

**Mikroskopische und spektroskopische  
Charakterisierung  
biologisch relevanter Oberflächen**

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius–Maximilians–Universität Würzburg

vorgelegt von

**Marion A. Strehle**

aus

Werneck

Würzburg 2003

---

Eingereicht am: .....

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....

2. Gutachter: .....

der Dissertation

1. Prüfer: .....

2. Prüfer: .....

3. Prüfer: .....

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....





# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Spektroskopische Untersuchungsmethoden</b>                              | <b>5</b>  |
| 2.1      | Laser-Raster-Mikroskopie (LSM) . . . . .                                   | 6         |
| 2.2      | Kraftfeldmikroskopie (AFM) . . . . .                                       | 9         |
| 2.3      | Circulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) . . . . .             | 10        |
| 2.4      | Raman-Spektroskopie . . . . .  | 14        |
| 2.5      | Raman-Mapping . . . . .  | 16        |
| <b>I</b> | <b>Adsorption biologisch relevanter Proteine auf Implantat-Oberflächen</b> | <b>19</b> |
| <b>3</b> | <b>Einleitung und Zielsetzung Teil I</b>                                   | <b>21</b> |
| <b>4</b> | <b>Grundlagen</b>  | <b>23</b> |
| 4.1      | Implantate im Kontakt mit biologischem Gewebe . . . . .                    | 24        |
| 4.2      | Proteinadsorption auf Titan-Implantaten . . . . .                          | 27        |
| 4.3      | Die räumliche Verteilung von Proteinen auf Implantat-Oberflächen . . . . . | 28        |
| 4.4      | Strukturelle Änderungen von Proteinen . . . . .                            | 30        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>5</b>  | <b>Materialien und Methoden</b>  | <b>33</b> |
| 5.1       | LSM–Untersuchungen von fluoreszenzmarkierten Proteinen auf Implantat–<br>Materialien . . . . .                                     | 33        |
| 5.1.1     | Laser–Raster–Mikroskop und Messanordnung . . . . .   | 33        |
| 5.1.2     | Fluoreszenz–Markierung der Proteine . . . . .  | 35        |
| 5.1.3     | Fluoreszenz–Korrelations–spektroskopische Messungen der Lösungen   | 36        |
| 5.2       | LSM in Kombination mit AFM . . . . .   | 37        |
| 5.2.1     | Laser–Raster–Mikroskop und Kraftfeldmikroskop . . . . .  | 37        |
| 5.2.2     | Probenpräparation . . . . .  | 39        |
| 5.3       | Circulardichroismus–Spektroskopie (CD–Spektroskopie) . . . . .   | 40        |
| 5.4       | Raman–spektroskopische Untersuchungen . . . . .  | 40        |
| 5.4.1     | Raman–Spektrometer und Messparameter . . . . .   | 40        |
| 5.4.2     | Probenpräparation und Auswertung . . . . .   | 41        |
| <b>6</b>  | <b>Ergebnisse und Diskussion</b>   | <b>43</b> |
| 6.1       | Die räumliche Verteilung von adsorbierten Proteinen auf Implantat–Materialien  | 43        |
| 6.1.1     | Untersuchung der räumlichen Verteilung von Proteinen auf Implantat–<br>Materialien mit LSM . . . . .                               | 43        |
| 6.1.2     | Eine Kombination von AFM und LSM zur Untersuchung der räum–<br>lichen Verteilung von Proteinen auf Implantat–Materialien . . . . . | 52        |
| 6.2       | Strukturelle Änderungen von Proteinen bei der Adsorption . . . . .   | 57        |
| 6.2.1     | CD–Spektren . . . . .  | 57        |
| 6.2.2     | Raman–Spektren . . . . .   | 61        |
| <b>II</b> | <b>Zusammensetzung und räumliche Verteilung von Propolis<br/>in den Waben von <i>Apis mellifera carnica</i> POLLM.</b>             | <b>81</b> |
| <b>7</b>  | <b>Einleitung und Zielsetzung Teil II</b>  | <b>83</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>8 Grundlagen</b>  | <b>86</b>  |
| 8.1 Die Verwendung von Propolis im Bienenstock . . . . .                                 | 86         |
| 8.2 Zusammensetzung von Propolis . . . . .   | 89         |
| 8.3 Zusammensetzung von Wachs . . . . .  | 93         |
| <b>9 Materialien und Methoden</b>  | <b>95</b>  |
| 9.1 Raman-spektroskopische Untersuchungen von Wachs, Propolis und Harzen                 | 95         |
| 9.2 Raman- <i>Mapping</i> an Wabenproben von <i>Apis mellifera carnica</i> POLLM. . . .  | 98         |
| <b>10 Ergebnisse und Diskussion</b>  | <b>101</b> |
| 10.1 Raman-spektroskopische Untersuchungen an Propolis und Wachs . . . . .               | 101        |
| 10.1.1 Mikro-Raman-spektroskopische Untersuchungen von Propolis . . .                    | 102        |
| 10.1.2 Mikro-Raman-spektroskopische Untersuchungen an Pflanzenharzen                     | 106        |
| 10.1.3 Mikro-Raman-spektroskopische Untersuchungen von Wachs . . . .                     | 111        |
| 10.2 Raman- <i>Mapping</i> an Wabenproben von <i>Apis mellifera carnica</i> POLLM. . . . | 119        |
| <b>11 Zusammenfassung</b>  | <b>127</b> |
| <b>12 Summary</b>  | <b>133</b> |
| <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>139</b> |
| <b>Abkürzungen und Symbole</b>   | <b>155</b> |
| <br><b>Publikationsverzeichnis</b>   |            |





# 1 Einleitung

Biologisch relevante Oberflächen spielen in vielen Lebensbereichen eine entscheidende Rolle. Es gibt eine große Anzahl an Beispielen für wichtige Oberflächenphänomene. Eines dieser Beispiele ist der Stofftransport an Membranen, der für Atmung und Stoffwechsel von Bedeutung ist [1]. Ablagerungen an Blutgefäßen, die zu Herzinfarkt und Schlaganfall führen können, indem Blutgefäße durch Thrombosebildung verstopft werden, sind ein weiteres Beispiel [2]. Auch der Lotosblüten-Effekt, der an den Blättern der Lotosblüten entdeckt wurde und nun auch in der Technik für schmutzunempfindliche Oberflächen ausgenutzt wird, indem eine Nanostrukturierung die Schmutzablagerung verhindert, kann zu den Oberflächenphänomenen gezählt werden [3].

Die Adsorption von Proteinen auf Implantat-Oberflächen ist ein weiteres wichtiges Oberflächenphänomen. Die Proteinschicht ist von entscheidender Bedeutung für die Biokompatibilität der Oberflächen [4–6]. Sie sorgt dafür, dass Gewebezellen nach der Implantation auf dem Implantat anwachsen und es nicht zu Abstoßungsreaktionen durch den Organismus kommt [7]. Der Mechanismus der Proteinadsorption [8–15] ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei der Proteinadsorption kommt es zu Veränderungen in der Umgebung der Proteine, was sich unter anderem in Sekundärstrukturänderungen äußert [16–21]. Proteinstrukturänderungen können mit Hilfe der Raman-Spektroskopie detektiert werden [22–24]. Im ersten Teil dieser Arbeit wird die räumliche Verteilung von Fibrinogen und Fibronectin auf Titandioxid-Oberflächen mit der Laser-Raster-Mikroskopie und der Kraftfeldmikroskopie charakterisiert. Um Aussagen möglicher Strukturänderungen der Proteine während der Adsorption machen zu können, werden Raman-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Ein weiteres Beispiel für eine biologisch relevante Oberfläche ist die Wachs-Oberfläche von Bienenwaben. Für die Bienen stellt diese Oberfläche einen wichtigen Bestandteil ihrer Umgebung dar. In die Wabenzellen werden die Vorräte der Bienen eingelagert, die Larven entwickeln sich ebenfalls in Wabenzellen und auch die Kommunikation der Bienen über den Schwänzeltanz findet in einem bestimmten Bereich auf den Waben - dem sog. Tanzboden - statt [25–28]. Die Wachs-Oberfläche wird durch den Einsatz von Propolis - dem Kittharz der Bienen - modifiziert [29–32]. Die Verteilung von Propolis auf der Waben-Oberfläche und dessen Nutzen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird aber vermutet, dass die Waben-Oberfläche durch den Einsatz von Propolis dessen jeweiliger Aufgabe angepasst wird. Von den Brutwaben weiß man, dass sie durch die Auskleidung mit Propolis desinfiziert werden [27, 32, 33]. Über das auf den Stegen der Waben vorgefundene Propolis gibt es unterschiedliche Hypothesen. Eine Hypothese besagt, dass Propolis auf die Stege der Waben aufgebracht wird, um zu signalisieren, dass diese Wabe fertiggestellt ist [29, 30]. Eine neue Hypothese geht davon aus, dass durch den Einsatz des Propolis die Wabenstruktur verändert wird, um die Vibrationsweiterleitung beim Schwänzeltanz zu verbessern. Die Verteilung des Propolis auf der Waben-Oberfläche wird im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht. Wachs und Propolis sowie einige Harze, die als Propolis-Quelle in Frage kommen, werden zunächst Raman-spektroskopisch analysiert. Anschließend werden Bereiche der Waben-Oberflächen mit Raman-*Mapping* *abgescannt*. Es wird untersucht, ob es zu einer homogenen Durchmischung von Wachs und Propolis kommt oder ob Propolis in bestimmten Mustern in die Waben eingearbeitet bzw. auf diesen verteilt wird. Ist die Verteilung des Propolis bekannt, können weitere Überlegungen zum Nutzen von Propolis durch die Honigbienen gemacht werden.

Der Einsatz von mikroskopischen Methoden wie der Laser-Raster-Mikroskopie [34, 35] und der Kraftfeldmikroskopie [34, 36] ermöglicht eine sehr genaue Analyse der räumlichen Verteilung bestimmter Substanzen auf den untersuchten biologisch relevanten Oberflächen. Die Laser-Raster-Mikroskopie ist durch das Beugungslimit (Abbe-Limit) begrenzt, die Ortsauflösung liegt im Bereich der Anregungswellenlänge [34, 37]; bei der Kraftfeldmikroskopie liegt die Auflösung im Bereich von wenigen Nanometern. Die spektroskopischen Me-

---

thoden wie die Circular dichroismus-Spektroskopie [38] oder die Mikro-Raman-Spektroskopie [38–44] ermöglichen eine Analyse der Proben auf molekularem Niveau. Die Mikro-Raman-Spektroskopie ermöglicht die direkte Messung der biologischen Systeme. Es kann ohne Probenvorbereitung, die diese manipulieren würde, zerstörungsfrei gemessen werden [45–47]. Raman-Mapping ermöglicht es, ganze Bereiche der Oberflächen spektroskopisch zu erfassen [48–51].

Mit unterschiedlichen mikroskopischen und spektroskopischen Methoden erfolgt im Rahmen dieser Arbeit die Charakterisierung der biologisch relevanten Oberflächen. Dieses “Handwerkszeug” ermöglicht eine sehr differenzierte Betrachtung der hier untersuchten Systeme.



## 2 Spektroskopische Untersuchungsmethoden

In diesem Kapitel werden die Prinzipien der in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden erläutert.

Im ersten Teil der Arbeit, den Untersuchungen zur Adsorption biologisch relevanter Proteine auf Implantat-Oberflächen, wurden die Laser-Raster-Mikroskopie, die Kraftfeldmikroskopie, Circular dichroismus-Spektroskopie und die Mikro-Raman-Spektroskopie eingesetzt.

Im zweiten Teil der Arbeit, in dem die Zusammensetzung und räumliche Verteilung von Propolis in den Waben von Honigbienen untersucht wurde, wurden Mikro-Raman-Spektroskopie und Raman-Mapping angewendet.

## 2.1 Laser–Raster–Mikroskopie (LSM)

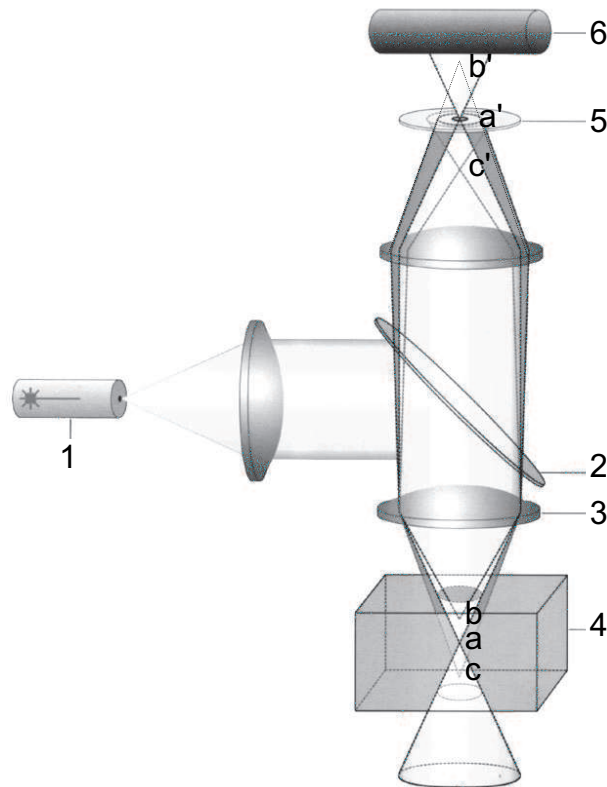
Die Laser–Raster–Mikroskopie beruht auf dem Prinzip der konfokalen Mikroskopie. In das Mikroskop wird ein Laser eingekoppelt. Dies ermöglicht sowohl Fluoreszenzaufnahmen als auch Reflexionsaufnahmen der zu untersuchenden Proben. Bei den Fluoreszenzaufnahmen wird das Fluoreszenzlicht detektiert, nicht aber das Laserlicht. Man erhält Aufnahmen zur räumlichen Verteilung der fluoreszenz–markierten Komponente. Bei den Reflexionsaufnahmen wird die Laserwellenlänge direkt detektiert. So erhält man Strukturinformationen der Probe (beispielsweise Informationen zur Rauigkeit einer Oberfläche).

Die konfokale Mikroskopie wurde in den 1970ern von Petran entwickelt [52]. Er baute das erste konfokale Mikroskop. Mit dem Aufkommen der Computertechnologie und preisgünstigen, starken Lasern setzte sich dann Mitte der 1980er das digital betriebene konfokale Laser-Raster-Mikroskop durch [37, 53, 54]. Auch für die Mikro-Raman-Spektroskopie ist die Anwendung des konfokalen Prinzips von Bedeutung [55]. Das erste konfokale Rastermikroskop wurde 1984 von Wilson und Sheppard entwickelt. Seit 1988 ist das konfokale Laser–Raster–Mikroskop (Laser–Scanning–Mikroskop LSM, engl: *laser scanning microscope*) LSM 10 der Firma Zeiss auf dem Markt [37, 54].

In Abb. 2.1 ist der Aufbau eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops dargestellt [56]. Über ein Mikroskop wird der Laserstrahl mit dem Mikroskopobjektiv (3) auf die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird über das selbe Mikroskopobjektiv gesammelt und gelangt über einen dichroitischen Spiegel (2), der die Anregungswellenlänge von der emittierten Fluoreszenzstrahlung trennt, zum Detektor (6). Zwischen Objektiv und dichroitischem Spiegel sorgt ein *Scanner* dafür, dass ein bestimmter Bereich der Probe abgescannt wird. In  $z$ -Richtung kann die Position der Probe mit Hilfe eines  $z$ -Motors (Piezokristall) variiert werden (4).

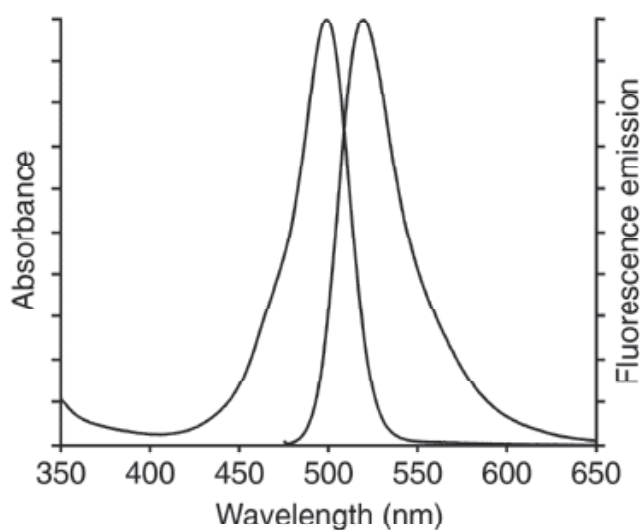
Eine vor dem Detektor eingesetzte Lochblende (5) erzeugt eine konfokale Abbildung der Probe.

Bei einem gewöhnlichen Lichtmikroskop ist die Tiefenschärfe des lichtmikroskopischen



**Abbildung 2.1:** Aufbau eines Laser-Raster-Mikroskops, schematisch. 1 Laser, 2 dichroitischer Spiegel (Farbteiler), 3 Mikroskop-Objektiv, 4 z-Motor (Piezokristall), 5 konfokale Blende, 6 Detektor (Photomultiplier). Nach [56].

Strahlengangs begrenzt. Bei dicken, durchstrahlbaren Objekten erhält man somit Informationen aus unterschiedlichen fokalen Ebenen, die sich überlagern und ein relativ unscharfes Bild liefern. Im konfokalen Lichtmikroskop werden daher die 3D-Objekte in einen Stapel optischer, konfokaler Schnittebenen zerlegt und somit nur die Informationen zur Generierung eines Bildes verwendet, die direkt im Fokus liegen. Das konfokale Prinzip kann man sich anhand der Abb. 2.1 verdeutlichen. Das Licht, das am Detektor ankommt, stammt aus genau einer Ebene der Probe (Ebene a). Das Bild, das in dieser Ebene liegt, wird in der Ebene der Lochblende (5) abgebildet (a') und gelangt vollständig zum Detektor. Die Bildinformationen unterhalb dieser Ebene (b) werden oberhalb der konfokalen Lochblende abgebildet (b'). Die Bildinformationen, die oberhalb dieser Ebene liegen, werden unterhalb der konfokalen Lochblende abgebildet. Diese Informationen werden ausgeblendet und



**Abbildung 2.2:** Absorptions- und Emissionsbanden des Farbstoffs Alexa. Nach [57].

gelangen nicht zum Detektor.

