinson DA, Fallon PG, Foster TJ, Dufrêne YF, Irvine AD, Geoghegan JA (2017) Clumping Factor B Promotes Adherence of *Staphylococcus aureus* to Corneocytes in Atopic Dermatitis. *Infect Immun* 85:e00994-16
90. Flick MJ, Du X, Prasad JM, Raghu H, Palumbo JS, Smeds E, Höök M, Degen JL (2013) Genetic elimination of the binding motif on fibrinogen for the *S. aureus* virulence factor ClfA improves host survival in septicemia. *Blood* 121:1783–1794
91. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* 12:49–62
92. Foster TJ (2016) The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35:1923–1931
93. Francois P (1996) Physical and biological effects of a surface coating procedure on polyurethane catheters. *Biomaterials* 17:667–678
94. Fresenius M, Heck M (2011) Nosokomiale Infektionen. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-16879-6_14

95. Fukazawa Y, Kagaya K (1997) Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *Med Mycol* 35:87–99
96. Gahlot R, Nigam C, Kumar V, Yadav G, Anupurba S (2014) Catheter-related bloodstream infections. *Int J Crit Illn Inj Sci* 4:162–167
97. Ganguly S, Mitchell AP (2011) Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 14:380–385
98. Gaur NK, Smith RL, Klotz SA (2002) *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* expressing ALA1/ALS5 adhere to accessible threonine, serine, or alanine patches. *Cell Commun Adhes* 9:45–57
99. Ge Y, Caufield PW, Fisch GS, Li Y (2008) *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization correlated with caries experience in children. *Caries Res* 42:444–448
100. Gerós-Mesquita Â, Carvalho-Pereira J, Franco-Duarte R, Alves A, Gerós H, Pais C, Sampaio P (2020) Oral *Candida albicans* colonization in healthy individuals: prevalence, genotypic diversity, stability along time and transmissibility. *J Oral Microbiol* 12:1820292
101. Gibbons RJ, Hay DI, Schlesinger DH (1991) Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect Immun* 59:2948–2954
102. Goldmann DA, Pier GB (1993) Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol Rev* 6:176–192
103. Gominet M, Compain F, Beloin C, Lebeaux D (2017) Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *APMIS* 125:365–375
104. Goodman SL, Cooper SL, Albrecht RM (1989) Polyurethane support films: structure and cellular adhesion. *Scanning Microsc Suppl* 3:285–294; discussion 294-295
105. Gu J, Valdevit A, Chou T-M, Libera M (2017) Substrate effects on cell-envelope deformation during early-stage *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Soft Matter* 13:2967–2976
106. Gulati M, Nobile CJ (2016) *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect* 18:310–321
107. Gunaratnam G, Tuchscher L, Elhawy MI, Bertram R, Eisenbeis J, Spengler C, Tschernig T, Löffler B, Somerville GA, Jacobs K, Herrmann M, Bischoff M (2019) ClpC affects the intracellular survival capacity of *Staphylococcus aureus* in non-professional phagocytic cells. *Sci Rep* 9:16267
108. Gunaratnam G, Spengler C, Trautmann S, Jung P, Mischo J, Wieland B, Metz C, Becker SL, Hannig M, Jacobs K, Bischoff M (2020) Human blood plasma factors affect the adhesion kinetics of *Staphylococcus aureus* to central venous catheters. *Sci Rep* 10:20992
109. Gunaratnam G, Dudek J, Jung P, Becker SL, Jacobs K, Bischoff M, Hannig M (2021) Quantification of the Adhesion Strength of *Candida albicans* to Tooth Enamel. *Microorganisms* 9:2213
110. Gurtman A, Begier E, Mohamed N, Baber J, Sabharwal C, Haupt RM, Edwards H, Cooper D, Jansen KU, Anderson AS (2019) The development of a *staphylococcus aureus* four antigen vaccine for use prior to elective orthopedic surgery. *Hum Vaccines Immunother* 15:358–370

111. Hähl H, Evers F, Grandthyll S, Paulus M, Sternemann C, Loskill P, Lessel M, Hüsecken AK, Brenner T, Tolan M, Jacobs K (2012) Subsurface influence on the structure of protein adsorbates as revealed by in situ X-ray reflectivity. *Langmuir ACS J Surf Colloids* 28:7747–7756
112. Hannig C, Helbig R, Hilsenbeck J, Werner C, Hannig M (2018) Impact of the springtail's cuticle nanotopography on bioadhesion and biofilm formation *in vitro* and in the oral cavity. *R Soc Open Sci* 5:171742
113. Hannig M, Herzog S, Willigeroth SF, Zimehl R (2001) Atomic force microscopy study of salivary pellicles formed on enamel and glass in vivo. *Colloid Polym Sci* 279:479–483
114. Hannig M, Hannig C (2010) Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol* 5:565–569
115. Hawkins J, Kodali S, Matsuka YV, McNeil LK, Mininni T, Scully IL, Vernachio JH, Severina E, Girgenti D, Jansen KU, Anderson AS, Donald RGK (2012) A Recombinant Clumping Factor A-Containing Vaccine Induces Functional Antibodies to *Staphylococcus aureus* That Are Not Observed after Natural Exposure. *Clin Vaccine Immunol* 19:1641–1650
116. Hawser SP, Islam K (1998) Binding of *Candida albicans* to immobilized amino acids and bovine serum albumin. *Infect Immun* 66:140–144
117. Hay DI (1973) The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 18:1517–1529
118. Heilmann C (2011) *Adhesion Mechanisms of Staphylococci*. Springer Netherlands, Dordrecht. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-0940-9_7
119. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R (2004) Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids Surf B Biointerfaces* 33:235–241
120. Henry-Stanley MJ, Shepherd MM, Wells CL, Hess DJ (2010) Selected Factors Affecting *Staphylococcus aureus* Within Silastic Catheters. *J Surg Res* 161:202–208
121. Henry-Stanley MJ, Shepherd MM, Wells CL, Hess DJ (2011) Role of *Staphylococcus aureus* Protein A in Adherence to Silastic Catheters. *J Surg Res* 167:9–13
122. Herman-Bausier P, Labate C, Towell AM, Derclaye S, Geoghegan JA, Dufrêne YF (2018) *Staphylococcus aureus* clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. *Proc Natl Acad Sci* 115:5564–5569
123. Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Perdreau FS, Peters G, Waldvogel FA (1988) Fibronectin, Fibrinogen, and Laminin Act as Mediators of Adherence of Clinical *Staphylococcal* Isolates to Foreign Material. *J Infect Dis* 158:693–701
124. Herrmann M, Hartleib J, Kehrel B, Montgomery RR, Sixma JJ, Peters G (1997) Interaction of von Willebrand Factor with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 176:984–991
125. Ho V, Herman-Bausier P, Shaw C, Conrad KA, Garcia-Sherman MC, Draghi J, Dufrene YF, Lipke PN, Rauceo JM (2019) An Amyloid Core Sequence in the Major *Candida albicans* Adhesin Als1p Mediates Cell-Cell Adhesion. *mBio* 10:e01766-19
126. Hofherr L, Müller-Renno C, Ziegler C (2020) FluidFM as a tool to study adhesion forces of bacteria - Optimization of parameters and comparison to conventional bacterial probe Scanning Force Spectroscopy. *PLoS One* 15:e0227395