Da die Anregungswellenlängen der kommerziell erhältlichen Laser-Raster-Mikroskope im sichtbaren Wellenlängenbereich liegen, viele Moleküle (dazu gehören auch die Proteine) aber in diesem Bereich keine Absorptionsbanden aufweisen, werden häufig Farbstoffmoleküle, die ihre Absorptionsbanden im sichtbaren Wellenlängenbereich haben, kovalent an die zu untersuchenden Komponenten gebunden. Proteine haben Absorptionsbanden im UV-Bereich. Um eine Fluoreszenzanregung im sichtbaren Wellenlängenbereich zu erhalten, werden die Proteine mit Farbstoffmolekülen (beispielsweise Alexa) markiert.

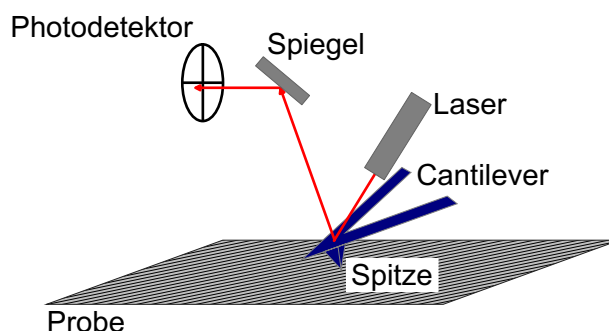


## 2.2 Kraftfeldmikroskopie (AFM)

Um eine Abbildung von Proben zu erhalten, die über das Beugungslimit (Abbe-Limit) hinausgeht, also bis in den Nanometerbereich, sind optische Methoden nur begrenzt einsetzbar. Eine Methode mit einer Auflösung in dieser Größenordnung ist die Kraftfeldmikroskopie (AFM, engl: atomic force microscopy) [58]. Der schematische Aufbau eines Kraftfeldmikroskops ist in Abb. 2.3 dargestellt. Eine feine Spitze, deren Größe im Nanometerbereich liegt und die an einem *Cantilever* befestigt ist, wird über die Probe geführt. Der *Cantilever* ist an einem Scanner befestigt, der über Piezokristalle gesteuert wird. Durch den Kontakt mit der Probe beim *Scan*-Vorgang (im Kontaktmodus) kommt es zu einer Durchbiegung des *Cantilevers*. Ein auf diesen gerichteter Laserstrahl wird reflektiert, mit einem Spiegel weitergeleitet, und trifft auf eine Vierfeld-Photodiode (Photodetektor). Die Auslenkung des *Cantilevers* führt zu einer Veränderung des Reflektionswinkels und somit zu einer Wanderung des Laserlichtflecks auf dem Detektor. Ein Regelkreis integriert dieses Signal und regelt über den vertikalen Piezo-Kristall die Auslenkung des *Cantilevers*. Das Spannungsdifferenzsignal des Photodetektors wird als Messsignal und empfindlicher Nachweis zur Auslenkung des *Cantilevers* genutzt.

Im *Contact Mode* befindet sich die Spitze des *Cantilevers* in direktem physikalischem Kontakt mit der Probenoberfläche. Außer topographischen können auch physikalische Informationen mit der Kraftfeldmikroskopie erhalten werden. Bei der *Modulated Force Mode* wird an den *Cantilever* ein 5-kHz-Signal angelegt. Aus den Änderungen des AC-Signals lassen sich Informationen über die Härteänderungen der Probe ableiten.

Als weiterer wichtiger Modus ist der *Non-Contact Mode* zu nennen. Der *Cantilever* wird dabei im Abstand von 10 bis 100 nm über die Probe bewegt. Er wird mit einer Amplitude von bis zu 10 nm nahe seiner Resonanzfrequenz (einige 100 kHz) angeregt. Kommt die Spitze des *Cantilevers* in die Nähe der Probenoberfläche, so beeinflussen die Anziehungskräfte die Schwingung des *Cantilevers*. Aus der Änderung der Amplitude bzw. Phasenverschiebung zwischen Anregungsschwingung und aufgenommener Schwingung können Aussagen zur Topographie der Probe gemacht werden, die durch Nachregeln des vertikalen Piezos



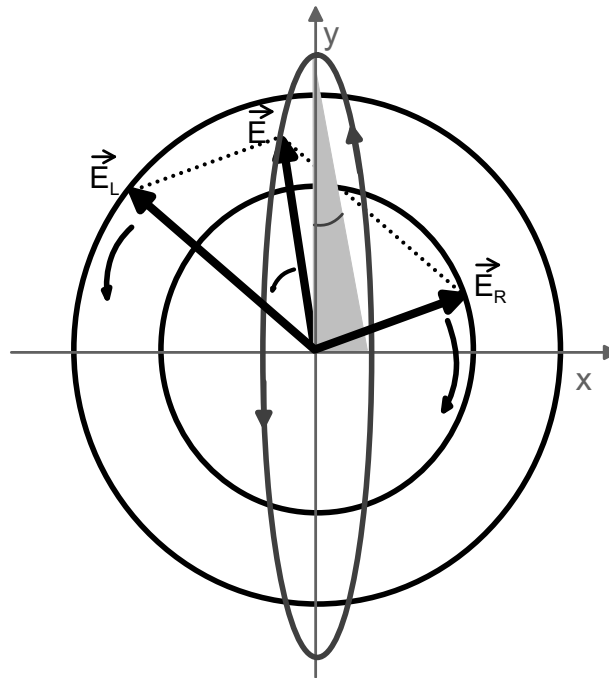
**Abbildung 2.3:** Schematischer Aufbau eines Kraftfeldmikroskops. Ein Piezo-gesteuerter Cantilever wird über die Probe bewegt. Ein Laserstrahl trifft auf welche die Spitze des Cantilevers. Auslenkungen in z-Richtung, die aufgrund der Struktur der Oberfläche von der Spitze des Cantilevers auf diesen übertragen werden, führen zu einem Auftreffen des Lasers an einer anderen Stelle des Detektors.

bei Messung der Rückkopplungsparameter “konstante Amplitude” bzw. “konstante Phase” aus der angelegten Spannung erhalten werden. Die Phasenverschiebung (bei Regelung über konstante Amplitude) charakterisiert die lokale Steifigkeit, Härte und Dämpfungseigenschaften der Probenoberfläche [57, 59].

## 2.3 Circular dichroismus–Spektroskopie (CD–Spektroskopie)

Die Circular dichroismus–Spektroskopie liefert Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen [19], wobei die Messung auf einer Wechselwirkung von zirkular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Molekülen beruht [38].

Zirkular polarisiertes Licht kommt durch die Überlagerung zweier um ein viertel der Wellenlänge gegeneinander phasenverschobener, linear polarisierter Wellen zustande. Der zirkular polarisierte Lichtstrahl kann durch einen elektrischen Feldvektor  $\vec{E}$  beschrieben



**Abbildung 2.4:** Zustandekommen der Elliptizität.  $\vec{E}_L$  und  $\vec{E}_R$  sind nach Durchtritt durch ein optisch aktives Medium unterschiedlich. Der Summenvektor  $\vec{E}$  beschreibt eine Ellipse. Diese ist durch den Winkel  $\Psi$  definiert, der durch das Verhältnis von kleiner zu großer Achse der Ellipse definiert ist.

werden, dessen Spitze eine Schraubenlinie beschreibt. Umgekehrt kann man sich einen linear polarisierten Lichtstrahl durch Überlagerung zweier zirkular polarisierter Strahlen entgegengesetzten Umlaufsinn, aber gleicher Wellenlänge entstanden denken (man spricht hierbei von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht).

Im Bereich einer Absorptionsbande eines chiralen Moleküls pflanzen sich links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht nicht nur unterschiedlich schnell fort, sondern sie werden auch verschieden stark absorbiert. Dadurch haben die Vektoren  $\vec{E}_L$  und  $\vec{E}_R$  nach Durchtritt durch das zu untersuchende Medium unterschiedliche Längen, der Summenvektor  $\vec{E}$  beschreibt jetzt eine Ellipse. In Abb. 2.4 ist das Zustandekommen der Elliptizität in der Vektordarstellung gezeigt.

Die Elliptizität der Welle ist durch den Winkel  $\Psi$  definiert, der durch das Verhältnis von kleiner zu großer Achse der Ellipse gegeben ist (vgl. Abb. 2.4).

Im CD-Spektrometer tritt linear polarisiertes Licht, das zuvor monochromatisiert wird, durch einen CD-Modulator, der periodisch mit der Modulationsfrequenz links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht generiert. Diese hochfrequente Modulation kann auf unterschiedliche Weise erreicht werden. Einerseits kann dies mit einem Quarzkristall erfolgen, der mit einer Wechselspannung entsprechender Frequenz zu Schwingungen angeregt wird (Piezo-Effekt) und dadurch seine Polarisations-Eigenschaften entsprechend ändert. Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung einer Pockels-Zelle, die durch Anlegen eines hochfrequenten Wechselfeldes (Spannungen um 1000 V ) eine adäquate Phasenverschiebung induziert (elektro-optischer Pockels-Effekt), um zwischen links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht hin und her zu schalten. Die Lichtintensitäten  $I_L$  und  $I_R$  werden nach dem Durchstrahlen der Probe im Takt des CD-Modulators über einen Photomultiplier detektiert.

Analog zum Lambert-Beer'schen Absorptionsgesetz ist die gemessene Differenz  $\Delta\varepsilon$  der links- und rechts-zirkularen Komponenten mit der molaren Elliptizität  $[\Theta]$  verknüpft:

$$[\Theta] = \frac{\Delta\varepsilon \cdot M_r}{c \cdot d} \quad [\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}] \quad (2.1)$$

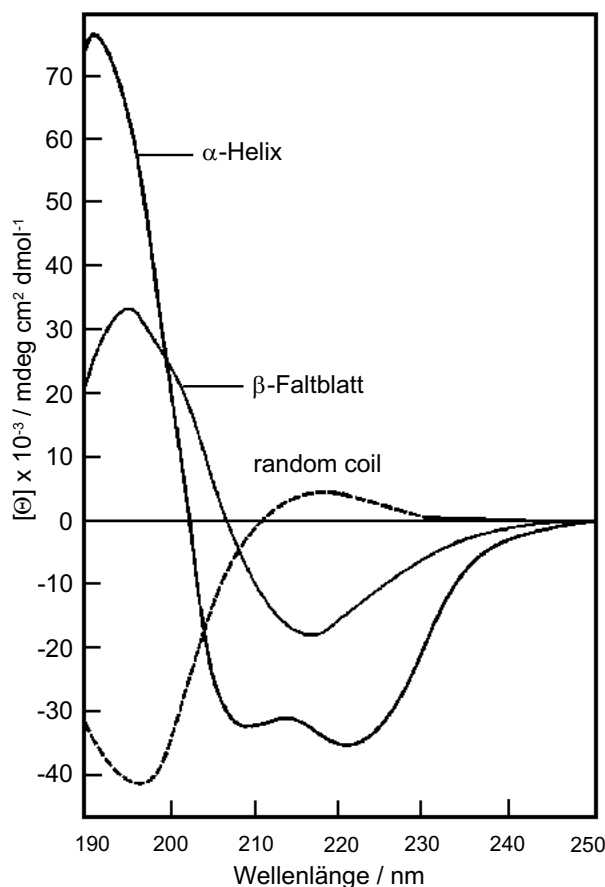
mit  $\Delta\varepsilon$  gemessene Elliptizität [mdeg],  
 $M_r$  Molekulargewicht [g/mol],  
 $c$  Proteinkonzentration [mg/ml],  
 $d$  Schichtdicke der Küvette [cm].

Es wird auch einfach die Elliptizität als Maß des CD wiedergegeben

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R. \quad (2.2)$$

In den CD-Spektren wird entweder die Änderung der molaren Elliptizität  $[\theta]$  oder die Elliptizität  $\Delta\varepsilon$  gegen die Wellenlänge aufgetragen.

In Abb. 2.5 sind charakteristische CD-Spektren von Proteinen, die aus reiner  $\alpha$ -Helix-Struktur,  $\beta$ -Faltblattstruktur und ungeordneter (*random coil*) Struktur bestehen, gezeigt.



**Abbildung 2.5:** Charakteristische CD-Spektren von reinen  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und ungeordneter Struktur (*random coil*), nach [60, 61].

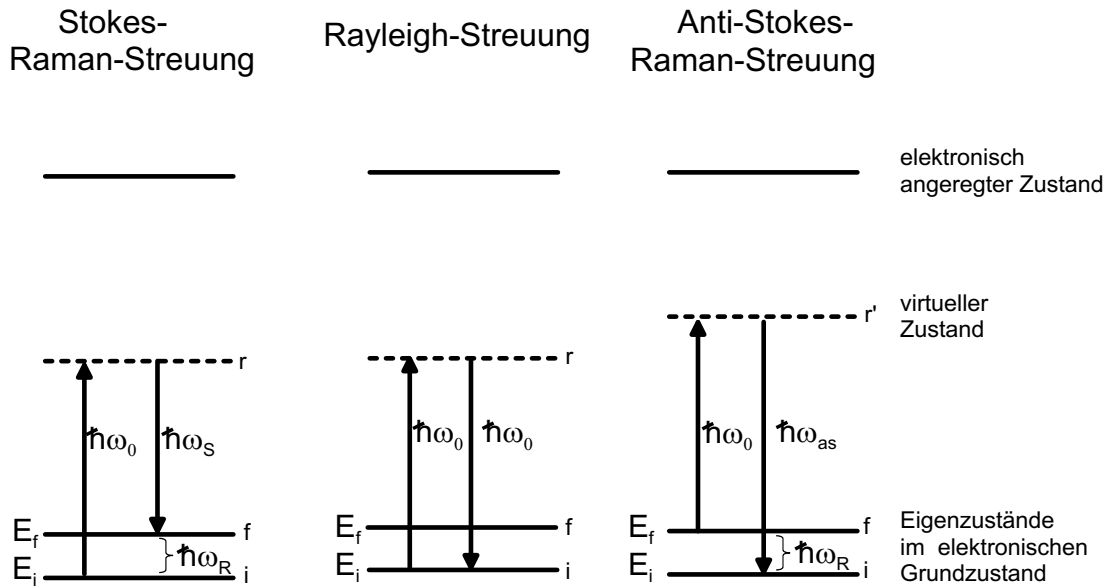
In den Spektren reiner helikaler Polypeptide ist eine positive CD-Bande bei 195 nm vorhanden. Zwei starke negative CD-Banden liegen bei 208 und 222 nm mit Werten bis ca.  $-40000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ . Bei reiner  $\beta$  Faltblattstruktur ist die positive CD-Bande bei 195 nm weniger stark ausgeprägt. Es liegt außerdem eine schwächere negative CD-Bande bei ca. 215 nm vor. Das CD-Spektrum einer ungeordneten *random coil* Struktur weist bei 195 nm eine negative CD-Bande auf, bei ca. 215 nm tritt eine positive CD-Bande auf [60–62]. Eine Interpretation von experimentellen Daten durch den Vergleich mit diesen Spektren liefert eine qualitative Abschätzung der vorliegenden Sekundärstruktur. Quantitative Aussagen sind mit Hilfe von statistischen Auswertprogrammen auch möglich, liefern aber kaum mehr Informationen und sind sehr aufwendig.

## 2.4 Raman–Spektroskopie

Die Raman–Spektroskopie ist eine Schwingungs–spektroskopische Methode. Neben der elastischen Rayleigh–Streuung wird auch eine inelastische Raman–Streuung beobachtet, die durch eine zeitliche Änderung der Polarisierbarkeit des Moleküls hervorgerufen wird. Es werden auch Rotationen angeregt, die jedoch spektral nicht aufgelöst werden können. Das Raman–Spektrum liefert einen “Fingerabdruck” des Moleküls, dem Informationen über Bindungen im Molekül und Wechselwirkungen mit anderen Molekülen entnommen werden können. Das Phänomen der Raman–Streuung wurde erstmals 1928 von Raman und Krishnan beobachtet, nachdem es bereits 1923 von Smekal theoretisch vorhergesagt wurde. Seit Beginn der Anwendung der Raman–Spektroskopie haben sich durch die ständige Weiterentwicklung der apparativen Ausstattung die Anwendungsmöglichkeiten immer weiter entwickelt. Bis vor 25 Jahren wurde die Raman–Spektroskopie nur für “*Bulk*”–Proben verwendet. Durch den Einsatz von Lasern als Anregungslichtquellen wurde es möglich, durch Einkoppeln des Laserstrahls in ein Lichtmikroskop (so genanntes Mikro–Raman) gezielt auf bestimmte Bereiche der Probe zu fokussieren. Man erhält spektroskopische Informationen zur Verteilung bestimmter Komponenten der Proben bei einer gleichzeitig sehr guten räumliche Auflösung. Da bei der Mikro–Raman–Spektroskopie elektromagnetische Strahlung detektiert wird, ist die Auflösung, wie bei der Laser–Raster–Mikroskopie, vom Beugungslimit (Abbe–Limit) begrenzt [48, 49, 63].

Bei der Rayleigh–Streuung  $\omega = \omega_0$  bleibt die Frequenz des eingestrahlt Lichts konstant. Bei der Raman–Streuung unterscheidet man die Stokes–Streuung  $\omega_s < \omega_0$  (Frequenz–Verschiebung zu kleineren Energien) von der Anti–Stokes–Streuung  $\omega_s > \omega_0$  (Frequenz–Verschiebung zu höheren Energien). Die Größe der Frequenz–Verschiebung ist dabei unabhängig von der Frequenz des Primärlichts. Sie hängt ausschließlich von den Moleküleigenschaften ab. Eine schematische Darstellung der Energiezustände bei der Rayleigh– und Raman–Streuung ist in Abb. 2.6 gezeigt.

Bei der Stokes–Raman–Streuung beträgt die Energiedifferenz  $\hbar\omega_R$  der Differenz der Schwingungsniveaus  $E_f$  und  $E_i$ . Man kann die Stokes–Raman–Streuung auch beschreiben



**Abbildung 2.6:** Energiezustände bei der Rayleigh- und Raman-Streuung in schematischer Darstellung. Bei der Raman-Streuung kann die Wellenlänge des Anregungslasers entweder zum langwelligen Spektralbereich (Stokes-Raman-Streuung) bzw. zum kurzwelligen Spektralbereich (Anti-Stokes-Raman-Streuung) verschoben sein. (nach [64]).

als:

$$\hbar\omega_S = \hbar\omega_0 - \hbar\omega_R. \tag{2.3}$$

Die Anti-Stokes-Raman-Streuung kann man analog als

$$\hbar\omega_{aS} = \hbar\omega_0 + \hbar\omega_R \tag{2.4}$$

formulieren.