127. Hogan S, Stevens NT, Humphreys H, O’Gara JP, O’Neill E (2014) Current and Future Approaches to the Prevention and Treatment of Staphylococcal Medical Device-Related Infections. *Curr Pharm Des* 21:100–113
128. Holmes AR, van der Wielen P, Cannon RD, Ruske D, Dawes P (2006) *Candida albicans* binds to saliva proteins selectively adsorbed to silicone. *Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endodontology* 102:488–494
129. Holmes AR, Rodrigues E, van der Wielen P, Lyons KM, Haigh BJ, Wheeler TT, Dawes PJD, Cannon RD (2014) Adherence of *Candida albicans* to silicone is promoted by the human salivary protein SPLUNC2/PSP/BPIFA2. *Mol Oral Microbiol* 29:90–98
130. Hori K, Matsumoto S (2010) Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem Eng J* 11
131. Hu J, Chen S, Huang D, Zhang Y, Lü S, Long M (2020) Global mapping of live cell mechanical features using PeakForce QNM AFM. *Biophys Rep* 6:9–18
132. Irwin GR, Hart RJ, Martin CM Pathogenesis and Prevention of Intravenous Catheter Infections. 9
133. Ivy DD, Calderbank M, Wagner BD, Dolan S, Nyquist A-C, Wade M, Nickels WM, Doran AK (2009) Closed-Hub Systems with Protected Connections and the Reduction of Risk of Catheter-Related Bloodstream Infection in Pediatric Patients Receiving Intravenous Prostanoid Therapy for Pulmonary Hypertension. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30:823–829
134. Jean J, Goldberg S, Khare R, Bailey LC, Forrest CB, Hajishengallis E, Koo H (2018) Retrospective Analysis of *Candida*-related Conditions in Infancy and Early Childhood Caries. *Pediatr Dent* 40:131–135
135. Jeng H-W, Holmes AR, Cannon RD (2005) Characterization of two *Candida albicans* surface mannoprotein adhesins that bind immobilized saliva components. *Med Mycol* 43:209–217
136. Johansson I, Bratt P, Hay DI, Schluckebier S, Stromberg 2 N (2000) Adhesion of *Candida albicans*, but not *Candida krusei*, to salivary statherin and mimicking host molecules. *Oral Microbiol Immunol* 15:112–118
137. John SF, Hillier VF, Handley PS, Derrick MR (1995) Adhesion of staphylococci to polyurethane and hydrogel-coated polyurethane catheters assayed by an improved radiolabelling technique. *J Med Microbiol* 43:133–140
138. John SF, Derrick MR, Jacob AE, Handley PS (1996) The combined effects of plasma and hydrogel coating on adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* to polyurethane catheters. *FEMS Microbiol Lett* 144:241–247
139. Joo H-S, Otto M (2012) Molecular Basis of In Vivo Biofilm Formation by Bacterial Pathogens. *Chem Biol* 19:1503–1513
140. Jucker BA, Harms H, Zehnder AJ (1996) Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J Bacteriol* 178:5472–5479
141. Kamprad N, Witt H, Schröder M, Kreis CT, Bäumchen O, Janshoff A, Tarantola M (2018) Adhesion strategies of *Dictyostelium discoideum* – a force spectroscopy study. *Nanoscale* 10:22504–22519

142. Kang S, Elimelech M (2009) Bioinspired Single Bacterial Cell Force Spectroscopy. *Langmuir* 25:9656–9659
143. Katsikogianni M, Missirlis Y (2004) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater* 8:37–57
144. Kennedy MJ, Volz PA (1985) Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect Immun* 49:654–663
145. Khandwekar AP, Doble M (2011) Physicochemical characterisation and biological evaluation of polyvinylpyrrolidone-iodine engineered polyurethane (Tecoflex®). *J Mater Sci Mater Med* 22:1231–1246
146. Kinnari TJ, Peltonen LI, Kuusela P, Kivilahti J, Könönen M, Jero J (2005) Bacterial Adherence to Titanium Surface Coated with Human Serum Albumin. *Otol Neurotol* 26:380–384
147. Klemm S, Baum M, Qiu H, Nan Z, Cavalheiro M, Teixeira MC, Tendero C, Gapeeva A, Adelong R, Dague E, Castelain M, Formosa-Dague C (2021) Development of Polythiourethane/ZnO-Based Anti-Fouling Materials and Evaluation of the Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida glabrata* Using Single-Cell Force Spectroscopy. *Nanomaterials* 11:271
148. Klinker T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T (2011) Dental Caries in Rats Associated with *Candida albicans*. *Caries Res* 45:100–106
149. Klotz SA, Smith RL (1991) A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J Infect Dis* 163:604–610
150. Klotz SA, Gaur NK, Lake DF, Chan V, Rauceo J, Lipke PN (2004) Degenerate Peptide Recognition by *Candida albicans* Adhesins Als5p and Als1p. *Infect Immun* 72:2029–2034
151. Kluytmans J, Belkum AV, Verbrugh H (1997) Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. *CLIN MICROBIOL REV* 10:16
152. Komath SS, Singh SL, Pratyusha VA, Sah SK (2018) Generating anchors only to lose them: The unusual story of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis and remodeling in yeast and fungi: GPI BIOSYNTHESIS IN YEAST AND FUNGI. *IUBMB Life* 70:355–383
153. Kotpal R, S. KP, Bhalla P, Dewan R, Kaur R (2016) Incidence and Risk Factors of Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in HIV-Infected Individuals in Comparison to HIV-Uninfected Individuals: A Case–Control Study. *J Int Assoc Provid AIDS Care JIAPAC* 15:141–147
154. Kovacevich DS, Faubion WC, Bender JM, Schaberg DR, Wesley JR (1986) Association of Parenteral Nutrition Catheter Sepsis with Urinary Tract Infections. *J Parenter Enter Nutr* 10:639–641
155. Kristinsson KG (1989) Adherence of staphylococci to intravascular catheters. *J Med Microbiol* 28:249–257
156. Kubiak-Ossowska K, Jachimaska B, Mulheran PA (2016) How Negatively Charged Proteins Adsorb to Negatively Charged Surfaces: A Molecular Dynamics Study of BSA Adsorption on Silica. *J Phys Chem B* 120:10463–10468
157. Kumamoto CA (2011) Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr Opin Microbiol* 14:386–391

158. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Lond Engl* 357:1225–1240
159. Kwiecinski JM, Crosby HA, Valotteau C, Hippensteel JA, Nayak MK, Chauhan AK, Schmidt EP, Dufrêne YF, Horswill AR (2019) *Staphylococcus aureus* adhesion in endovascular infections is controlled by the ArlRS–MgrA signaling cascade. *PLOS Pathog* 15:e1007800
160. Lacey KA, Mulcahy ME, Towell AM, Geoghegan JA, McLoughlin RM (2019) Clumping factor B is an important virulence factor during *Staphylococcus aureus* skin infection and a promising vaccine target. *PLOS Pathog* 15:e1007713
161. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, Harbarth S (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primer* 4:18033
162. Lee BE, Feinberg M, Abraham JJ, Murthy AR (1992) Congenital malformations in an infant born to a woman treated with fluconazole. *Pediatr Infect Dis J* 11:1062–1064
163. Leroux S, Jacqz-Aigrain E, Elie V, Legrand F, Barin-Le Guellec C, Aurich B, Biran V, Dusang B, Goudjil S, Coopman S, Garcia Sanchez R, Zhao W, Manzoni P, on behalf of the FP7 TINN (Treat Infections in NeoNates) consortium (2018) Pharmacokinetics and safety of fluconazole and micafungin in neonates with systemic candidiasis: a randomized, open-label clinical trial: Fluconazole and micafungin in neonates. *Br J Clin Pharmacol* 84:1989–1999
164. Li F, Svarovsky MJ, Karlsson AJ, Wagner JP, Marchillo K, Oshel P, Andes D, Palecek SP (2007) Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *Eukaryot Cell* 6:931–939
165. Li M, Liu L, Zambelli T (2021) FluidFM for single-cell biophysics. *Nano Res*
166. Lin H-B, Lewis KB, Leach-Scampavia D, Ratner BD, Cooper SL (1993) Surface properties of RGD-peptide grafted polyurethane block copolymers: Variable take-off angle and cold-stage ESCA studies. *J Biomater Sci Polym Ed* 4:183–198
167. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ (2018) Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol* 16:19–31
168. Lopez-Lopez G, Pascual A, Perea EJ (1991) Effect of plastic catheter material on bacterial adherence and viability. *J Med Microbiol* 34:349–353
169. Loskill P, Hähl H, Thewes N, Kreis CT, Bischoff M, Herrmann M, Jacobs K (2012) Influence of the Subsurface Composition of a Material on the Adhesion of *Staphylococci*. *Langmuir* 28:7242–7248
170. Lotfi-Kamran MH, Jafari AA, Falah-Tafti A, Tavakoli E, Falahzadeh MH (2009) *Candida* Colonization on the Denture of Diabetic and Non-diabetic Patients. *Dent Res J* 6:23–27
171. Lozano Moraga CP, Rodríguez Martínez GA, Lefimil Puente CA, Morales Bozo IC, Urzúa Orellana BR (2017) Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida non- albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status. *Acta Odontol Scand* 75:30–35

172. Maikranz E, Spengler C, Thewes N, Thewes A, Nolle F, Jung P, Bischoff M, Santen L, Jacobs K (2020) Different binding mechanisms of *Staphylococcus aureus* to hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Nanoscale* 12:19267–19275
173. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW (1977) A Semiquantitative Culture Method for Identifying Intravenous-Catheter-Related Infection. *N Engl J Med* 296:1305–1309
174. Mandolfo S, Anesi A, Maggio M, Rognoni V, Galli F, Forneris G (2019) High success rate in salvage of catheter-related bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus* , on behalf of project group of Italian society of nephrology. *J Vasc Access* 112972981987532
175. Marsh, Philip; Martin, Michael (1992) *Oral Microbiology*.
176. Martín ML, Pfaffen V, Valenti LE, Giacomelli CE (2018) Albumin biofunctionalization to minimize the *Staphylococcus aureus* adhesion on solid substrates. *Colloids Surf B Biointerfaces* 167:156–164
177. Martín ML, Dassie SA, Valenti LE, Giacomelli CE (2019) A simple surface biofunctionalization strategy to inhibit the biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on solid substrates. *Colloids Surf B Biointerfaces* 183:110432
178. McCall AD, Pathirana RU, Prabhakar A, Cullen PJ, Edgerton M (2019) *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. *Npj Biofilms Microbiomes* 5:21
179. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 11:237–248
180. Mcdevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, Mcintire L, Foster T, HooK M (1997) Characterization of the Interaction Between the *Staphylococcus Aureus* Clumping Factor (ClfA) and Fibrinogen. *Eur J Biochem* 247:416–424
181. Meenan NAG, Visai L, Valtulina V, Schwarz-Linek U, Norris NC, Gurusiddappa S, Höök M, Speziale P, Potts JR (2007) The Tandem β -Zipper Model Defines High Affinity Fibronectin-binding Repeats within *Staphylococcus aureus* FnBPA. *J Biol Chem* 282:25893–25902
182. Metcalf SCL, Chambers ST, Pithie AD (2004) Use of ethanol locks to prevent recurrent central line sepsis. *J Infect* 49:20–22
183. Milles LF, Schulten K, Gaub HE, Bernardi RC (2018) Molecular mechanism of extreme mechanostability in a pathogen adhesin. *Science* 359:1527–1533
184. Milles LF, Gaub HE (2020) Extreme mechanical stability in protein complexes. *Curr Opin Struct Biol* 60:124–130
185. Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, Giannini S, Arciola CR (2011) Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol* 6:1329–1349
186. Moormeier DE, Bose JL, Horswill AR, Bayles KW (2014) Temporal and Stochastic Control of *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. *mBio* 5:e01341-14
187. Moormeier DE, Bayles KW (2017) *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism: *Molecular mechanisms of S. aureus biofilm development*. *Mol Microbiol* 104:365–376

188. Mosesson MW (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost JTH* 3:1894–1904
189. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O’Keeffe KM, Walsh EJ, Foster TJ, McLoughlin RM (2012) Nasal Colonisation by *Staphylococcus aureus* Depends upon Clumping Factor B Binding to the Squamous Epithelial Cell Envelope Protein Loricrin. *PLoS Pathog* 8:e1003092
190. Müller DJ, Dufrêne YF (2011) Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol* 21:461–469
191. Müller DJ, Dumitru AC, Lo Giudice C, Gaub HE, Hinterdorfer P, Hummer G, De Yoreo JJ, Dufrêne YF, Alsteens D (2020) Atomic Force Microscopy-Based Force Spectroscopy and Multiparametric Imaging of Biomolecular and Cellular Systems. *Chem Rev*
192. Nagel JA, Dickinson RB, Cooper SL (1996) Bacterial adhesion to polyurethane surfaces in the presence of pre-adsorbed high molecular weight kininogen. *J Biomater Sci Polym Ed* 7:769–780
193. Neuman KC, Nagy A (2008) Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods* 5:491–505
194. Nguyen T, Ghebrehiwet B, Peerschke EIB (2000) *Staphylococcus aureus* Protein A Recognizes Platelet gC1qR/p33: a Novel Mechanism for Staphylococcal Interactions with Platelets. *Infect Immun* 68:2061–2068
195. Ní Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 30:245–257
196. Ní Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 30:245–257
197. Niemi LD, Johansson I (2004) Salivary Statherin Peptide-Binding Epitopes of Commensal and Potentially Infectious *Actinomyces* spp. Delineated by a Hybrid Peptide Construct. *Infect Immun* 72:782–787
198. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Murata H, Subiwahjudi A (1998) The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxylapatite beads. *J Dent* 26:31–37
199. Nilsson LM, Thomas WE, Sokurenko EV, Vogel V (2006) Elevated Shear Stress Protects *Escherichia coli* Cells Adhering to Surfaces via Catch Bonds from Detachment by Soluble Inhibitors. *Appl Environ Microbiol* 72:3005–3010
200. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan Q-T, Edwards JE, Filler SG, Mitchell AP (2006) Critical Role of Bcr1-Dependent Adhesins in *C. albicans* Biofilm Formation In Vitro and In Vivo. *PLoS Pathog* 2:e63
201. Nune C, Xu W, Misra RDK (2012) The impact of grafted modification of silicone surfaces with quantum-sized materials on protein adsorption and bacterial adhesion: Impact of Grafted Modification of Silicone Surfaces. *J Biomed Mater Res A* 100A:3197–3204
202. O’Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ (2002) *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol* 4:759–770

203. O'Connell LM, Santos R, Springer G, Burne RA, Nascimento MM, Richards VP (2020) Site-Specific Profiling of the Dental Mycobiome Reveals Strong Taxonomic Shifts during Progression of Early-Childhood Caries. *Appl Environ Microbiol* 86:e02825-19, /aem/86/7/AEM.02825-19.atom
204. Olsen K, Danielsen K, Wilsgaard T, Sangvik M, Sollid JUE, Thune I, Eggen AE, Simonsen GS, Furberg A-S (2013) Obesity and *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization among Women and Men in a General Population. *PLoS ONE* 8:e63716
205. O'Sullivan JM, Cannon RD, Sullivan PA, Jenkinson HF (1997) Identification of salivary basic proline-rich proteins as receptors for *Candida albicans* adhesion. *Microbiology* 143:341–348
206. O'Sullivan JM, Jenkinson HF, Cannon RD (2000) Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology* 146:41–48
207. Otto M (2009) *Staphylococcus epidermidis* — the „accidental“ pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7:555–567
208. Ouwehand AC, Salminen S (2003) *In vitro* adhesion assays for probiotics and their *in vivo* relevance: a review. *Microb Ecol Health Dis* 15:175–184
209. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE Guidelines for Treatment of Candidiasis. 29
210. Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Grässle S, Suckau J, Laschke MW, Bischoff M, Bauer C, Schorpp-Kistner M, Weidenmaier C, Schneppenheim R, Obser T, Sinha B, Schneider SW (2013) Ultralarge von Willebrand Factor Fibers Mediate Luminal *Staphylococcus aureus* Adhesion to an Intact Endothelial Cell Layer Under Shear Stress. *Circulation* 128:50–59
211. Parameswaran R, Sherchan JB, Varma D M, Mukhopadhyay C, Vidyasagar S (2011) Intravascular catheter-related infections in an Indian tertiary care hospital. *J Infect Dev Ctries* 5:452–458
212. Parker MT, Jevons MP (1964) A Survey of Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus*. *Postgrad Med J* 40:170–178
213. Paulsson M, Kober M, Freij-Larsson C, Stollenwerk M, Wesslén B, Ljungh A (1993) Adhesion of staphylococci to chemically modified and native polymers, and the influence of preadsorbed fibronectin, vitronectin and fibrinogen. *Biomaterials* 14:845–853
214. Percy MG, Gründling A (2014) Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 68:81–100
215. Pereira MO, Kuehn M, Wuertz S, Neu T, Melo LF (2002) Effect of flow regime on the architecture of *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Biotechnol Bioeng* 78:164–171
216. Peters G, Locci R, Pulverer G (1982) Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 146:479–482
217. Pitarch A, Nombela C, Gil C (2018) Diagnosis of Invasive Candidiasis: From Gold Standard Methods to Promising Leading-edge Technologies. *Curr Top Med Chem* 18:1375–1392
218. Ponton J, Elguezabal N, Maza JL, Dorronsoro S (2008) Whole Saliva has a Dual Role on the Adherence of *Candida albicans* to Polymethylmetacrylate. *Open Dent J* 2:1–4