Bei der klassischen Beschreibung des Raman-Effekts geht man zunächst von folgenden Beziehungen aus:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cdot \cos \omega_0 t \tag{2.5}$$

und

$$\vec{\mu} = (\alpha) \cdot \vec{E}. \quad (2.6)$$

$\vec{E}$  beschreibt das elektrische Feld der einfallenden Lichtwelle und  $\vec{\mu}$  ist das induzierte Dipolmoment, das durch das Produkt aus dem Polarisierbarkeitstensor  $(\alpha)$  und dem Vektor des einfallenden elektrischen Feldes  $\vec{E}$  (Beschreibung eines elektromagnetischen Feldes) definiert wird. Der Polarisierbarkeitstensor  $(\alpha)$  ist abhängig von der Ortsvariablen  $q$ . Diese beschreibt die Schwingung der Bindungen des Moleküls bei der Raman-Streuung.

$$q = q_0 \cos \omega_R t. \quad (2.7)$$

Durch diese beiden Gleichungen kann unter Einbeziehung weiterer Annahmen die klassische Beschreibung des Raman-Effekts erfolgen als:

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos \omega_0 t + \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos(\omega_0 - \omega_R) t + \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos(\omega_0 + \omega_R) t. \quad (2.8)$$

Der erste Term beschreibt dabei das inelastisch gestreute Licht der Rayleigh-Streuung. Der zweite und dritte Term beschreiben das elastisch gestreute Licht der Stokes-Raman-Streuung (zu niedrigerer Energie verschoben) und der Anti-Stokes-Raman-Streuung (zu höherer Energie verschoben).

## 2.5 Raman-Mapping

Die Mikro-Raman-Spektroskopie lässt sich durch den Einsatz von elektronisch ansteuerbaren xy-Mikroskopischen erweitern. Durch dieses so genannte Raman-*Mapping* ist es möglich, auch größere Bereiche der Probe spektral zu erfassen. Dies hat gegenüber herkömmlichen mikroskopischen Methoden wie der Lichtmikroskopie, aber auch sehr hoch

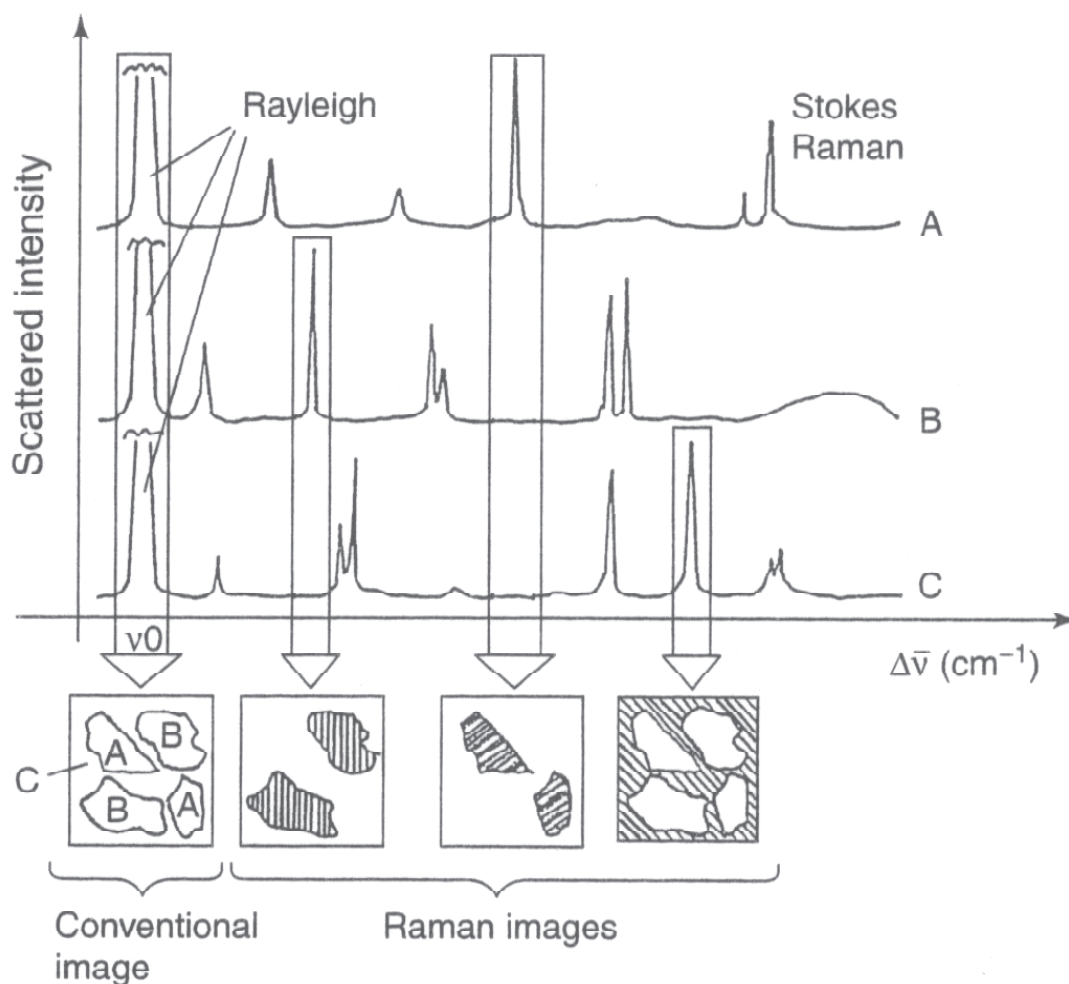


auflösenden Techniken wie der Kraftfeldmikroskopie oder der Elektronen-Raster-Mikroskopie, die lediglich Informationen über die Struktur und Topographie der Proben liefern, den Vorteil, Daten zur chemischen Zusammensetzung der Proben zu liefern.

In Abb. 2.7 ist das Prinzip des Raman-*Mapping* dargestellt. Bei dieser Methode werden Punkt für Punkt definierte Bereiche der Probe abgescannt. An jeder angesteuerten Probenposition wird ein Raman-Spektrum aufgenommen. Man erhält so eine räumliche Abbildung der in einer Probe vorkommenden unterschiedlichen Komponenten, wobei das Unterscheidungskriterium der einzelnen Bereiche, in denen bestimmte Substanzen vorkommen, das jeweils vorliegende Raman-Spektrum ist.

Unter Verwendung einer Auswahl an für die jeweilige Verbindung charakteristischen Raman-Banden (so genannte Markierungsbanden), die nicht mit Banden anderer in der Probe vorliegenden Verbindungen überlappen, erhält man somit eine graphische Darstellung der räumlichen Verteilung von einzelnen Komponenten, sozusagen eine mikroskopische "molekulare" Karte der Probe. Die Darstellung erfolgt als Falschfarben-Grafik, welche die Verteilung der Bandenintensitäten für den *gescannten* Bereich wiedergibt. Hohe bzw. niedrige Intensitäten werden dabei mit bestimmten Farben kodiert. So können die in Abb. 2.7 dargestellten Bereiche A, B und C der Probe den Spektren A, B und C zugeordnet werden [48–51].

Eine dem Raman-*Mapping* ähnliche Methode, bei dem ebenfalls eine räumliche Abbildung der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung einer Probe erzielt wird, ist das Raman-*Imaging*. Bei dieser Methode wird im Gegensatz zum Raman-*Mapping* nicht Punkt für Punkt gemessen, sondern ein größerer Bereich der Probe simultan erfasst. Die Daten werden mit Hilfe eines zweidimensionalen CCD-Detektors (*charge coupled device*) aufgenommen. Die Auswertung erfolgt über eine speziell angepasste Software [65–67].



**Abbildung 2.7:** Prinzip des Raman-*Mapping*, nach [48]. Beim Raman-*Mapping* können die Strukturen A, B und C, die durch konventionelle konfokale Mikroskopie zwar als unterschiedliche Strukturen erkannt werden, als chemisch unterschiedliche Komponenten aufgelöst werden. Es wird jeweils ein für die entsprechende Substanz charakteristischer Peak ausgewählt.

# Teil I

## Adsorption biologisch relevanter Proteine auf Implantat–Oberflächen



### 3 Einleitung und Zielsetzung Teil I

Im Teil I dieser Arbeit werden Untersuchungen zur Adsorption der Proteine Fibronektin, Fibrinogen und Albumin auf dem Implantatmaterial Titandioxid vorgestellt.

Fibronektin ist ein Protein der extrazellulären Matrix [68]. Im tierischen Gewebe verbindet dieses Protein Gewebezellen und Kollagenfasern, was dem Gewebe eine bestimmte Festigkeit verleiht [69]. Fibrinogen und Albumin kommen im Blut vor [2, 70]. Die Adsorption von Proteinen auf Implantat-Oberflächen spielt eine wichtige Rolle bei der Implantation. Eine gute Gewebeverträglichkeit eines Implantat-Materials liegt dann vor, wenn Proteine auf den Oberflächen adsorbieren [4, 5, 71]. Dann können die Zellen auf dem Implantat anwachsen. Die Verbindung zwischen auf dem Implantat adsorbierten Proteinen und den Zellen des umliegenden Gewebes erfolgt über die RGD-Sequenz (bestehend aus den drei Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D)) [72–75], die mit den Integrin-Rezeptoren auf den Zelloberflächen in Wechselwirkung tritt [6, 76, 77].

Eine homogene Verteilung der Proteine auf den Implantat-Oberflächen ist wichtig für eine gute Biokompatibilität, d. h. eine Integration des Implantats in die Gewebe ohne dass es dabei zu Abstoßungsreaktionen kommt [5, 71, 78, 79]. Die räumliche Verteilung der Proteine auf der Implantat-Oberfläche wird mit unterschiedlichen mikroskopischen Methoden untersucht.

Die Verteilung fluoreszenzmarkierter Proteine in biologischer Umgebung wird mit der Laser-Raster-Mikroskopie (LSM) untersucht. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Proteine in dem zu untersuchenden System direkt “sichtbar” gemacht werden. Auch die Oberflächenmorphologie der Implantat-Materialien kann mit der LSM, im Reflexionsmo-

aus, dargestellt werden. Die Proteinadsorption wird dabei qualitativ analysiert. Herkömmliche Methoden geben meist einen quantitativen Überblick. Diese erfordern in den meisten Fällen die Entfernung der Proteine aus ihrer natürlichen Umgebung. Eine räumliche Darstellung der Proteinverteilung auf den Oberflächen ist mit diesen Methoden nicht möglich.

Es wird außerdem untersucht, welche Seitengruppen für die Adsorption wichtig sind und ob es zu strukturellen Änderungen der Proteinkonformation kommt. Es wird vermutet, dass die Proteinadsorption über negativ geladene Seitengruppen der Proteine verläuft [8, 11]. Die Carboxylreste der Asparaginsäure und der Glutaminsäure kommen hierfür in Betracht. Außerdem wird vermutet, dass es bei der Adsorption der Proteine zu einer Sekundärstrukturänderung von der  $\alpha$ -helikalen zur  $\beta$ -Faltblattstruktur kommt [16–21]. Um diese Frage zu klären werden diese Veränderungen auf molekularer Ebene mittels Raman-Spektroskopie analysiert. Die Mikro-Raman-Spektroskopie eignet sich sehr gut zur Analyse biologischer Proben, wie sie die Proteine darstellen. Es können sowohl Änderungen in der Sekundärstruktur der Proteine als auch Änderungen in deren Umgebung Raman-spektroskopisch erfasst werden [22–24].

Die Zielsetzung dieses Teils der Arbeit ist, den Adsorptionsprozess der Proteine zu analysieren. Wenn man ein System versteht, kann man an bestimmten Stellen gezielt eingreifen und Veränderungen hervorrufen. Das Fernziel ist, Implantat-Materialien so zu verändern, dass die Biokompatibilität der Materialien weiter verbessert wird, um eine noch geringere Abstoßungsrate zu erhalten.

## 4 Grundlagen

In diesem Kapitel werden die Grundlagen, die bei der Implantation von Bedeutung sind, erläutert. Es wird auf den Aufbau der Gewebe eingegangen, in die ein Implantat eingebracht werden kann. Die Vorgänge, die sich an der Grenzfläche zwischen Implantat-Oberfläche und Gewebezellen abspielen, werden dargestellt. Im Anschluss daran wird erläutert, welche Methoden derzeit zur Untersuchung der räumlichen Verteilung von Proteinen auf Implantat-Oberflächen und zur Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen eingesetzt werden. Auf die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wird ebenfalls eingegangen.

### 4.1 Implantate im Kontakt mit biologischem Gewebe

Für die Implantation eines Biomaterials bzw. Implantats in einen Organismus sind die Vorgänge, die sich zwischen Implantatoberfläche und Gewebe abspielen, von großer Bedeutung. Wird das Implantat vom Organismus als “körperfremd” identifiziert, kommt es zu Abstoßungsreaktionen. Gilt es als “körpereigen”, so spricht man von einer guten Gewebeverträglichkeit bzw. Biokompatibilität des Implantat–Materials.

Die Prozesse, die bei der Implantation von Bedeutung sind, sind noch nicht bis ins letzte Detail verstanden. Man erhofft sich durch ein möglichst umfassendes Verständnis der Vorgänge, die an den Implantat–Oberflächen stattfinden, weitere Erfolge in der Implantationsmedizin.

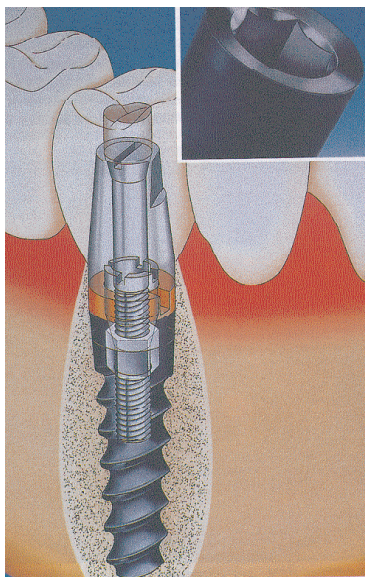
Bisher ist bekannt, dass ein wichtiger Schritt bei der Implantation die Adsorption von Proteinen auf den Implantatoberflächen ist [4, 5]. Auch die Korrosionsbeständigkeit des Implantat–Materials ist von Bedeutung, da Korrosionsprodukte toxisch wirken [80].

Um zu verstehen, welche Rolle die Proteine bei der Definition von “körperfremd” und “körpereigen” spielen, wird im Folgenden kurz erläutert, wie Gewebe aufgebaut sind und welche Komponenten des Gewebes bei der Implantation von Bedeutung sind.

Man unterscheidet vier Grundtypen von Geweben: Epithelgewebe, Binde- und Stützgewebe, Muskelgewebe und Nervengewebe. Eine häufige Form der Implantate sind Knochenimplantate. Beispiele hierfür sind Zahnimplantate, die im Kieferknochen verankert werden (vgl. Abb. 4.1) oder Nägel, die bei komplizierten Knochenbrüchen verwendet werden [81].

Das Knochengewebe stellt eine spezielle Form des Bindegewebes dar. Das Hauptmerkmal des Bindegewebes sind die großen Zellzwischenräume, in denen die extrazelluläre Matrix liegt. Sie besteht aus einer Grundsubstanz und Fasern. Die Knochenzellen (Osteoblasten, Osteocyten und Osteoklasten) sind in die extrazelluläre Matrix eingebettet [83], Kollagenfasern dienen der Festigung des Gewebes. Die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und den wichtigen Nährstoffen wird durch Blutgefäße gewährleistet. Die extrazelluläre Matrix enthält im Wesentlichen drei Proteinkomponenten: die hoch viskosen Proteoglyka-

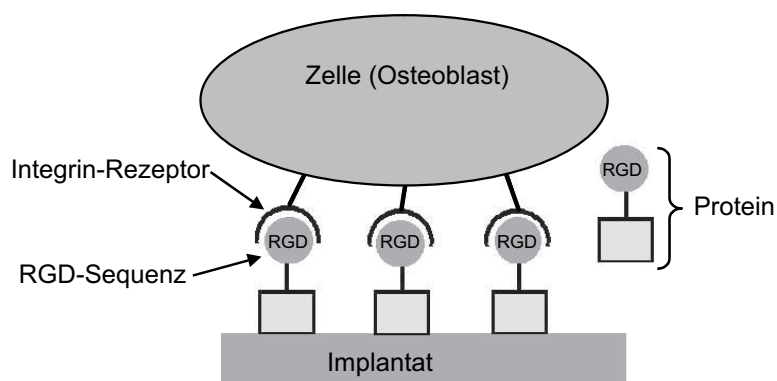




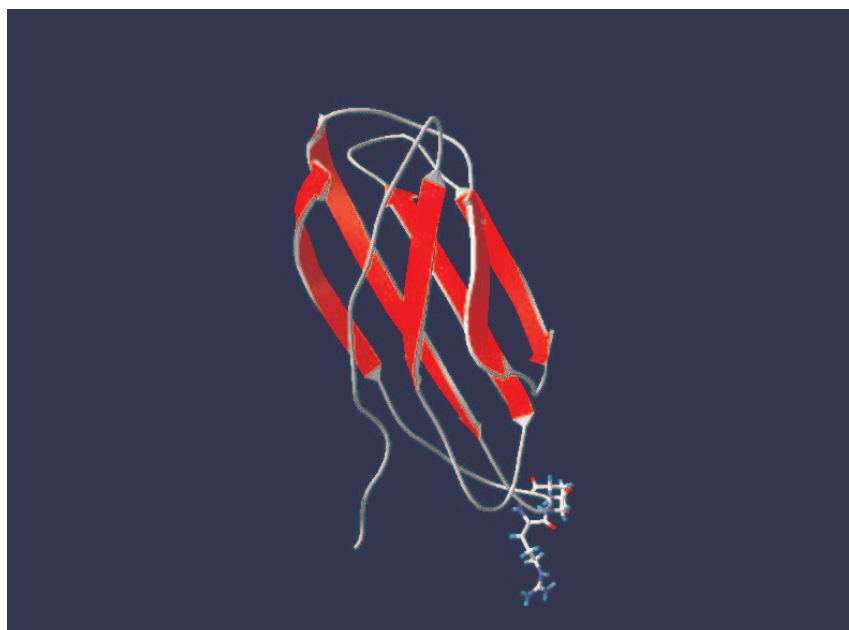
**Abbildung 4.1:** Zahnimplantat, eingebracht in den Kieferknochen (nach [82]).

ne, welche die Zellen einhüllen, die unlöslichen Kollagenfasern, die Stärke und Spannkraft verleihen und die löslichen Multiadhäsionsmatrixproteine (z. B. Fibronectin und Vitronectin). Diese Proteine stellen im Gewebe eine Verbindung zwischen den Kollagenfasern und den Zellen über die sich auf der Zelloberfläche befindenden Rezeptoren (Integrine) her [68, 81, 83].