219. Potthoff E, Guillaume-Gentil O, Ossola D, Polesel-Maris J, LeibundGut-Landmann S, Zambelli T, Vorholt JA (2012) Rapid and Serial Quantification of Adhesion Forces of Yeast and Mammalian Cells. *PLoS ONE* 7:e52712
220. Potthoff E, Ossola D, Zambelli T, Vorholt JA (2015) Bacterial adhesion force quantification by fluidic force microscopy. *Nanoscale* 7:4070–4079
221. Prakobphol A, Burdsal CA, Fisher SJ (1995) Quantifying the Strength of Bacterial Adhesive Interactions with Salivary Glycoproteins. *J Dent Res* 74:1212–1218
222. Price LB, Hungate BA, Koch BJ, Davis GS, Liu CM (2017) Colonizing opportunistic pathogens (COPs): The beasts in all of us. *PLOS Pathog* 13:e1006369
223. Prill SK-H, Klinkert B, Timpel C, Gale CA, Schröppel K, Ernst JF (2004) PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance: Pmt family. *Mol Microbiol* 55:546–560
224. Pursley TJ, Blomquist IK, Abraham J, Andersen HF, Bartley JA (1996) Fluconazole-Induced Congenital Anomalies in Three Infants. *Clin Infect Dis* 22:336–340
225. Quin C, Gibson DL (2020) Human behavior, not race or geography, is the strongest predictor of microbial succession in the gut bacteriome of infants. *Gut Microbes* 11:1143–1171
226. Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sadlowski M, Anaissie E, Bodey GP (1993) Ultrastructural Analysis of Indwelling Vascular Catheters: A Quantitative Relationship between Luminal Colonization and Duration of Placement. *J Infect Dis* 168:400–407
227. Raad II, Bodey GP (1992) Infectious Complications of Indwelling Vascular Catheters. *Clin Infect Dis* 15:197–210
228. Ratner BD, Castner DG, Horbett TA, Lenk TJ, Lewis KB, Rapoza RJ (1990) Biomolecules and surfaces. *J Vac Sci Technol Vac Surf Films* 8:2306–2317
229. Rauceo JM, De Armond R, Otoo H, Kahn PC, Klotz SA, Gaur NK, Lipke PN (2006) Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p. *Eukaryot Cell* 5:1664–1673
230. Reifenberger RG (2016) Fundamentals of atomic force microscopy. World Scientific, [Hackensack] New Jersey
231. Reifsteck F, Wee S, Wilkinson BJ (1987) Hydrophobicity--hydrophilicity of staphylococci. *J Med Microbiol* 24:65–73
232. Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP (2012) *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* adhesion to nanohydroxyapatite in the presence of model proteins. *Biomed Mater Bristol Engl* 7:045010
233. Ricardo SIC, Anjos IIL, Monge N, Faustino CMC, Ribeiro IAC (2020) A Glance at Antimicrobial Strategies to Prevent Catheter-Associated Medical Infections. *ACS Infect Dis* 6:3109–3130
234. Römling U, Balsalobre C (2012) Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* 272:541–561

235. Ruiz V, Rodríguez-Cerrato V, Huelves L, Del Prado G, Naves P, Ponte C, Soriano F (2011) Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to Polystyrene Plates and Epithelial Cells and the Antiadhesive Potential of Albumin and Xylitol. *Pediatr Res* 69:23–27
236. Safdar N, Maki DG (2011) *Intravascular Device-Related Infections: Catheter Salvage Strategies and Prevention of Device-Related Infection*. Humana Press, Totowa, NJ. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-644-3_11
237. Salgado PS, Yan R, Taylor JD, Burchell L, Jones R, Hoyer LL, Matthews SJ, Simpson PJ, Cota E (2011) Structural basis for the broad specificity to host-cell ligands by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15775–15779
238. Salzman MB, Rubin LG (1997) Relevance of the catheter hub as a portal for microorganisms causing catheter-related bloodstream infections. *Nutrition* 13:15S-17S
239. Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW (1980) Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 25:611–615
240. Sandoe JAT, Witherden IR, Cove JH, Heritage J, Wilcox MH (2003) Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J Med Microbiol* 52:547–550
241. Saravia-Otten P, Müller HP, Arvidson S (1997) Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by *agr* and an *agr*-independent mechanism. *J Bacteriol* 179:5259–5263
242. Schulz-Weidner N, Ansari F, Hossain H, Chakraborty T, Domann E (2005) Vergleichende PCR-Typisierung von *Candida albicans* aus der Mundhöhle und dem Magen-Darm-Trakt. 5
243. Seifert H, Cornely O, Seggewiss K, Decker M, Stefanik D, Wisplinghoff H, Fätkenheuer G (2003) Bloodstream infection in neutropenic cancer patients related to short-term nontunnelled catheters determined by quantitative blood cultures, differential time to positivity, and molecular epidemiological typing with pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 41:118–123
244. Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS (1997) Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol* 42:513–520
245. Sesso R, Barbosa D, Leme IL, Sader H, Canziani ME, Manfredi S, Draibe S, Pignatari AC (1998) *Staphylococcus aureus* prophylaxis in hemodialysis patients using central venous catheter: effect of mupirocin ointment. *J Am Soc Nephrol JASN* 9:1085–1092
246. Signas C, Raucci G, Jonsson K, Lindgren PE, Anantharamaiah GM, Hook M, Lindberg M (1989) Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc Natl Acad Sci* 86:699–703
247. Singleton DR, Fidel PL, Wozniak KL, Hazen KC (2005) Contribution of cell surface hydrophobicity protein 1 (Csh1p) to virulence of hydrophobic *Candida albicans* serotype A cells. *FEMS Microbiol Lett* 244:373–377
248. Sinha B, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause K-H (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasins via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta$. *Cell Microbiol* 17

249. Sitges-Serra A, Puig P, Liñares J, Pérez JL, Farreró N, Jaurrieta E, Garau J (1984) Hub colonization as the initial step in an outbreak of catheter-related sepsis due to coagulase negative staphylococci during parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 8:668–672
250. Sjollema J, van der Mei HC, Hall CL, Peterson BW, de Vries J, Song L, Jong ED de, Busscher HJ, Swartjes JJTM (2017) Detachment and successive re-attachment of multiple, reversibly-binding tethers result in irreversible bacterial adhesion to surfaces. *Sci Rep* 7:4369
251. Smith RS, Zhang Z, Bouchard M, Li J, Lapp HS, Brotske GR, Lucchino DL, Weaver D, Roth LA, Coury A, Biggerstaff J, Sukavaneshvar S, Langer R, Loose C (2012) Vascular Catheters with a Nonleaching Poly-Sulfobetaine Surface Modification Reduce Thrombus Formation and Microbial Attachment. *Sci Transl Med* 4:
252. Soman P, Rice Z, Siedlecki CA (2008) Immunological identification of fibrinogen in dual-component protein films by AFM imaging. *Micron Oxf Engl* 1993 39:832–842
253. Spengler C, Thewes N, Jung P, Bischoff M, Jacobs K (2017) Determination of the nano-scaled contact area of staphylococcal cells. *Nanoscale* 9:10084–10093
254. Spengler C, Thewes N, Nolle F, Faidt T, Umanskaya N, Hannig M, Bischoff M, Jacobs K (2017) Enhanced adhesion of *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite after exposure to saliva: Enhanced adhesion of *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite after exposure to saliva. *J Mol Recognit* 30:e2615
255. Spengler C (2018) Exploring Microbial Adhesion Through Targeted Design of Bacterial Probes and Substrates in AFM-based Force Spectroscopy.
256. Spengler C, Nolle F, Mischo J, Faidt T, Grandthyll S, Thewes N, Koch M, Müller F, Bischoff M, Klatt MA, Jacobs K (2019) Strength of bacterial adhesion on nanostructured surfaces quantified by substrate morphometry. *Nanoscale* 11:19713–19722
257. Spengler C, Maikranz E, Santen L, Jacobs K (2021) Modeling Bacterial Adhesion to Unconditioned Abiotic Surfaces. *Front Mech Eng* 7:661370
258. Spengler C, Glatz BA, Maikranz E, Bischoff M, Klatt MA, Santen L, Fery A, Jacobs K (2021) The adhesion capability of *S. aureus* cells is heterogeneously distributed over the cell envelope. *BiophysicsURL*: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.01.05.425282>
259. Spengler C, Nolle F, Thewes N, Wieland B, Jung P, Bischoff M, Jacobs K (2021) Using Knock-Out Mutants to Investigate the Adhesion of *Staphylococcus aureus* to Abiotic Surfaces. *Int J Mol Sci* 22:11952
260. Sun M, Graham JS, Hegedüs B, Marga F, Zhang Y, Forgacs G, Grandbois M (2005) Multiple Membrane Tethers Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophys J* 89:4320–4329
261. Tacconelli E, Smith G, Hieke K, Lafuma A, Bastide P (2009) Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four European countries: literature- and registry-based estimates. *J Hosp Infect* 72:97–103
262. Taubenberger AV, Hutmacher DW, Muller DJ (2014) Single-Cell Force Spectroscopy, an Emerging Tool to Quantify Cell Adhesion to Biomaterials. *Tissue Eng Part B Rev* 20:40–55
263. Tebbs SE, Sawyer A, Elliott TSJ (1994) Influence of surface morphology on in vitro bacterial adherence to central venous catheters. *Br J Anaesth* 72:587–591

264. ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PWJ (2009) Molecular and Cellular Mechanisms That Lead to Candida Biofilm Formation. *J Dent Res* 88:105–115
265. Tengvall P (2017) 4.6 Protein Interactions With Biomaterials ☆. Elsevier URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128035818101109>
266. Thanh Nguyen H, Zhang R, Inokawa N, Oura T, Chen X, Iwatani S, Niimi K, Niimi M, Holmes AR, Cannon RD, Kajiwara S (2021) Candida albicans Bgl2p, Ecm33p, and Als1p proteins are involved in adhesion to saliva-coated hydroxyapatite. *J Oral Microbiol* 13:1879497
267. Thewes N, Loskill P, Jung P, Peisker H, Bischoff M, Herrmann M, Jacobs K (2014) Hydrophobic interaction governs unspecific adhesion of staphylococci: a single cell force spectroscopy study. *Beilstein J Nanotechnol* 5:1501–1512
268. Thewes N, Thewes A, Loskill P, Peisker H, Bischoff M, Herrmann M, Santen L, Jacobs K (2015) Stochastic binding of Staphylococcus aureus to hydrophobic surfaces. *Soft Matter* 11:8913–8919
269. Thewes N, Loskill P, Spengler C, Hübner S, Bischoff M, Jacobs K (2015) A detailed guideline for the fabrication of single bacterial probes used for atomic force spectroscopy. *Eur Phys J E* 38:140
270. Thewes N (2016) Bacterial adhesion to abiotic surfaces: atomic force spectroscopy and Monte Carlo simulations.
271. Thomas WE, Nilsson LM, Forero M, Sokurenko EV, Vogel V (2004) Shear-dependent ‘stick-and-roll’ adhesion of type 1 fimbriated Escherichia coli: Stick-and-roll bacterial adhesion. *Mol Microbiol* 53:1545–1557
272. Trautmann S, Barghash A, Fecher-Trost C, Schalkowsky P, Hannig C, Kirsch J, Rupf S, Keller A, Helms V, Hannig M (2019) Proteomic Analysis of the Initial Oral Pellicle in Caries-Active and Caries-Free Individuals. *PROTEOMICS – Clin Appl* 13:1800143
273. Trautmann S, Künzel N, Fecher-Trost C, Barghash A, Schalkowsky P, Dudek J, Delius J, Helms V, Hannig M (2020) Deep Proteomic Insights into the Individual Short-Term Pellicle Formation on Enamel—An In Situ Pilot Study. *PROTEOMICS – Clin Appl* 14:1900090
274. Tynelius-Bratthall G, Ericson D, Araujo HM (1986) Fibronectin in saliva and gingival crevices. *J Periodontal Res* 21:563–568
275. van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, Verbrugh HA, Wertheim HFL (2009) Reclassification of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Types. *J Infect Dis* 199:1820–1826
276. van der Westen R, Sjollem J, Molenaar R, Sharma PK, van der Mei HC, Busscher HJ (2018) Floating and Tether-Coupled Adhesion of Bacteria to Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces. *Langmuir ACS J Surf Colloids* 34:4937–4944
277. Vande Velde G, Kucharíková S, Schrevels S, Himmelreich U, Van Dijck P (2014) Towards non-invasive monitoring of pathogen–host interactions during *Candida albicans* biofilm formation using *in vivo* bioluminescence. *Cell Microbiol* 16:115–130
278. VandenBergh MFQ, Yzerman EPF, van Belkum A, Boelens HAM, Sijmons M, Verbrugh HA (1999) Follow-Up of Staphylococcus aureus Nasal Carriage after 8 Years: Redefining the Persistent Carrier State. *J Clin Microbiol* 37:3133–3140