Auch für die Implantation sind diese Proteine von Bedeutung. Abbildung 4.2 veranschaulicht die Rolle der Proteine bei der Implantation in einem einfachen Modell. In diesem Fall adsorbieren die Proteine der extrazellulären Matrix auf den Implantat-Oberflächen. Eine bestimmte Sequenz der Proteine, die RGD-Sequenz, die aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure (Arg = R, Gly = G, Asp = D) besteht, ist die minimale essentielle Komponente, die von den Integrinrezeptoren, die auf der Zelloberfläche sitzen, erkannt wird. Es kommt zu einer Verbindung dieser beiden Strukturen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip [72–75]. Die Proteine Fibronectin und Fibrinogen enthalten diese Sequenz [72, 84]. Durch die Proteine kann eine Verbindung zwischen dem Implantat-Material und den Gewebezellen hergestellt werden.



**Abbildung 4.2:** Einfaches Modell für die Rolle der Proteine bei der Implantation. Das Protein adsorbiert auf der Implantat-Oberfläche. Die RGD-Sequenz wird von den Integrin-Rezeptoren der Zellen erkannt. Eine Verbindung zwischen dem Implantat und den Zellen des Gewebes kann somit erfolgen.



**Abbildung 4.3:** Modell eines Fragments des Fibronektin-Moleküls. Die Aminosäuren der RGD-Sequenz sind als Einzelbausteine hervorgehoben. Das restliche Proteinmolekül ist in der Sekundärstruktur dargestellt. Nach Main et al. [85].

Abbildung 4.3 zeigt ein Fragment des Fibronectinmoleküls, das *Tenth Type III Module* [85]. Der Abbildung liegen Röntgenstrukturdaten zugrunde. Das Proteinmolekül ist in der Sekundärstruktur dargestellt. Die Aminosäuren der RGD-Sequenz sind als Einzelbausteine hervorgehoben. Diese liegen an einer exponierten Stelle des Moleküls. Bei einer Adsorption des Proteins ist davon auszugehen, dass sich diese Sequenz so orientiert, dass sie von der Oberfläche wegweist, von den Integrinrezeptoren erkannt und mit diesen eine Verbindung eingehen kann.

## 4.2 Proteinadsorption auf Titan-Implantaten

Für die Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit zur Proteinadsorption gemacht wurden, wurde Titan als Implantatmaterial verwendet. Titan findet einen breiten Einsatz in der medizinischen Anwendung [86–89]. Beispiele für Titanimplantate sind Gelenkersatzteile, Fixiermaterialien für Knochen (z. B. Nägel), Zahnimplantate, Herzschrittmachergehäuse oder auch künstliche Herzklappen [80]. Titan zeichnet sich besonders durch seine chemische Inertheit und sehr gute Biokompatibilität aus [90–92]. Einer der Hauptgründe dafür ist, dass sich an der Luft spontan eine Oxidschicht von etwa 5-6 nm auf dem Titan bildet [93], wodurch das Titan passiviert wird, d.h. durch diese dünne Oxidschicht ist das Material vor weiterer Korrosion geschützt. Die Oberfläche von Titan besteht also aus Titandioxid. Deshalb wird im Verlauf dieser Arbeit häufig von der Titandioxid-Oberfläche als Implantatoberfläche gesprochen.

Da die Proteinadsorption auf Implantat-Oberflächen seit vielen Jahren mit unterschiedlichen Methoden untersucht wird, sind einige Theorien über den Mechanismus dieses Adsorptionsprozesses vorhanden. So wurde auch der Mechanismus der Proteinadsorption auf der Titan- bzw. Titandioxidoberfläche in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben [8–15]. Die Oberfläche von Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) besitzt wegen der hohen Elektronegativität des Sauerstoffs eine negative Partialladung. Kalzium oder andere Kationen des

umgebenden Mediums (Serum, physiologische Lösung oder Pufferlösung) können mit  $\text{TiO}_2$  Komplexe bilden. Kalzium kann nun wiederum negativ geladene Makromoleküle oder Proteine selektiv an die Werkstoffoberfläche binden. Als negative Ladungen kommen bei den natürlich vorkommenden Proteinen vor allem die deprotonierten Carboxylgruppen der C-terminalen Aminosäure sowie der Seitengruppen der Asparagin- sowie der Glutaminsäure in Frage [94].

### 4.3 Die räumliche Verteilung von Proteinen auf Implantat–Oberflächen

Wie in Kapitel 4.1 erläutert wurde, ist die Proteinschicht, die sich auf einem Implantat ausbildet, sobald die Implantat–Oberfläche mit dem Gewebe in Kontakt kommt, von großer Bedeutung für die Biokompatibilität dieses Implantats. Meist wird bei Untersuchungen zur Proteinadsorption auf Implantat–Oberflächen quantitativ bestimmt, welche Proteinmenge adsorbiert vorliegt. Dazu gibt es verschiedene Assays, beispielsweise den Bradford–Assay, bei dem die Proteine nach der Adsorption enzymatisch von der Oberfläche gelöst werden. Dieser Lösung wird ein Farbstoff zugegeben. Die Farbstoffmoleküle binden kovalent an bestimmte funktionellen Gruppen des Proteins. Durch die Ankopplung an das Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs. Photometrisch kann nun die Proteinkonzentration der erhaltenen Lösung bestimmt werden.

Es werden auch Methoden zur direkten Untersuchung der Proteinadsorption auf Implantat–Oberflächen beschrieben [95, 96]. Hierzu werden überwiegend zwei Arten von Techniken genutzt: Optische Methoden wie die Ellipsometrie [97] sowie Markierungsmethoden wie die radioaktive Markierung [98]. Auch mit diesen Techniken werden quantitativ die adsorbierten Proteinmengen bestimmt. Bei den meisten optischen Methoden können nur sehr glatte Oberflächen untersucht werden [99] und bei radioaktiven Mar-

kierungsmethoden besteht der Nachteil, dass diese für den Anwender gesundheitlich nicht unbedenklich sind. Es soll hier eine Methode, die diese Probleme umgeht und mit der qualitative Informationen über die räumliche Verteilung der adsorbierten Proteine erhalten werden, vorgestellt werden: die Laser–Raster–Mikroskopie (Laser–Scanning–Mikroskopie, LSM).

Die LSM liefert qualitative Informationen zu der adsorbierten Proteinschicht. Sie kann auch bei rauen Oberflächen angewendet werden und eine radioaktive Markierung ist nicht notwendig. Diese Technik wird seit den 1980er Jahren genutzt, um überwiegend biologische Systeme zu untersuchen [35]. Eine direkte Detektion der adsorbierten Proteine auf der Implantatoberfläche ist mit dieser Methode möglich. Außerdem erhält man sehr gute Aufnahmen zur Oberflächenmorphologie.

Eine weitere Methode, mit der sich die räumliche Verteilung von Proteinen auf Implantat–Materialien untersuchen lässt, ist die Kraftfeldmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) [36]. Die AFM–Aufnahmen liefern Informationen über die Topographie der untersuchten Oberfläche. Durch die Verwendung spezieller AFM–Methoden beispielsweise Kraft–Modulations–Messungen (*modulation force measurements*) können weitere Informationen wie die relative “Weichheit” unterschiedlicher Komponenten gewonnen werden. Derartige Messungen ermöglichen beispielsweise die Unterscheidung von Substrat und adsorbierten Proteinen.

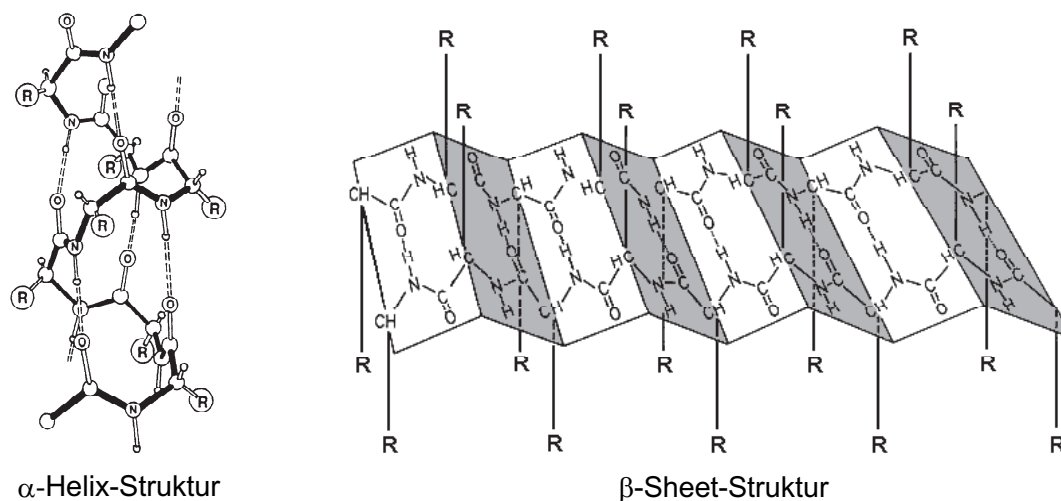
Sowohl LSM als auch AFM haben Vor– und Nachteile bei der Anwendung auf das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte System. Der Vorteil der Laser–Raster–Mikroskopie liegt vor allem darin, dass mit dieser Methode in kurzer Zeit große Bereiche der Probe untersucht werden können. Ein Nachteil liegt in der Begrenzung der Auflösung nach dem Abbe–Limit (diese liegt in der Größenordnung der Anregungswellenlänge). Bei der Kraftfeldmikroskopie ist eine Auflösung bis hin zu wenigen Nanometern möglich. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nur kleine Bereiche abgebildet werden können. Die Messungen dauern dabei relativ lange. Um die Vorteile beider Methoden für die selbe Probe nutzen zu können, ist eine Kombination dieser Techniken möglich, was bereits in der Literatur beschrieben wurde [100,101]. So können große Bereiche mit LSM untersucht werden und

ausgewählte Regionen in hoher Auflösung mit AFM abgebildet werden.

## 4.4 Strukturelle Änderungen von Proteinen

Eine Thematik von besonderem Interesse bei der Adsorption von Proteinen auf Implantatoberflächen ist die Frage, inwiefern es im Verlauf der Proteinadsorption zu strukturellen Veränderungen in der Proteinkonformation kommt [16, 17, 102].

Man unterscheidet verschiedene Proteinkonformationen. Die Primärstruktur der Proteine wird durch die Aminosäuresequenz festgelegt. Das Faltungsmuster der Proteine wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Die Sekundärstruktur kommt z. T. durch Disulfidbrücken zustande, wird aber hauptsächlich durch die Starrheit der Amidbindung und der Maximierung der Wasserstoffbrücken und anderen nichtkovalenten Bindungen entlang der Ketten festgelegt. Drei mögliche Anordnungen der Sekundärstruktur sind die  $\alpha$ -Helix-Struktur, die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur und die *random coil*-Struktur.



**Abbildung 4.4:** Anordnung der Atome in der Sekundärstruktur eines Proteins. Die am häufigsten vorkommenden Konformationen sind die  $\alpha$ -Helix-Struktur (nach [103]) und die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (nach [104]).

Bei der  $\alpha$ -Helix-Struktur bilden sich intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen nahe beieinanderliegenden Aminosäuren in der Kette aus. Jede Windung der  $\alpha$ -Helix besteht aus 3,6 Aminosäuren, zwei äquivalente Punkte an aufeinanderfolgenden Windungen sind etwa 540 pm voneinander entfernt.

In der  $\beta$ -Faltblatt-Konfiguration sind zwei Ketten so angeordnet, dass jeweils die Aminogruppe einer Peptidbindung gegenüber der Carbonylgruppe einer anderen liegt, so dass sich zwischen beiden Gruppen Wasserstoffbrücken ausbilden können. In dieser Konfiguration stehen benachbarte Ebenen, die durch die drei Atome (C, O, N) festgelegt werden, in einem bestimmten Winkel zueinander, wodurch die Faltblattstruktur entsteht. Die *random coil*-Struktur bezeichnet Bereiche, die weder der  $\alpha$ -Helix-Struktur noch der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur zugeordnet werden können.

Die Sekundärstruktur spielt auch bei der Proteinadsorption eine Rolle. Wenn man davon ausgeht, dass die Proteinadsorption über bestimmte Seitengruppen erfolgt, dann steht die Überlegung an, wieviel Prozent aller Seitengruppen bei einer gegebenen Sekundärstruktur zu einer Oberfläche weisen und mit dieser in Kontakt treten könnte. Bei der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur sind dies 50 % aller Seitenketten, bei der  $\alpha$ -Helix-Struktur besteht eine Umdrehung aus 3,6 Aminosäuren, d.h. dass etwa 28 % aller Seitenketten in dieselbe Richtung weisen. Für eine Adsorption von Proteinen auf Implantat-Oberflächen ist es also von Vorteil, wenn eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur des Proteins vorliegt.

Weitere Konformationen von Proteinen sind die Tertiär- und die Quartärstruktur. Die Tertiärstruktur von Proteinen entsteht durch weiteres Falten, Verknäulen (sog. *coiling*) oder andere Aggregate von Polypeptiden. Einige Moleküle besitzen auch eine Quartärstruktur, in der zwei oder mehrere Aminosäureketten, jede mit ihrer eigenen Tertiärstruktur, miteinander eine größere Anordnung bilden. Ein Beispiel hierfür ist Hämoglobin, das aus vier Ketten besteht.

Es wird vermutet, dass es während der Adsorption zu Veränderungen in der Sekundärstruktur des Proteins kommt. Der Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur nimmt ab und der Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Struktur nimmt zu [16–18].

Ein weiterer interessanter Aspekt ist herauszufinden, ob die Adsorption der Proteine über bestimmte Seitenketten oder über das Proteinrückgrat erfolgt. Um Informationen über die strukturellen Änderungen der Proteinstruktur zu untersuchen, eignen sich besonders Schwingungs-spektroskopische Methoden wie beispielsweise ATR (*attenuated total reflection*)-FTIR (*fourier transform infrared spectroscopy*)- [17, 18, 105, 106] und die Raman-Spektroskopie [22–24]. IR- und Raman-Spektroskopie liefern komplementäre Ergebnisse. Bei Messungen in wässrigen Systemen tritt bei der IR-Spektroskopie das Problem auf, dass Wasser sehr breite Banden liefert, die das eigentliche Signal teilweise überlagern können. Bei der Raman-Spektroskopie tritt dieses Problem nicht auf. Sie eignet sich daher sehr gut für die Analytik wässriger Systeme, wie es die Analyse der strukturellen Änderung von Proteinen auf Implantat-Materialien darstellt. Mit Hilfe der Raman-Spektroskopie ist es möglich, Konformationsänderungen von Proteinen zu messen [107–110].



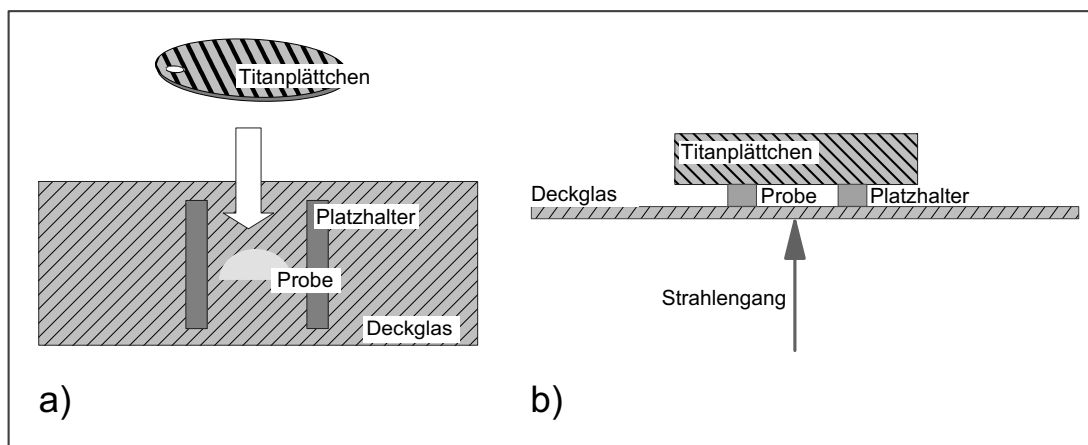
# 5 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden die Geräte und Messanordnungen, die für die einzelnen Experimente verwendet wurden, beschrieben. Die Proben sowie deren Präparation werden ebenfalls erläutert.

## 5.1 LSM–Untersuchungen von fluoreszenzmarkierten Proteinen auf Implantat–Materialien

### 5.1.1 Laser–Raster–Mikroskop und Messanordnung

Die Messungen wurden mit dem Laser-Raster-Mikroskop LSM 410 (Zeiss) durchgeführt, das mit einem invertierten Mikroskop (Axiovert 100) ausgestattet ist. Als Mikroskopobjektiv wurde ein Arcoplan LS 40x (NA 0,6) verwendet. Bei einem Durchmesser der konfokalen Lochblende von 118  $\mu\text{m}$  beträgt die Fokustiefe in wässrigem Medium etwa 3,8  $\mu\text{m}$  für die Reflexionsaufnahmen (633 nm Anregungswellenlänge, Helium–Neon–Laser) und etwa 5,4  $\mu\text{m}$  für die Fluoreszenzaufnahmen (488 nm Anregungswellenlänge, Argon–Ionen–Laser). Als Emissionsfilter wurde bei dieser Anordnung ein Filter für den Wellenlängenbe-



**Abbildung 5.1:** Experimenteller Aufbau der Messzelle für die LSM-Messungen. a) Aufsicht: Zwei Abstandshalter (Klebestreifen) sind auf dem Deckglas fixiert; das Titanplättchen wird für die Messungen daraufgelegt. b) Seitenansicht: Der Laserstrahl passiert das Deckglas und die Protein-Lösung und trifft anschließend auf das Titanplättchen.

reich von 515 bis 565 nm verwendet. Für die Reflexionsaufnahmen kam ein Langpassfilter mit einer Abbruchkante bei 510 nm zum Einsatz.

Ein inverses Mikroskop erfordert für die LSM-Messungen einen speziellen Aufbau [111]. Hierzu wurden Deckgläser mit einer Stärke von 130-170  $\mu\text{m}$  und einer Fläche von 24x64 mm (Knittel Gläser) mit zwei Klebestreifen (ca. 20x2 mm) versehen (s. Abb. 5.1). Die Klebestreifen dienen als Abstandshalter, um zwischen Glas und Titanplättchen die Proteinlösung geben zu können. Die Titanplättchen haben einen Durchmesser von 15,5 mm und eine Stärke von etwa 1 mm. Die in Abb. 5.1b gezeigte Messzelle wird so auf dem Mikroskopisch positioniert, dass der Laser senkrecht von unten kommend erst durch das Deckglas, dann durch die wässrige Protein-Lösung und anschließend auf die Titan-Oberfläche trifft. Durch den konfokalen Aufbau der LSM-Apparatur kann die gesamte Messzelle Ebene für Ebene *durchgescannt* werden.

Diese Probenanordnung hat zudem den Vorteil, dass Sedimentationseffekte, die durch Gravitation hervorgerufen werden, keine Rolle bei der Adsorption an die Titan-Oberfläche spielen, da sich diese, oberhalb der Proteinlösung befindet.

Die Charakterisierung der Proteinadsorption auf den Titan–Plättchen mittels LSM erfolgte durch zwei unterschiedliche Experimente. In einem ersten Experiment wurden 10  $\mu\text{l}$  einer Proteinlösung auf das Deckglas zwischen die Platzhalter pipettiert. Das Titan–Plättchen wurde anschließend auf die Platzhalter gelegt. In einem zweiten Experiment wurde ein Tropfen von 10  $\mu\text{l}$  Proteinlösung auf das Titan–Plättchen pipettiert. Nach 10 min wurde das Plättchen zweimal in etwa 2 ml PBS-Puffer eingetaucht, um die Proteinlösung mit nicht adsorbierten Proteinen zu entfernen. Ein neues Deckglas wurde mit 10  $\mu\text{l}$  reiner Pufferlösung präpariert. Das Titan–Plättchen wurde mit der Protein-beschichteten Seite nach unten auf die Platzhalter gelegt.

### 5.1.2 Fluoreszenz–Markierung der Proteine

Da die Proteine nur bei einer UV–Anregung eine intrinsische Fluoreszenz zeigen, für das LSM aber ausschließlich Anregungswellenlängen aus dem sichtbaren Bereich des Spektrums zur Verfügung stehen, müssen die Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Hierfür wurde der Farbstoff Alexa (Alexa Fluor 488, Protein Labeling Kit (A-10235), Molecular Probes) verwendet, der mit 488 nm angeregt werden kann und ein Fluoreszenzmaximum bei 518 nm zeigt. Die Ankopplungsreaktion wurde in Anlehnung an die Anleitung des *Kits* durchgeführt [57]. Es wurden folgende Proteinlösungen hergestellt: Fibrinogen 4,96 mg/ml, Albumin (BSA) 1,8 mg/ml und Fibronectin 3,12 mg/ml. Als Lösungsmittel wurde PBS-Pufferlösung verwendet, welche aus NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , KCl und Reinstwasser besteht. Der pH-Wert dieser Lösung liegt bei 7,4. Die Proteine wurden vor der Ankopplungsreaktion vollständig in diesen Puffer überführt (man spricht hierbei vom Umpuffern), der im Gegensatz zu den meisten anderen Puffern, aus denen Proteine lyophilisiert werden, keine Aminogruppen enthält, die ebenfalls mit dem Farbstoff reagieren würden. Für das Umpuffern durch Gelfiltration wurde Sephadex G 15 (G–15–120, Sigma) als Säulenmaterial verwendet. Die Säulen wurden in Mobicols und dazugehörigen

Filtern (M 1002 MoBiTec) präpariert. Um den für die Reaktion notwendigen pH-Wert einzustellen, wurde zu je 150  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung 15  $\mu\text{l}$  1M Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben. Der Farbstoff eines Ansatzes des *Kits* wurde in 20  $\mu\text{l}$  DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Je 150  $\mu\text{l}$  Proteinlösung wurden 6  $\mu\text{l}$  Farbstofflösung zugegeben. Der Farbstoff liegt dabei im Überschuss vor (ca. 20-facher molarer Überschuss), um eine möglichst große Ausbeute an markierten Proteinen zu erhalten. Die Reaktion erfolgt unter Lichtausschluss (Reaktionsgefäße werden mit Aluminiumfolie umwickelt) und bei Raumtemperatur. Die Reaktionsdauer beträgt eine Stunde. Nach der kovalenten Bindung des Farbstoffs an das Protein wurde eine Aufreinigung durch Gelfiltration (Sephadex, G-15-120, Sigma) durchgeführt.

Als Referenz für die Fluoreszenz-Korrelations-spektroskopischen Messungen (FCS) (vgl. Kap. 5.1.3) wurde eine Lösung des reinen Farbstoffs Alexa hergestellt. Als Lösungsmittel wurde für alle Lösungen PBS Puffer (pH 7,4; Firma Life Technologies) verwendet.

### 5.1.3 Fluoreszenz-Korrelations-spektroskopische Messungen der Lösungen

Zur Überprüfung der Anteile an markiertem Protein im Vergleich zu freiem Farbstoff Alexa wurden die Proben der Proteinlösungen mit den markierten Proteinen sowie die Probe mit reinem Alexa-Farbstoff mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) vermessen. Mit Hilfe einer Korrelationsfunktion wurden die Diffusionszeiten der einzelnen Komponenten berechnet [111]. Mit Diffusionszeit ist die Zeit gemeint, die ein Proteinmolekül benötigt, um den Laserfokus zu passieren. Je nach der Größe des Proteinmoleküls ist die Diffusionszeit länger oder kürzer. Fibrinogen ist das größte Molekül, gefolgt von Fibrinogen und Albumin. Mit dem Anteil an freiem Farbstoff sind die Farbstoffmoleküle gemeint, die nicht an ein Proteinmolekül gebunden sind. Da diese ebenfalls Fluoreszenz zeigen, ist es wichtig zu wissen, wie hoch dieser Anteil ist und ob dadurch die Ergebnisse der LSM-

Untersuchungen beeinflusst werden. Die Diffusionszeit des freien Farbstoffs ( $28,2 \mu\text{s}$ ) wird als feste Größe angenommen. Ein Zwei-Komponenten-Fit [112] berechnet den Anteil der als konstant angenommenen Komponente Alexa und den des markierten Proteins. Tabelle 5.1 können die Molekulargewichte und Diffusionszeiten der untersuchten Proteine sowie die prozentualen Anteile an freiem Farbstoff in den Proteinlösungen entnommen werden.

**Tabelle 5.1:** Molekulargewichte, Diffusionszeiten der Alexa-markierten Proteine und Anteile an freiem Farbstoff in der gemessenen Lösung.

|             | Molekulargewicht (kD) | Diffusionszeit ( $\mu\text{s}$ ) | Anteil freier Farbstoff (%) |
|-------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Fibronectin | 340                   | 350,1                            | 2,9                         |
| Fibrinogen  | 450                   | 401,3                            | 0                           |
| Albumin     | 69                    | 188,15                           | 13,1                        |

Die Anteile sind mit 0, 2,9 und 13,1 % relativ gering und beeinflussen die Ergebnisse nicht signifikant.

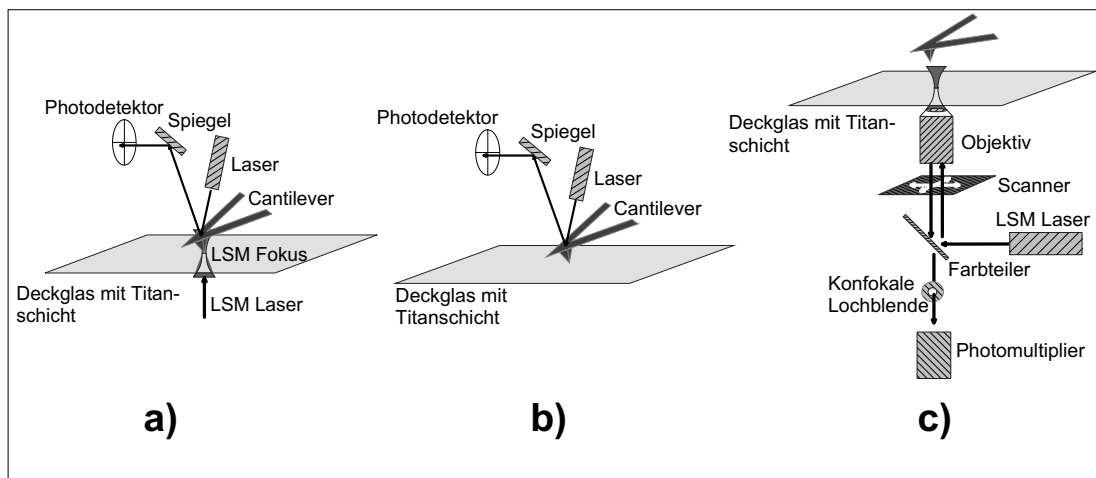
## 5.2 LSM in Kombination mit AFM

### 5.2.1 Laser-Raster-Mikroskop und Kraftfeldmikroskop

Als Laser-Raster-Mikroskop wurde ein Olympus LSM 500 (Olympus, Japan) mit einem inversen Mikroskop (IX-70, Olympus, Japan) verwendet. Für alle Messungen wurde ein Öl-Immersions-Objektiv (60x, NA 1,4, Olympus, Japan) eingesetzt.

Die Kraftfeldmessungen wurden mit dem Kraftfeldmikroskop (AFM) (Explorer, Thermomicroscopes, Santa Clara, USA) durchgeführt. Alle Proben wurden im Kontaktmodus

mit Silikonspitzen vermessen (Ultrasharp–CSCS11, NT–MDT, Russland). In dieser Anordnung erhält man eine laterale Auflösung von etwa 1 nm. Materialkontrast wurde entweder mit Reibungskraftmessungen oder mit Kraft-Modulations-Messungen erhalten. So konnte eine leichte Unterscheidung von Topographie und Probenbeschaffenheit erfolgen. Das Kraftfeldmikroskop kann entweder separat oder in Kombination mit einem Laser–Raster–Mikroskop (siehe unten) betrieben werden, wodurch eine Korrelation der LSM– mit den AFM–Daten möglich ist.



**Abbildung 5.2:** Experimenteller Aufbau für die AFM–Messungen. a) Der Cantilever für die AFM–Messungen und der Laserfokus für die LSM–Messungen werden an dieselbe Stelle positioniert. b) AFM–Messung eines bestimmten Oberflächenabschnitts. c) LSM–Messungen desselben Oberflächenabschnitts wie in b).

Bei diesem Aufbau ist die räumliche Überlappung zwischen AFM–Spitze und Laserfokus von Bedeutung. Um dies zu erreichen, wird der AFM–Messkopf mit Hilfe eines Metallrings auf dem inversen Mikroskop des LSM befestigt. Diese Anordnung ermöglicht es, die selben Probenausschnitte sowohl mit AFM als auch mit LSM zu vermessen. Eine schematische Skizze dieses Aufbaus ist in Abb. 5.2 dargestellt. Abbildung 5.2 a zeigt die Probe mit AFM–Spitze und LSM–Laserfokus an derselben Position. Über das Mikroskop wird der Laser auf die Oberfläche der Probe fokussiert. Der AFM–Aufsatz wird oberhalb der Probe angebracht und die AFM–Spitze über Stellschrauben so positioniert, dass sie mit der Laserposition des LSM–Laserfokus übereinstimmt. Nun wird die AFM–Spitze mit

der Oberfläche in Kontakt gebracht (so genanntes *Feedback*). Die Positionen von AFM-Spitze und LSM-Laserfokus werden erneut überprüft. Für die AFM-Messungen wird der LSM-Laser ausgeblendet, um ein Ausbleichen der Probe zu vermeiden. Im nächsten Schritt werden die AFM-Aufnahmen an der selben Position auf der Probe vorgenommen. Dies ist in Abb. 5.2 b dargestellt. Dabei wird zunächst ein größerer Bereich *gescannt* und schrittweise in kleinere Bereiche der Probe *gezoomt*. Im Anschluss an die AFM-Aufnahmen werden die LSM-Aufnahmen durchgeführt. Der schematische Aufbau des LSM ist in Abb. 5.2 c dargestellt. Auch bei den LSM-Aufnahmen können verschiedene Ausschnitte der Probe gescannt werden [113].

### 5.2.2 Probenpräparation

Deckgläser einer Stärke von etwa 130-170  $\mu\text{m}$  und einer Fläche von 24x64 mm wurden mittels PVD (*physical vapour deposition*, Balzers PLS 570) mit Titan beschichtet. Die Stärke der Titan-Schicht wurde mit AFM-Messungen bestimmt und betrug etwa 50 nm. Titan oxidiert generell an der Oberfläche spontan zu Titandioxid. Die Stärke dieser  $\text{TiO}_2$ -Schicht beträgt etwa 5-6 nm [93].

Die Proteine wurden entsprechend der in Kap. 5.1 beschriebenen Methode markiert. Als Lösungsmittel wurde ausschließlich PBS-Pufferlösung verwendet. Die Fibrinogenlösung wurde im Verhältnis 1:10 mit PBS-Pufferlösung verdünnt. Ein Volumen von 5  $\mu\text{l}$  wurde in die Mitte eines Titan-beschichteten Deckglases getropft. Nach 10 Minuten wurde das Deckglas zweimal mit destilliertem Wasser gespült. Die Oberflächen wurden vor den Messungen in einem Strom von Stickstoff getrocknet.

## 5.3 Circular dichroismus–Spektroskopie (CD–Spektroskopie)

Für die CD-spektroskopischen Messungen wurden die Proteinlösungen wie folgt dargestellt:

Für die Fibrinogen–Lösung wurden 2,4 mg Fibrinogen in 0,5 ml PBS–Puffer gelöst. Es ergibt sich eine Proteinkonzentration von etwa 14  $\mu\text{M}$ . Für die Fibronectin–Lösung wurden 0,5 mg Fibronectin in 0,5 ml PBS–Puffer gelöst. Die Proteinkonzentration beträgt somit etwa 2,2  $\mu\text{M}$ .

Für die Fibrinogen–Lösung wurde eine Küvette mit einer Pfadlänge von 0,02 cm verwendet. Da die Fibronectin–Lösung in geringerer Konzentration vorlag, wurde für diese eine Küvette mit einer Pfadlänge von 0,1 cm verwendet.

Die CD–Spektren der Lösung wurden im spektralen Bereich von 190 - 400 nm aufgenommen. Da das gemessene Signal bei den Proben unterhalb von 196 nm stark verrauscht ist und oberhalb von 300 nm keine Veränderungen zu beobachten sind, erfolgte die Auswertung im Wellenlängenbereich von 200 - 300 nm.

## 5.4 Raman–spektroskopische Untersuchungen

### 5.4.1 Raman–Spektrometer und Messparameter

Die Raman–Spektren wurden mit einem Mikro–Raman–Setup (Labram, Jobin Yvon) aufgenommen. Als Anregungswellenlänge wurde die 514,5 nm–Linie eines Argon–Ionen–Lasers (Spectra Physics, Modell 2016) eingesetzt. Unter Verwendung des Olympus LMPlan



FL 50x Objektivs, einem Spalt von 100  $\mu\text{m}$  und einem 1800 l/mm Gitter beträgt die spektrale Auflösung des Spektrometers etwa 3  $\text{cm}^{-1}$ . Die Laserleistung auf der Probe betrug etwa 5 mW.

### 5.4.2 Probenpräparation und Auswertung

Für die Raman-spektroskopischen Untersuchungen von adsorbierten Proteinen auf Titan-dioxid-Oberflächen wurden Nanopartikel mit einer durchschnittlichen Größe von 21 nm (Anatas; Degussa; flammenpyrolytisch dargestellt) verwendet. Eine Suspension der Partikel in PBS-Puffer (1 mg / 500  $\mu\text{l}$ ) wurde mit einer Lösung von Fibrinogen (1 mg / 500  $\mu\text{l}$ ; *Type VI from bovine Plasma*; Sigma-Aldrich), bzw. in einem weiteren Ansatz mit Fibronectin (1 mg / 500  $\mu\text{l}$ ; *human fibronectin*; Harbor Bio-Products) in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf-Cap) gemischt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die Lösungen zentrifugiert und die jeweiligen Überstände verworfen. Das Pellet wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieses wurde mit 1 ml PBS-Puffer aufgefüllt. Durch Aufschütteln und Behandlung im Ultraschallbad wurde erneut eine Suspension hergestellt, die im Anschluss daran zentrifugiert wurde. Dieser "Waschvorgang" wurde jeweils dreimal wiederholt, um nicht-adsorbierte Proteine in Lösung zu bringen und von den Nanopartikeln abzutrennen. Für die Fibronectin-Probe wurde für den Waschvorgang dest.  $\text{H}_2\text{O}$  verwendet. Die Inkubation erfolgte auch hier in PBS-Lösung.

Die  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel mit den adsorbierten Proteinen wurden über Nacht an der Luft getrocknet und anschließend Raman-spektroskopisch untersucht [114].

Für die Fibrinogenproben mit unterschiedlichen pH-Werten wurden wäßrige Lösungen mit dem entsprechenden pH-Wert hergestellt. Es wurde jeweils dest. Wasser mit 0,1 M Natronlauge (NaOH) (Riedel-de Haen) für den pH-Wert 7,5 bzw. 0,1 M Salzsäure (HCl)(Riedel-de Haen) für die im sauren pH-Bereich liegenden Lösungen versetzt, bis der entsprechende pH-Wert erreicht wurde. Die pH-Werte wurden mit Hilfe eines pH-Meters

dokumentiert. Je 5 mg/ml Protein wurde in diese Lösungen eingewogen. Die Lösungen wurden jeweils in einen mit einer Vertiefung versehenen Objektträger pipettiert und dann an der Luft getrocknet, bevor die Spektren aufgenommen wurden [114].

Für die Auswertung der Raman-Spektren wurde eine Basislinienkorrektur mit dem Programm “Origin” (Version 7, Origin Lab Corporation) durchgeführt. Die Anpassung an das Voigt-Profil erfolgte mit dem Programm “Labspec” von Jobin Yvon.

# 6 Ergebnisse und Diskussion

## 6.1 Die räumliche Verteilung von adsorbierten Proteinen auf Implantat-Materialien

In diesem Kapitel werden die Experimente beschrieben, die zur Untersuchung der räumlichen Verteilung der Proteine auf Implantat-Oberflächen gemacht wurden. Zunächst wurde die räumliche Verteilung der Proteine auf Titan-Plättchen mit Hilfe von Laser-Raster-Mikroskopie (LSM) untersucht. Um eine höhere Auflösung zu erhalten, wurde in einem weiteren Experiment eine Kombination aus LSM und Kraftfeldmikroskopie (AFM) eingesetzt.