279. Vaudaux P, Suzuki R, Waldvogel FA, Morgenthaler JJ, Nydegger UE (1984) Foreign body infection: role of fibronectin as a ligand for the adherence of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 150:546–553
280. Vaudaux P, Pittet D, Haeberli A, Huggler E, Nydegger UE, Lew DP, Waldvogel FA (1989) Host Factors Selectively Increase Staphylococcal Adherence on Inserted Catheters: A Role for Fibronectin and Fibrinogen or Fibrin. *J Infect Dis* 160:865–875
281. Vaudaux P, Pittet D, Haeberli A, Lerch PG, Morgenthaler J-J, Proctor RA, Waldvogel FA, Lew DP (1993) Fibronectin Is More Active than Fibrin or Fibrinogen in Promoting *Staphylococcus aureus* Adherence to Inserted Intravascular Catheters. *J Infect Dis* 167:633–641
282. Verbeke F, Haug U, Dhondt A, Beck W, Schnell A, Dietrich R, Deppisch R, Vanholder R (2010) The role of polymer surface degradation and barium sulphate release in the pathogenesis of catheter-related infection. *Nephrol Dial Transplant* 25:1207–1213
283. Verdaguer A, Weis C, Oncins G, Ketteler G, Bluhm H, Salmeron M (2007) Growth and Structure of Water on SiO₂ Films on Si Investigated by Kelvin Probe Microscopy and in Situ X-ray Spectroscopies. *Langmuir* 23:9699–9703
284. Viela F, Speziale P, Pietrocola G, Dufrêne YF (2019) Mechanostability of the Fibrinogen Bridge between Staphylococcal Surface Protein ClfA and Endothelial Cell Integrin $\alpha V\beta 3$. *Nano Lett* 19:7400–7410
285. Viela F, Prystopiuk V, Leprince A, Mahillon J, Speziale P, Pietrocola G, Dufrêne YF (2019) Binding of *Staphylococcus aureus* Protein A to von Willebrand Factor Is Regulated by Mechanical Force. *mBio* 10:
286. Vitry P, Valotteau C, Feuillie C, Bernard S, Alsteens D, Geoghegan JA, Dufrêne YF (2017) Force-Induced Strengthening of the Interaction between *Staphylococcus aureus* Clumping Factor B and Loricrin. *mBio* 8:e01748-17
287. Vroman L (1962) Effect of Adsorbed Proteins on the Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids. *Nature* 196:476–477
288. Wang C, Hou J, van der Mei HC, Busscher HJ, Ren Y (2019) Emergent Properties in *Streptococcus mutans* Biofilms Are Controlled through Adhesion Force Sensing by Initial Colonizers. *mBio* 10:e01908-19, /mbio/10/5/mBio.01908-19.atom
289. Wang C, van der Mei HC, Busscher HJ, Ren Y (2020) *Streptococcus mutans* adhesion force sensing in multi-species oral biofilms. *Npj Biofilms Microbiomes* 6:25
290. Wang H, Sodagari M, Chen Y, He X, Newby BZ, Ju L-K (2011) Initial bacterial attachment in slow flowing systems: Effects of cell and substrate surface properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 87:415–422
291. Wann ER, Gurusiddappa S, Höök M (2000) The Fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* Is a Bifunctional Protein That Also Binds to Fibrinogen. *J Biol Chem* 275:13863–13871
292. Weidenmaier C, Peschel A, Xiong Y-Q, Kristian SA, Dietz K, Yeaman MR, Bayer AS (2005) Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J Infect Dis* 191:1771–1777

293. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kulauzovic E, Kohler T, Thumm G, Stoll H, Götz F, Peschel A (2008) Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Int J Med Microbiol IJMM* 298:505–513
294. Weidenmaier C, Peschel A (2008) Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 6:276–287
295. Wenzel RP (1995) Nosocomial Candidemia: Risk Factors and Attributable Mortality. *Clin Infect Dis* 20:1531–1534
296. Wildgruber M, Lueg C, Borgmeyer S, Karimov I, Braun U, Kiechle M, Meier R, Koehler M, Ettl J, Berger H (2016) Polyurethane versus silicone catheters for central venous port devices implanted at the forearm. *Eur J Cancer* 59:113–124
297. Williams RE (1963) Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* 27:56–71
298. Wolz C, Pöhlmann-Dietze P, Steinhuber A, Chien YT, Manna A, van Wamel W, Cheung A (2000) Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus *sar* in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 36:230–243
299. Xi Q, Hoth-Hannig W, Deng S, Jin X, Fu B, Hannig M (2020) The effect of polyphenol-containing solutions on in situ biofilm formation on enamel and dentin. *J Dent* 102:103482
300. Xiao J, Moon Y, Li L, Rustchenko E, Wakabayashi H, Zhao X, Feng C, Gill SR, McLaren S, Malmstrom H, Ren Y, Quivey R, Koo H, Kopycka-Kedzierawski DT (2016) *Candida albicans* Carriage in Children with Severe Early Childhood Caries (S-ECC) and Maternal Relatedness. *PLoS One* 11:e0164242
301. Xiao J, Huang X, Alkhers N, Alzamil H, Alzoubi S, Wu TT, Castillo DA, Campbell F, Davis J, Herzog K, Billings R, Kopycka-Kedzierawski DT, Hajishengallis E, Koo H (2018) *Candida albicans* and Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Res* 52:102–112
302. Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T, Miyake Y (2010) Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses* 53:221–226
303. Zhang H, Liu K-K (2008) Optical tweezers for single cells. *J R Soc Interface* 5:671–690
304. Zheng Y, He L, Asiamah TK, Otto M (2018) Colonization of medical devices by staphylococci: Colonization of medical devices by staphylococci. *Environ Microbiol* 20:3141–3153
305. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE (1982) Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* 146:487–497
306. (2017) Prävention von Infektionen, die von Gefäßkathetern ausgehen: Teil 1 – Nichtgetunnelte zentralvenöse Katheter Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 60:171–206

7. Publikationen/ Dank

Publikationen und Präsentationen

Publikationen in internationalen „peer-reviewed“ Journalen:

- Mischo, J., Faidt, T., McMillan, R.B., Dudek, J., **Gunaratnam, G.**, Bayenat, P., Holtisch, A., Spengler, C., Müller, F., Hähl, H., Bischoff, M., Hannig, M., Jacobs, K., 2022. Hydroxyapatite pelleted as versatile Model Surfaces for systematic adhesion studies on enamel: A force spectroscopy case study. **ACS Biomaterials Science & Engineering, Advance Online Publication**
- **Gunaratnam, G.***, Dudek, J.*, Jung, P., Becker, S.L., Jacobs, K., Bischoff, M., Hannig, M., 2021. Quantification of the Adhesion Strength of *Candida albicans* to Tooth Enamel. **Microorganisms 9, 16267**
* Geteilte Autorenschaft
- **Gunaratnam, G.**, Spengler, C., Trautmann, S., Jung, P., Mischo, J., Wieland, B., Metz, C., Becker, S.L., Hannig, M., Jacobs, K., Bischoff, M., 2020. Human blood plasma factors affect the adhesion kinetics of *Staphylococcus aureus* to central venous catheters. **Sci. Rep. 10, 20992**
- Shi, L., Muthukumar, V., Stachon, T., Latta, L., Elhawy, M.I., **Gunaratnam, G.**, Orosz, E., Seitz, B., Kiderlen, A.F., Bischoff, M., Szentmáry, N., 2020. The effect of anti-amoebic agents and Ce6-PDT on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts, *in vitro*. **Transl. Cis. Sci. Technol. 9, 29**
- Jung, P., Mischo, C.E., **Gunaratnam, G.**, Spengler, C., Becker, S.L., Hube, B., Jacobs, K., Bischoff, M., 2020. *Candida albicans* adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formations and pathogen-derived adhesins. **Virulence**
- Shi, L., Stachon, T., Latta, L., Elhawy, M.I., **Gunaratnam, G.**, Orosz, E., Kiderlen, A.F., Seitz, B., Bischoff, M., Szentmary, N., 2019. Comparison of *in vitro* assays to study the effectiveness of antiparasitics against *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. **Acta Microbiol. Immunol. Hung. 16, 23-32**

- **Gunaratnam, G.**, Tuchscher, L., Elhawy, M.I., Bertram, R., Eisenbeis, J., Spengler, C., Tschernig, T., Löffler, B., Somerville, G.A., Jacobs, K., Herrmann, M., Bischoff, M., 2019. ClpC affects the intracellular survival capacity of *Staphylococcus aureus* in non-professional phagocytic cells. **Sci. Rep. 9, 16267**

Vorträge auf internationalen Konferenzen:

- **Gunaratnam, G.**, Dudek, J., Jung, P., Jacobs, K., Hannig, M., Bischoff, M. Investigating the adhesion capacity of single *Candida albicans* cells on bovine tooth enamel. Digital FluidFM User Conference 2020. 16. September 2020, Zürich, Schweiz.
- **Gunaratnam, G.**, Jung, P., Spengler, C., Willeit, J., Becker, S.L., Jacobs, K., Bischoff, M. Investigating the role of blood plasma on the adhesion forces of *Staphylococcus aureus* to central venous catheters by single-cell force spectroscopy. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V. 25.-27. Februar 2019, Berlin.