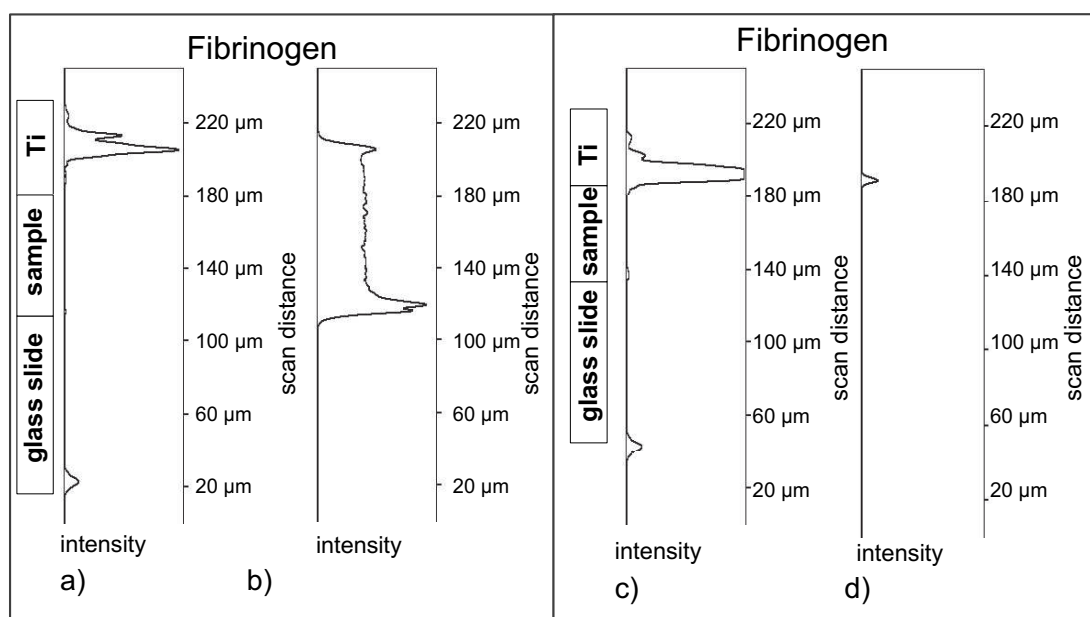
### 6.1.1 Untersuchung der räumlichen Verteilung von Proteinen auf Implantat-Materialien mit LSM

Zunächst wurde die Verteilung der Proteine in einer Messzelle bestehend aus Deckglas, Proteinlösung und Titan-Plättchen untersucht. In den Abbildungen 6.1 bis 6.4 sind LSM-Aufnahmen der verschiedenen Proben in z-Richtung gezeigt. Die Teilbilder a und c zeigen jeweils die Reflexionsaufnahmen, die Teilbilder b und d die entsprechenden Fluoreszenz-

zaufnahmen. In b befindet sich jeweils die Proteinlösung zwischen Deckglas und Titan-Plättchen. In c wurde die Probe jeweils nach dem Abwaschen mit PBS vermessen.

Durch diese beiden Probenpräparationen wurden jeweils unterschiedliche Systeme betrachtet. Im ersten Fall wurde die Verteilung des Proteins in der Meßzelle untersucht. Ziel ist es dabei herauszufinden, wie sich das Protein im Kontakt mit den unterschiedlichen Komponenten seiner unmittelbaren Umgebung verhält. Diese sind die Lösung, in der sich das Protein befindet, die Titan-Oberfläche am oberen und die Glas-Oberfläche am unteren Ende der Meßzelle.

Im zweiten Schritt wurde untersucht, was passiert, wenn das an die Titan-Oberfläche adsorbierte Protein in Kontakt mit reiner Pufferlösung kommt; ob es zu einer Ablösung der Proteine kommt und sich unter Umständen auch Proteine an der Glas-Oberfläche anlagern oder ob die Proteine an der Titan-Oberfläche haften bleiben.



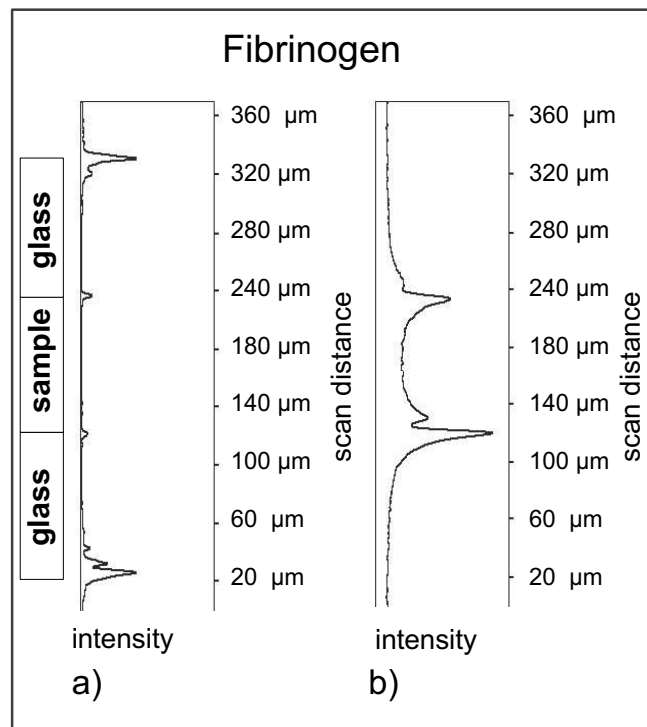
**Abbildung 6.1:** Verteilung des markierten Fibrinogen. LSM-Scan der Probe in z-Richtung; a, c) Reflexionsmessungen; b, d) Fluoreszenzmessungen.

In Abbildung 6.1 sind die Ergebnisse der Experimente mit Fibrinogen dargestellt. Anhand der Reflexionsmessungen (Abb. 6.1a) kann man erkennen, dass sich das Deckglas von 20 bis etwa  $120 \mu\text{m}$  erstreckt. Die Titan-Oberfläche beginnt bei einer Tiefe von etwa

210  $\mu\text{m}$ . Die Fluoreszenzmessung (Abb. 6.1b) zeigt, dass die Fluoreszenz am Glas höher ist als an der Titan-Oberfläche.

Diesen Effekt kann man damit erklären, dass sich die Glas-Oberfläche am Boden der Messzelle befindet und die Sedimentation der Proteine zum Tragen kommt.

**Abbildung 6.2:** Verteilung von Fibrinogen zwischen 2 Glas-Oberflächen;  
a) Reflexionsmessung,  
b) Fluoreszenzmessung.



Um zu überprüfen, ob sich der beobachtete Effekt durch Sedimentation erklären lässt, wurden in einem weiteren Experiment zwei gleiche Oberflächen verwendet und anstelle des Titan-Plättchens ein weiteres Deckglas in der Messanordnung verwendet. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 6.2 dargestellt. Man kann davon ausgehen, dass die Affinität der Proteine, an zwei vom Material her identische Glas-Oberflächen zu binden, annähernd gleich groß ist. Es ist jedoch zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität auf diesen beiden Oberflächen Unterschiede aufweist. An der Oberfläche des unten liegenden Deckglases ist die Intensität der Fluoreszenz etwas höher, als an dem oben liegenden Deckglas. Bei diesem Effekt handelt es sich um einen Sedimentationseffekt, der auch in den anderen Experimenten erklärt, warum die Fluoreszenzintensität am Glas (das sich in der Meßzelle unten befindet) höher ist als am Titan-Plättchen.

In Abbildung 6.1 c und d sind die Ergebnisse eines weiteren Experiments dargestellt, in dem die Ti-Oberfläche, nachdem sie mit der Proteinlösung versetzt wurde, mit PBS-Lösung abgespült wurde. Es zeigt sich, dass das Protein nur an der Ti-Oberfläche, d.h. adsorbiert, vorliegt und es nicht zu einer Anreicherung von Protein in der reinen Pufferlösung oder an der Glas-Oberfläche kommt. Führt man das gleiche Experiment mit längerer Wartezeit durch, so bleibt das Ergebnis gleich [111].

Die Proteine liegen fest auf der Oberfläche adsorbiert vor. Man unterscheidet generell zwei verschiedene Bindungsarten bei der Adsorption: Die Chemisorption und die Physisorption. Bei der Chemisorption kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen Adsorbat (in diesem Fall das Protein) und Adsorbens (entspricht hier der Titan-Oberfläche). Bei der Physisorption wirken elektrostatische Anziehungskräfte zwischen Adsorbat und Adsorbens. Die Bindungskräfte bei der Chemisorption sind deutlich stärker als die bei der Physisorption. Beim Abwaschen der Proteine mit PBS-Lösung von der Titanoberfläche werden also vor allem die physisorbierten Proteine abgespült. Die Proteine, die nach dem Abspülen noch auf der Titan-Oberfläche adsorbiert vorliegen, sind überwiegend chemisorbiert. Da es auch nach längerem direktem Kontakt mit reiner PBS-Lösung nicht zu einer Desorption kommt (in diesem Fall würde wieder Fluoreszenz in der Lösung detektiert), ist davon auszugehen, dass nahezu keine physisorbierten Proteine mehr vorliegen, da sich in diesem Fall ein Gleichgewicht zwischen an der Oberfläche physisorbierten Proteinen und Proteinen in Lösung einstellen würde.

Neben Fibrinogen wurden auch die Proteine Fibronectin und Albumin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.3 bzw. 6.4 dargestellt. Bei den Fibronectin-Messungen liegen die Oberflächen von Glas und Titan bei  $150\ \mu\text{m}$  bzw.  $180\ \mu\text{m}$ . Die Ergebnisse sind mit den Ergebnissen der Untersuchungen an Fibrinogen vergleichbar. Auch hier scheint ein Sedimentationseffekt vorzuliegen, da ein Peak mit höherer Intensität an der unten liegenden Glas-Oberfläche als an der oben liegenden Titan-Oberfläche beobachtet wird. Bei den Untersuchungen an Albumin fällt auf, dass in Abb. 6.4 b der Peak an der Titan-Oberfläche relativ schwach ausfällt. Dies würde für eine geringere Proteinkonzentration an der Titan-Oberfläche sprechen. Nach dem Waschen der Plättchen in PBS-Lösung ist sowohl beim

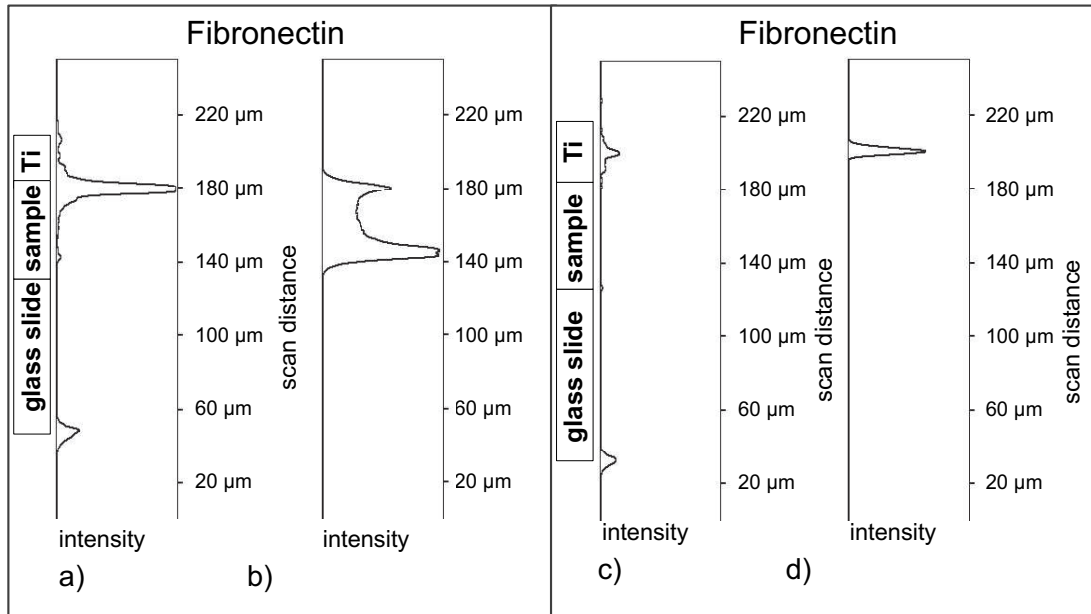


Abbildung 6.3: Verteilung des markierten Fibronectin. LSM-Scan der Probe in z-Richtung; a, c) Reflexionsmessungen; b, d) Fluoreszenzmessungen.

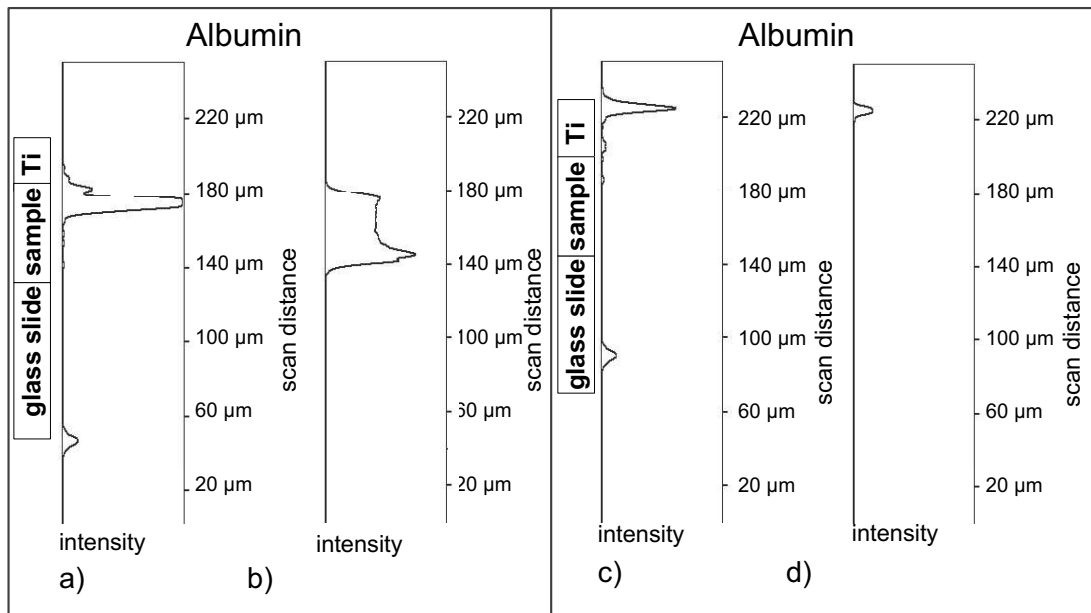
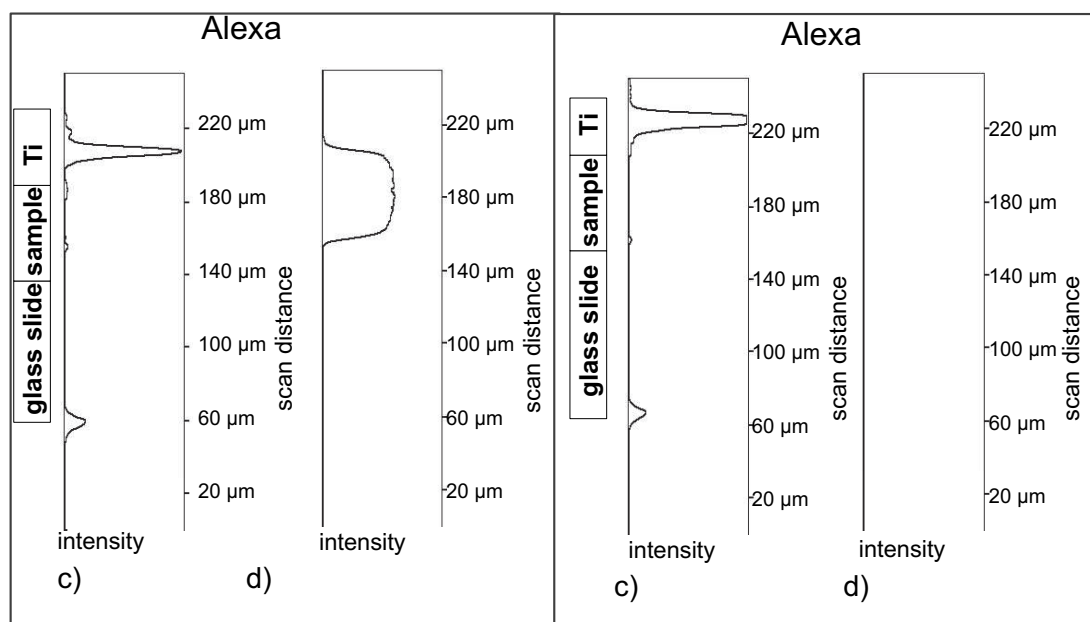


Abbildung 6.4: Verteilung des markierten Albumin. LSM-Scan der Probe in z-Richtung; a, c) Reflexionsmessungen; b, d) Fluoreszenzmessungen.

Fibronektin als auch beim Albumin ein Fluoreszenzpeak an der Titan-Oberfläche zu sehen, der sich auch nach längerer Beobachtungszeit nicht verändert.

Auch diese Proteine liegen überwiegend chemisorbiert vor. Mit LSM können keine gravierenden Unterschiede im Adsorptionsverhalten der untersuchten Proteine festgestellt werden.



**Abbildung 6.5:** Verteilung des reinen Farbstoffes Alexa. Scannen der Probe in z-Richtung  
a, c) Reflexionsmessungen b, d) Fluoreszenzmessungen.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Fluoreszenzsignale an der Glas-Oberfläche bzw. der Ti-Oberfläche, durch eine Adsorption des Farbstoffs an diesen Flächen hervorgerufen werden könnten, wurde ein Kontrollexperiment mit einer Lösung von reinem Alexa-Farbstoff durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 6.5 dargestellt. Man erkennt, dass die Lösung fluoresziert, jedoch an den Oberflächen kein Peak erkennbar ist, der für eine Adsorption des Farbstoffs an den Oberflächen sprechen würde. Bei der Durchführung des zweiten Experiments, in dem das Titan-Plättchen mit Pufferlösung gespült wurde, ist ebenfalls keine Fluoreszenz an den Oberflächen zu beobachten.

Daraus kann man ableiten, dass das beobachtete Fluoreszenz-Signal in den Abb. 6.3(b),

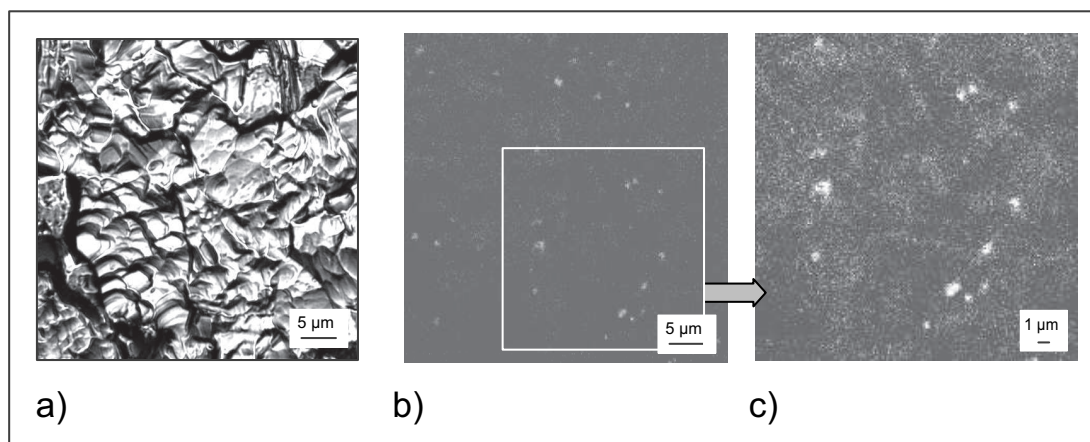


d) bis 6.4 (b, d) von den auf der Oberfläche adsorbierten Proteinen und nicht von dort adsorbierten Farbstoff-Molekülen stammt. Die oben beschriebenen Ergebnisse werden also nicht durch eine mögliche Adsorption von reinem Fluoreszenzfarbstoff, der sich noch in der Lösung befinden könnte, verfälscht.

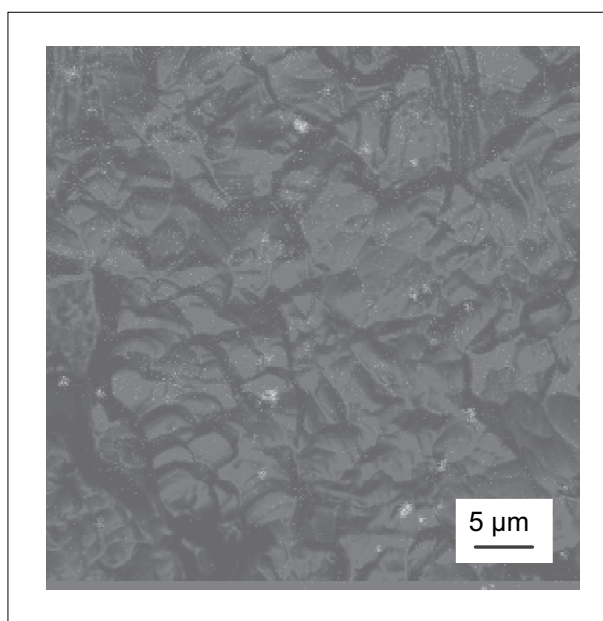
Führt man diese Experimente an verschiedenen Positionen auf der Probe durch, so ergeben sich für die Titan-Oberfläche zum Teil unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten. Ein Grund hierfür wird in der unterschiedlichen Belegung der Oberfläche mit Proteinen vermutet.

Um einen Eindruck über die räumliche Verteilung der Proteine auf der Titan-Oberfläche zu bekommen, wurde die Adsorption von Fibronectin auf einem Ausschnitt der Ti-Oberfläche von  $50 \times 50 \mu\text{m}$  durch Reflexions- und Fluoreszenzmessungen dargestellt. Das Reflexionsbild der Oberfläche ist in Abb. 6.6 a und das dazugehörige Fluoreszenzbild in Abb. 6.6 b zu sehen. Ein etwa  $20 \times 20 \mu\text{m}$  großer Ausschnitt des Fluoreszenzbildes ist in Abb. 6.6 c wiedergegeben. Hier repräsentieren die hellen Stellen die Bereiche, die eine hohe Fluoreszenz aufweisen. Man erkennt sehr deutlich, dass die Ti-Oberfläche nicht homogen, sondern heterogen mit Protein besetzt ist. Das Fluoreszenzbild erscheint an den Stellen, an denen keine hohe Fluoreszenzintensität vorliegt, nicht einheitlich dunkel sondern eher in unterschiedlichen Graustufen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Oberfläche mit einer Monolage an Protein überzogen ist. Darüber hinaus findet man auf der Oberfläche Proteincluster, d. h. Bereiche, an denen es zu einer Agglomeration von Proteinen kommt.

Geht man nun der Frage nach, ob die Bildung der Proteincluster eine Folge der Oberflächenmorphologie ist, so steht ein Vergleich zwischen dem Fluoreszenzbild (Abb. 6.6 a) und dem Reflexionsbild (Abb. 6.6 b) an. In Abbildung 6.7 sind diese beiden Images übereinandergelegt. Abbildung 6.6 b ist transparent dargestellt, so dass man die fluoreszierenden, hell erscheinenden Proteincluster der Oberflächenmorphologie zuordnen kann. Jedoch muss man feststellen, dass die hier aufgelöste Oberflächenmorphologie keinen direkten Einfluss auf die Proteinadsorption hat. Es gibt keine bevorzugten oder weniger bevorzugten Stellen, wie beispielsweise Kanten oder Vertiefungen auf der Oberfläche, an denen die



**Abbildung 6.6:** Verteilung von Fibrinogen zwischen zwei Glas-Oberflächen; a) Reflexionsmessung, b) Fluoreszenzmessungen, c) Vergrößerung des in b) gezeigten Ausschnitts



**Abbildung 6.7:** Kombination der Abbildungen 6.6 a und b. Die beiden Abbildungen wurden übereinandergelegt. Abbildung 6.6 b ist transparent dargestellt. Abbildung 6.6 a kann man darunter erkennen. Die fluoreszierenden, hell erscheinenden Proteincluster können der Struktur der Oberfläche zugeordnet werden.

Proteine adsorbieren.

Der nächste Schritt, mehr über den Einfluss der Oberflächenmorphologie auf die Proteinadsorption herauszufinden, wäre ein Experiment, bei dem Oberflächen mit definierten Strukturen untersucht werden. Diese Untersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Die Laser-Raster-Mikroskopie ist sehr gut für eine qualitative Aussage zur Adsorption von Proteinen auf Implantat-Oberflächen geeignet. Die Proteinverteilung kann in einem System, das aus Implantat-Oberfläche und umgebender physiologischer Lösung mit Proteinen besteht, dargestellt werden. Dieses System ist ein vereinfachtes Modell für die Gegebenheiten im Organismus. Dort wird das Implantat in Gewebe, die überwiegend aus extrazellulärer Matrix bestehen, gebracht. Die Matrix enthält vor allem Proteine, Zellen und Kollagenfasern (vgl. Kap. 4.1). Wichtig für den ersten Schritt bei der Implantation sind hierbei vor allem die Proteine [4–6]. Anhand des vereinfachten Modells wurde beobachtet, dass es beim Kontakt der Titan-Oberfläche mit der Proteinlösung sofort zu einer Belegung der Oberfläche mit Proteinen kommt und dass diese Proteine kovalent an die Oberfläche gebunden sind. Die Oberfläche ist mit Proteinen und Proteinclustern belegt. Die Größe des Proteins Fibrinogen liegt bei 46 nm [115], was in etwa auch der Größe von Fibronectin entspricht. Die Proteincluster sind dementsprechend etwas größer. Die räumliche Auflösung bei der Laser-Raster-Mikroskopie liegt im Bereich mehrerer hundert Nanometer (entsprechend dem Abbe-Limit). Um besser aufgelöste Abbildungen der adsorbierten Proteinschicht zu erhalten, wäre es von Vorteil, die LSM mit einer weiteren mikroskopischen Methode zu kombinieren, bei der man eine bessere räumliche Auflösung erhält. Eine Kombination mit der Kraftfeldmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*, AFM) eignet sich dazu. Die räumliche Auflösung liegt bei dieser Methode im Nanometer-Bereich.

Wenn eine Implantat-Oberfläche auf ihre Biokompatibilität getestet wird, werden in der Regel zellbiologische Experimente durchgeführt. Die Oberflächen werden in Nährmedien eingelegt und unterschiedliche Zellen werden auf diesen Oberflächen kultiviert. Über mehrere Wochen bis Monate werden Veränderungen der Zellen wie deren Morphologie und Wachstumsprozesse beobachtet. Im nächsten Schritt werden die Implantat-Materialien im

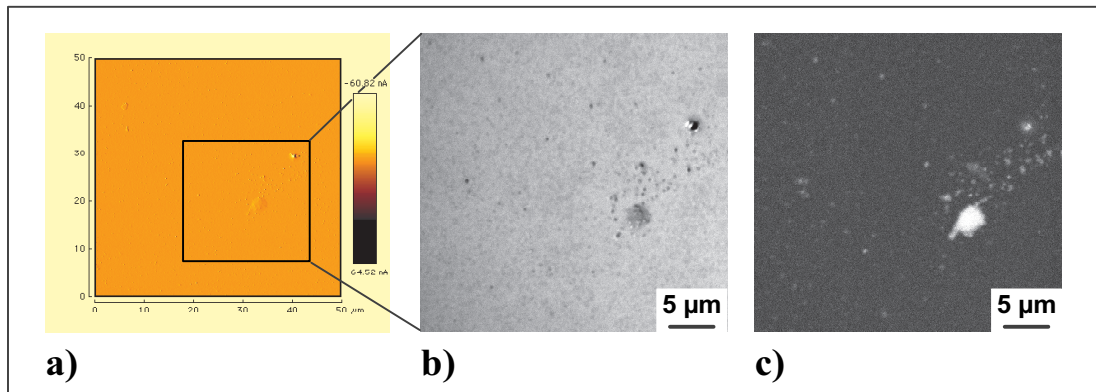
Tier-Experiment getestet. Sowohl die zellbiologischen Tests als auch die Tier-Experimente sind sehr zeit- und kostenintensiv. Bevor ein neues Implantat-Material zur Anwendung freigegeben wird, sind diese Tests auch notwendig, da neben der Proteinadsorption noch weitere Faktoren wie beispielsweise unter Umständen vorkommende Korrosionsprodukte für die Gewebeverträglichkeit eine Rolle spielen. Es wäre jedoch sinnvoll, vor den zellbiologischen Tests eine Auswahl der neu zu testenden Implantat-Materialien zu treffen, die eine gute Gewebeverträglichkeit erwarten lassen.

Da die Proteinadsorption ein erstes Indiz für eine gute Biokompatibilität darstellt, kann die LSM dazu genutzt werden, eine erste Entscheidungshilfe für die Materialauswahl und die Wahl der Oberflächenmorphologie zu geben. Die Methode muss jedoch zu diesem Zweck weiter auf das System angepasst und standardisiert werden.

### **6.1.2 Eine Kombination von AFM und LSM zur Untersuchung der räumlichen Verteilung von Proteinen auf Implantat-Materialien**

Um höher aufgelöste Abbildungen der adsorbierten Proteine auf den Implantat-Oberflächen zu erhalten, wurde die Laser-Raster-Mikroskopie (LSM) mit der Kraftfeldmikroskopie (AFM) kombiniert. Für diese Untersuchungen wurden mit einer dünnen Titan-Schicht bedampfte Deckgläser als Oberfläche verwendet. Diese wurden mit einer Proteinlösung bedeckt, nach dem Abspülen der Lösung wurden die Messungen durchgeführt. Die Dicke der Titan-Schicht wurde so gewählt, dass der LSM-Laser diese Schicht transmittieren kann. Somit können LSM-Aufnahmen von der Unterseite und AFM-Aufnahmen von der Oberseite der Probe aufgenommen werden [113].

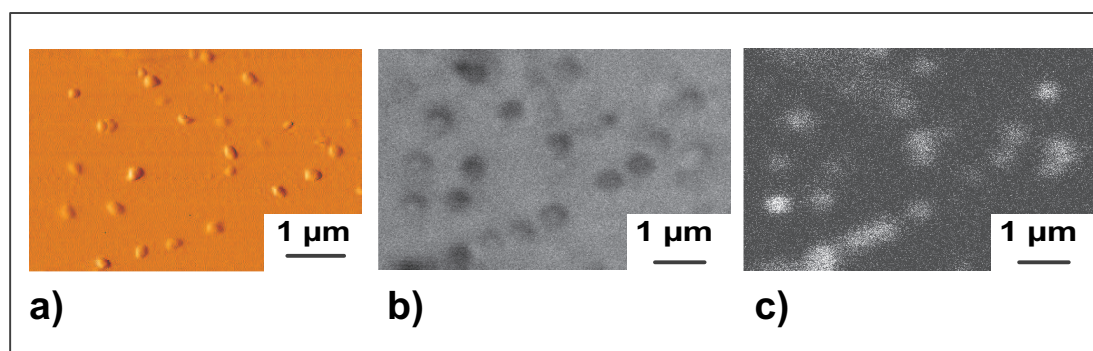
Die Ergebnisse der AFM-LSM Studien sind in den Abbildungen 6.8-6.10 dargestellt. In Abb. 6.8 a ist die AFM-Aufnahme eines Ausschnitts ( $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ) der Probeno-



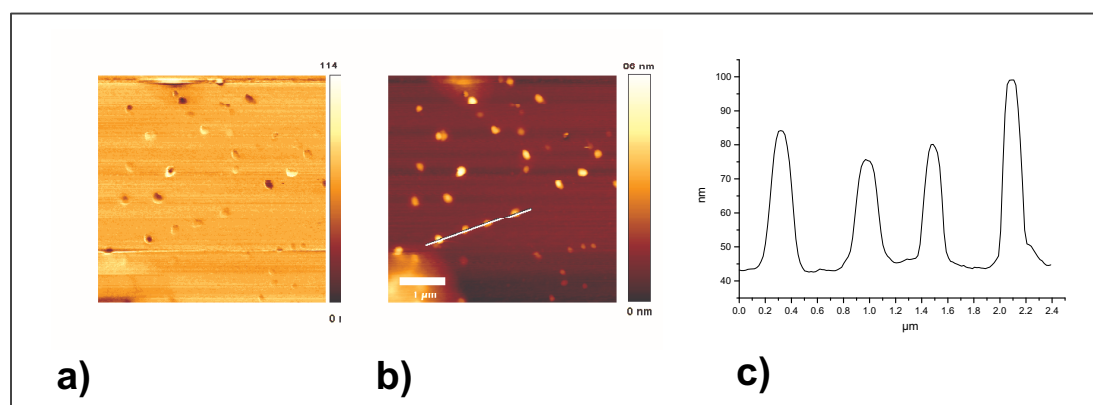
**Abbildung 6.8:** AFM- und LSM-Messungen von Proteinen und Proteinclustern auf der Titan-Oberfläche a) AFM-Aufnahme b) LSM-Aufnahme in Reflexion c) LSM-Aufnahme in Fluoreszenz.

berfläche gezeigt. Auf der überwiegend glatten Oberfläche sind Strukturen, die sich auf dieser Oberfläche befinden, erkennbar. In Abbildung 6.9 wurde in einen Teil des in Abbildung 6.8 gezeigten Ausschnitts *gezoomt*. Der gezeigte Ausschnitt hat eine Größe von  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ . Jeweils in den Abbildungen b und c sind LSM-Aufnahmen dargestellt. In b sind Reflexionsaufnahmen und in c Fluoreszenzaufnahmen gezeigt. Durch die verschiedenen Aufnahmetechniken erhält man unterschiedliche Informationen der Oberfläche, die sich miteinander korrelieren lassen. Die AFM-Aufnahmen geben die Topographie der Oberfläche wieder. Mit den LSM-Aufnahmen erhält man Informationen zur Art der Moleküle. Moleküle, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind können von nicht-markierten Komponenten unterschieden werden. Alleine durch die AFM-Aufnahmen kann man keine Aussage darüber treffen, ob es sich bei den Strukturen, die auf der Oberfläche erkennbar sind, um adsorbierte Proteine handelt. Auch die LSM-Reflexionsaufnahmen geben lediglich Auskunft über die optische Dichte des Materials an einer bestimmten Position. Bei den dunkel erscheinenden Stellen könnte es sich daher auch um ungleichmäßig auf das Deckglas aufgetragenes Titan oder eingetrocknete Salze der PBS-Lösung handeln.

Die Fluoreszenzaufnahmen (jeweils in c dargestellt) zeigen, dass die Strukturen auf der Oberfläche bei 488 nm fluoreszieren, was der Anregung von Alexa entspricht. Die Strukturen können als Fluoreszenz-markiertes Fibrinogen identifiziert werden.



**Abbildung 6.9:** AFM- und LSM-Messungen von Proteinen und Proteinclustern auf der Titan-Oberfläche, vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 6.10 a) AFM-Aufnahme b) LSM-Aufnahme in Reflexion c) LSM-Aufnahme in Fluoreszenz.



**Abbildung 6.10:** AFM- Daten des in Abbildung 6.9 gezeigten Ausschnittes a) Topographie vorwärts b) Kraft-Modulations-Messungen desselben Ausschnittes c) Linienprofil der in b) gezeigten Linie

In Abbildung 6.10 a ist die Topographie des bereits in Abbildung 6.9 gezeigten Proben-ausschnitts abgebildet. Abbildung 6.10 b zeigt diesen Ausschnitt als Kraft-Modulations-Messung. In Abbildung 6.10 c ist ein Linienprofil der in b) eingezeichneten Linie dargestellt. Anhand dieser Messungen kann man sowohl die Topographie (mit den Topographie-Messungen) als auch die Härte des Materials (mit den Kraft-Modulations-Messungen) bestimmen. Es kann gezeigt werden, dass die Strukturen, welche die Oberfläche in diesem Bereich aufweist, von einer geringeren Härte sind, als ihr Untergrund. Auch hieraus ist ersichtlich, dass es sich bei den Strukturen um die adsorbierten Proteine handelt. Anhand

des in 6.10 c gezeigten Linienprofils können Höhe und Durchmesser der einzelnen Proteine und Proteincluster sehr genau bestimmt werden. Die Höhe beträgt 75 bis 95 nm und der Durchmesser etwa 100 nm. Die Abbildungen 6.9 a bis c zeigen, dass die Verteilung dieser Cluster auf der Titan-Oberfläche weitgehend homogen sind; der Abstand zwischen den einzelnen Clustern beträgt etwa 100 nm. Die Größe einer einzelnen Zelle, beispielsweise einer Osteoblastenzelle, liegt im Bereich einiger Mikrometer. Die Zelle sollte also auf einer Oberfläche wie der hier untersuchten Titanoberfläche genügend Bindungsstellen für Kontakte zwischen der RGD-Sequenz des Proteins und dem Integrin-Rezeptor auf der Zelloberfläche ausbilden können, um gut auf diesen anwachsen zu können.

Die räumliche Verteilung von Alexa-markiertem Fibrinogen bzw. Fibrinogenclustern lässt sich sehr gut mit einer Kombination aus AFM und LSM untersuchen. Der Vorteil der AFM-Technik liegt in der hohen Auflösung bis in den Nanometerbereich. Der Vorteil der LSM-Technik liegt in der eindeutigen Identifizierung der gezeigten Strukturen als Fluoreszenz-markiertes Protein. Außerdem können mit der LSM in kurzer Zeit große Bereiche der Probe gescannt werden. Eine erste Abschätzung der Biokompatibilität der untersuchten Materialien ist somit auch mit dieser Methode möglich und kann dazu beitragen, in kurzer Zeit Informationen über das Adsorptionsverhalten von Proteinen auf den jeweiligen Oberflächen zu erhalten (vgl. Kap. 6.1.1).