Posterpräsentationen auf internationalen Konferenzen und publizierte Abstracts:

- **Gunaratnam, G.**, Dudek, J., Jung, P., Becker, S.L., Jacobs, K., Hannig, M., Bischoff, M. The adhesion strength of *Candida albicans* yeast cells to tooth enamel quantified by Fluidic Force Microscopy. Cell Physics 2021. 29. September – 01. Oktober 2022, Saarbrücken.
- Mischo, J., Faidt, T., McMillan, B., Dudek, J., **Gunaratnam, G.**, Bayenat, P., Holtsch, A., Spengler, C., Müller, F., Hähl, H., Bischoff, M., Hannig, M., Jacobs, K. Hydroxyapatite pellets as versatile model surfaces for systematic adhesion studies on enamel. Cell Physics 2021. 29. September – 01. Oktober 2022, Saarbrücken.
- **Gunaratnam, G.**, Finke, M., Elhawy, M. I., Spengler, C., Eisenbeis, J., Jacobs, K., Herrmann, M., Bischoff, M. The heat shock protein ClpC affects the intracellular survival capacity of *Staphylococcus aureus* in endothelial cells. Cell Physics 2019. 09.-11. Oktober 2019, Saarbrücken.
- Mischo, C. E., Jung, P., **Gunaratnam, G.**, Becker, S. L., Jacobs, K., Bischoff, M. Yeast versus hyphae: How does the morphotype affect the adhesion of *Candida albicans* to central-venous-catheters? 71. Jahrestagung der DGHM e. V. 25.-27. Februar 2019, Berlin.
- Shi, L., Stachon, T., Latta, L., Elhawy, M. I., **Gunaratnam, G.**, Orosz, E., Kiderlen, A. F., Seitz, B., Bischoff, M., Szentmáry, N. The effect of antiamebic agents and chlorin e6-PDT on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts *in vitro*. 117. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft 2019. 26.-29. September 2019, Berlin.

- **Gunaratnam, G.**, Jung, P., Willeit, J., Spengler, C., Jacobs, K., Bischoff, M. Probing the adhesion forces of *Staphylococcus aureus* to central venous catheters by single-cell force spectroscopy. 4th International Conference on In-situ and Correlative Electron Microscopy (CISCEM) 2018. 10.-11. Oktober 2018, Saarbrücken. (Abstract online publiziert in 2019, *Microsc. Microanal.*, 25 (Suppl 1), 53-54).
- Jung, P., **Gunaratnam, G.**, Spengler, C., Thewes, N., Jacobs, K., Bischoff, M. Initial adhesion of biofilm forming pathogens to central venous catheters: the role of blood serum proteins. *Cell Physics* 2017. 11.-13. Oktober 2017, Saarbrücken

Dank

Ich danke allen Personen, die mich beruflich und privat in den letzten Jahren unterstützt haben. Durch sie wurde meine Promotion ermöglicht.

Als Erstes bedanke ich mich bei Prof. Dr. Markus Bischoff für die Möglichkeit in seiner Forschungsgruppe zu promovieren. Ich danke ihm für seine zahlreichen Hilfestellungen und dafür, dass er zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich hat.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Matthias Hannig für die Übernahme des Zweitgutachtens. Bei ihm bedanke ich mich auch für die Begeisterung für gemeinsame Projekte mit der Mikrobiologie.

Ich danke Prof. Dr. Karin Jacobs dafür, dass sie junge Wissenschaftler wie mich sowohl im Rahmen des IRTGs als auch in privaten Gesprächen stets motiviert.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Barbara Gärtner und bei Prof. Dr. Dr. Sören Becker für die richtigen Rahmenbedingungen am IMMH, um zu promovieren, und für ihre Unterstützungen auch in kleinen Dingen.

Ich danke Dr. Philipp Jung dafür, dass er mein wissenschaftlicher Begleiter während der Promotion ist. Ich danke ihm für die große Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten und für das da sein bei technischen Schwierigkeiten am AFM.

Bei Dr. Christian Spengler bedanke ich mich für viele Hilfestellung rund um das AFM, für die Kollaboration, und dafür, dass er mich für die Methode der „Einzelzell-Kraftspektroskopie“ stets begeistern konnte. Ich danke der Arbeitsgruppe Experimentalphysik für die Kooperation und für den netten Umgang.

Bei PD Dr. Johanna Dudek bedanke ich mich für das Interesse am Candida-Projekt und für die Hilfestellungen beim Schreiben des gemeinsamen wissenschaftlichen Artikels. Bei der Arbeitsgruppe Forschung Zahnerhaltung bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei verschiedenen Experimenten und für den freundlichen Umgang.

Ein besonderer Dank gilt meinen weiteren Begleitern am IMMH. Ich danke Karin Hilgert für die Vermittlung von allen praktischen Dingen im Labor. Bei Ben Wieland bedanke ich mich für seine biophysikalische Sichtweise auf die „Dinge“ und für die Erklärung der einen oder anderen mathematischen Formel. Ich danke Silke Mahler und Silke Müller für ihre tatkräftigen Unterstützungen bei formellen Angelegenheiten. Ich danke meinem jahrelangen Mitstreiter Mohamed Elhawy für das gemeinsame Durchstehen während unserer Promotionen.. Dem gesamten Forschungsteam am IMMH danke ich für die hervorragende Atmosphäre während all der Jahre, für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und für den herzlichen Umgang.

Schließlich danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Patentante Doris Severin für ihre bedingungslose Unterstützung. Ich danke meinem guten Freund Marko Frentzen und meiner Freundin Kanjana Chelvanathan für all die Unterstützung im privaten Bereich.

Tag der Promotion: 12. April 2023
Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger
Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Bischoff
Prof. Dr. Matthias Hannig
Prof. Dr. Meike Stiesch