## 6.2 Strukturelle Änderungen von Proteinen bei der Adsorption

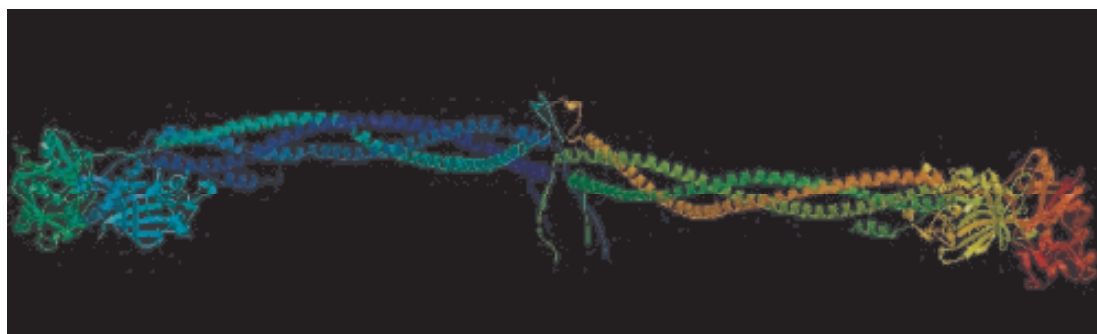
Neben der räumlichen Verteilung der Proteine auf Implantat-Oberflächen, die für die Biokompatibilität der Implantat-Materialien von Bedeutung ist, ist es auch von Interesse, wie der Adsorptionsprozess erfolgt und welche Mechanismen auf molekularer Ebene für eine Proteinadsorption verantwortlich sind. Durch eine vollständige Aufklärung dieses Prozesses erhofft man sich weitere Ansätze zu erhalten, die Implantat-Materialien dahingehend verbessern zu können, dass es zu einer noch besseren Gewebeverträglichkeit der Implantate kommt und noch weniger Abstoßungsreaktionen bei Implantationen auftreten.

Die Sekundärstruktur von Fibrinogen und Fibronectin wurde zunächst für die reinen Proteine mittels CD-Spektroskopie bestimmt. Anschließend wurde Raman-spektroskopisch untersucht, inwiefern es zu Änderungen in der Sekundärstruktur während der Adsorption dieser Proteine auf Titandioxid-Nanopartikeln kommt. Es wird vermutet, dass Proteine über negativ geladene Seitengruppen auf den  $\text{TiO}_2$ -Oberflächen adsorbieren. Hierfür kommen die Carboxylgruppen der Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure in Betracht. Inwiefern dies zutrifft, kann mittels Raman-Spektroskopie analysiert werden.

### 6.2.1 CD-Spektren

Um herauszufinden, inwiefern sich die Sekundärstruktur von Proteinen beim Adsorptionsprozess ändert, ist es notwendig, die Sekundärstruktur der Proteine vor der Adsorption zu kennen.

Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen kann man aus Röntgenstrukturdaten dieser Proteine erhalten. Röntgenstrukturdaten bestimmter Proteine und Proteinfragmente können der *Protein-Data-Bank* (PDB) entnommen werden [116].



**Abbildung 6.11:** Röntgenstrukturen (schematisiert) von natürlichem Hühner-Fibrinogen, nach PDB (Protein Data Bank, Code-Nummer 1EJ3) [116,117].



**Abbildung 6.12:** Röntgenstrukturen (schematisiert) des *Tenth Type III Module* des Fibronektin, nach PDB (Protein Data Bank, Code-Nummer 1TTF) [85,116].

Mit Hilfe des Programms Swiss-PdbViewer (Shareware [116]) können anhand dieser Röntgenstrukturdaten Modelle der Proteinausschnitte erstellt werden. In Abb. 6.11 ist ein Ausschnitt aus Hühner-Fibrinogen dargestellt [116,117]. Es liegt überwiegend in  $\alpha$ -helikaler Struktur vor. In Abbildung 6.12 ist ein Ausschnitt des Fibronektin-Moleküls, das *Tenth Type III Module* dargestellt [85,116]. Es ist überwiegend  $\beta$ -Faltblatt-Struktur

erkennbar.

Diese Daten beziehen sich auf ganz spezielle Proteine oder Proteinfragmente. Von den in dieser Arbeit verwendeten Proteinen konnten keine Daten gefunden werden. Um genaue Informationen über die Sekundärstrukturen der verwendeten Proteinproben zu erhalten, wurden CD-Spektren dieser Proben aufgenommen.

Abbildung 2.5 in Kap. 2.3 zeigt charakteristische CD-Spektren von Proteinen, die aus reiner  $\alpha$ -Helix-Struktur,  $\beta$ -Faltblattstruktur und ungeordneter (*random coil*) Struktur bestehen.

In Abb. 6.13 sind die CD-Spektren von Fibrinogen (durchgezogene Linie) und Fibronectin (gestrichelte Linie) dargestellt. Die Spektren wurden von Michael Dreyer (Arbeitskreis Prof. Bringmann, Universität Würzburg) aufgenommen. Ein Vergleich der Spektren der verwendeten Proteine (Abb. 6.13) mit den CD-Spektren reiner Proteinstrukturen (Abb. 2.5, Kap. ) liefert qualitative Informationen zur Sekundärstruktur.

Das Fibrinogen-Spektrum weist zwei starke negative Banden bei 211 nm und 219 nm auf, was darauf hindeutet, dass dieses Protein überwiegend in  $\alpha$ -helikaler Struktur vorliegt.

Das Spektrum des Fibronectin weist eine negative Bande bei 213 nm sowie eine positive Bande bei 230 nm auf. Die positive Bande deutet darauf hin, dass zum Teil eine ungeordnete Struktur (*random coil*) vorliegt. Im Vergleich zur reinen ungeordneten Struktur ist diese Bande aber um mehrere Nanometer verschoben, was sich wohl dadurch erklären lässt, dass keine reine ungeordnete Struktur vorliegt. Die negative Bande bei 213 nm lässt auf den Anteil einer bestimmten Struktur schließen. Da kein Doppelpeak wie bei der  $\alpha$ -helikalen Struktur zu beobachten ist, handelt es sich hierbei um  $\beta$ -Faltblattstruktur.

Die Informationen, die der Vergleich der CD-Spektren der Proben mit den CD-Spektren der reinen Sekundärstrukturen liefert, sind qualitativ, geben aber einen guten Hinweis auf die überwiegend vorliegende Sekundärstruktur.

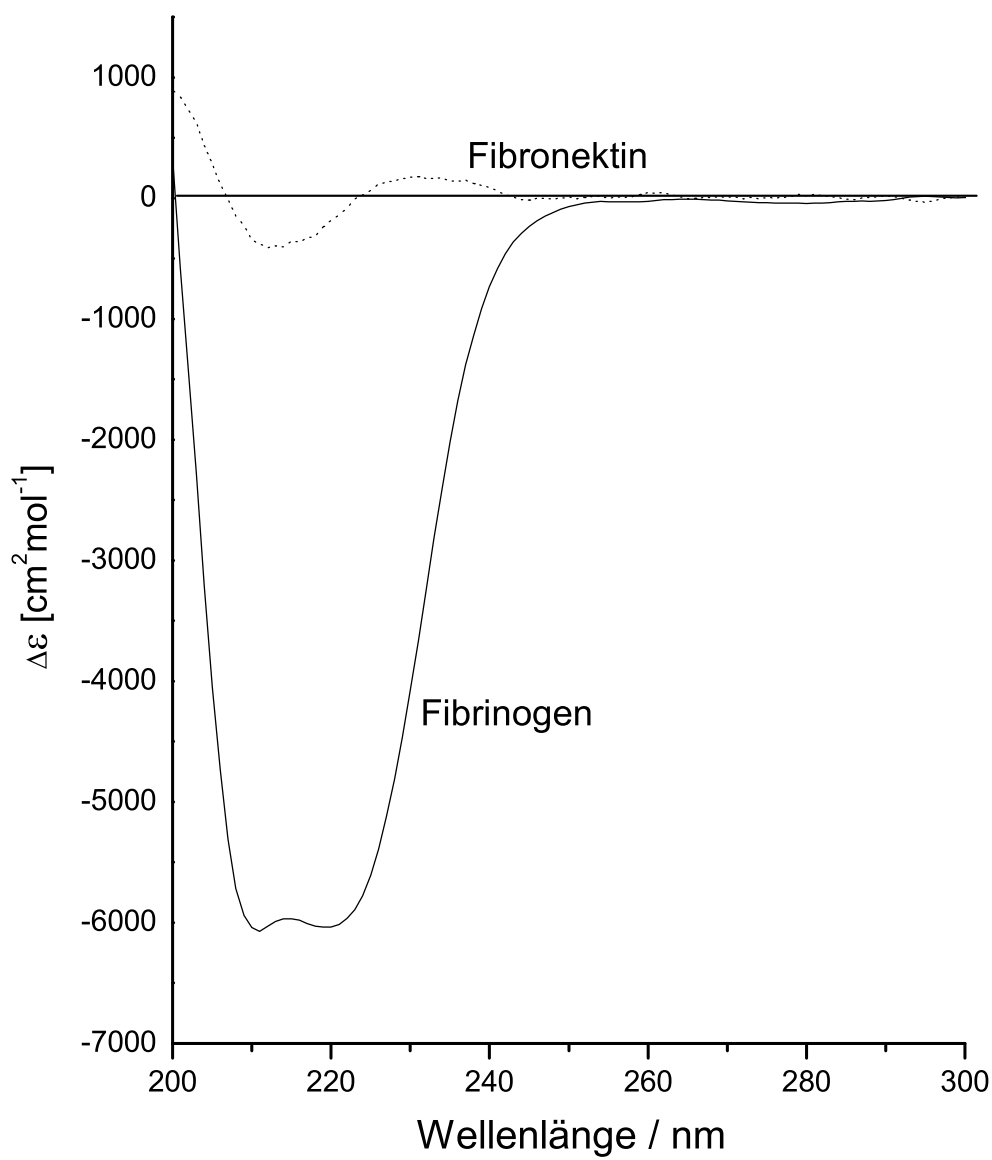


Abbildung 6.13: CD-Spektren von Fibrinogen und Fibronectin.

## 6.2.2 Raman–Spektren

Die Mikro–Raman–Spektroskopie eignet sich sehr gut, um biologische Systeme direkt und zerstörungsfrei zu untersuchen [45]. Die Proben können ohne große Probenaufarbeitung gemessen werden und auch wässrige Systeme stellen kein Problem bei den Messungen dar (vgl. Kap. 4.4).

Für das experimentelle Setup der Raman–spektroskopischen Untersuchungen von Proteinen auf Implantat–Oberflächen sind folgende Rahmenbedingungen einzuhalten: Proteine weisen einen relativ geringen Raman–Streuquerschnitt auf. Es ist daher schwierig, eine dünne Proteinschicht zu untersuchen. Um die Konformationsänderungen bei der Adsorption zu untersuchen ist es wichtig, eine monomolekulare Proteinschicht auf der Implantat–Oberfläche zu erzeugen, damit nur die chemisorbierten Moleküle spektroskopisch erfasst werden, deren Bindungsart sich deutlich von der der physisorbierten Moleküle unterscheidet. Dadurch verringert sich das Raman–Signal drastisch. Um verwertbare Spektren der monomolekularen Proteinschicht zu erhalten, ist es daher notwendig, eine möglichst große Titandioxid–Oberfläche für die Raman–spektroskopischen Untersuchungen zu verwenden [118].

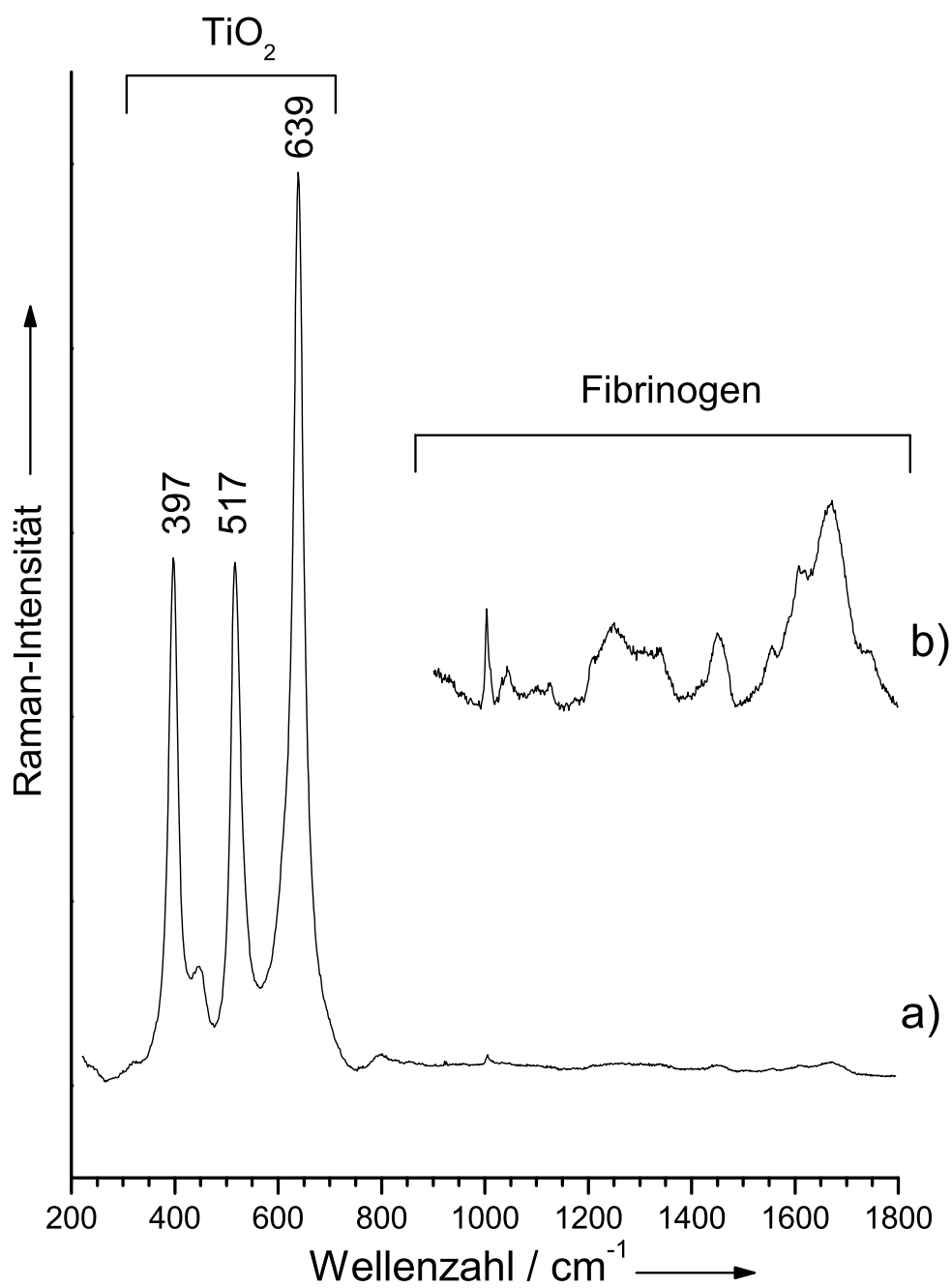
Als Modell zur Untersuchung der Proteinadsorption auf Implantat–Oberflächen können Titan–Nanopartikel verwendet werden, die eine sehr große Oberfläche aufweisen [10, 16].

Zunächst wurden Raman–Spektren der auf Titandioxid–Nanopartikel adsorbierten Proteine Fibrinogen und Fibronectin sowie Raman–Spektren der reinen Proteine aufgenommen und miteinander verglichen.

Abbildung 6.14 zeigt das Raman–Spektrum<sup>1</sup> von  $\text{TiO}_2$ –Nanopartikeln mit adsorbiertem Fibrinogen. Die Peaks bei  $397\text{ cm}^{-1}$ ,  $517\text{ cm}^{-1}$  und  $639\text{ cm}^{-1}$  in Spektrum a können dem  $\text{TiO}_2$  zugeordnet werden [119, 120].

---

<sup>1</sup>Im Auswertprogramm Labspec der Fa. Jobin Yvon sind die Spektren mit von links nach rechts ansteigenden Wellenzahlen auf der x–Achse aufgetragen. Um einen besseren Vergleich der verschiedenen Spektren ziehen zu können, wurden daher entgegen der weit verbreiteten Konvention alle Spektren in diesem Teil der Arbeit in dieser Weise dargestellt.



**Abbildung 6.14:** Raman-Spektren von auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln adsorbiertem Fibrinogen;  
a) 200 - 1800  $\text{cm}^{-1}$  (Integrationszeit 30 s).  
b) 900 - 1800  $\text{cm}^{-1}$  (Integrationszeit 500 s).

Bei Einschränkung des Spektralbereichs auf 900 bis 1800  $\text{cm}^{-1}$  und Erhöhung der Integrationszeit von 30 s auf 500 s erhält man Spektrum b. Beim Vergleich dieses Spektrums mit einem Spektrum des reinen  $\text{TiO}_2$  und des reinen Fibrinogen kann man deutlich erkennen, dass  $\text{TiO}_2$  keine Banden in diesem Spektralbereich aufweist und die detektierten Raman-Banden dem Fibrinogen zugeordnet werden können.

Abbildung 6.15 zeigt drei Raman-Spektren von Fibrinogen adsorbiert auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln (oben) und zwei Raman-Spektren von reinem Fibrinogen (*bulk*, unten). Die Zuordnung einiger wichtiger Raman-Banden von Proteinen ist in Tabelle 6.1 aufgeführt [121]. Die Bande bei 1746  $\text{cm}^{-1}$  kann der C=O-Streckschwingung der Säuregruppe zugeordnet werden. Die Amid-I-Bande erscheint bei 1670  $\text{cm}^{-1}$ . Die Bande bei 1609  $\text{cm}^{-1}$  lässt sich der aromatischen C=C Streckschwingung der Aminosäuren Phenylalanin (Phe) und Tyrosin (Tyr) zuordnen. Bei 1552  $\text{cm}^{-1}$  liegt die Amid-II-Bande des Proteins. Die breite Bande bei 1448  $\text{cm}^{-1}$  kann der  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ -Deformationsmode zugewiesen werden. Bei 1424  $\text{cm}^{-1}$  ist die  $\text{COO}^-$ -Streckschwingung zu finden. Die Amid-III-Bande erscheint bei 1244  $\text{cm}^{-1}$  im Raman-Spektrum. Bei 1124  $\text{cm}^{-1}$  liegt die C-N-Streckschwingung vor. Die scharfe Bande bei 1001  $\text{cm}^{-1}$  ist der Ringatmungs-Schwingung des Phenylalanins zuzuordnen [121].

In Abb. 6.16 sind drei Raman-Spektren von auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln adsorbiertem Fibronectin (oben) und vier Spektren von reinem Fibronectin (*bulk*, unten) dargestellt. Bei 1748  $\text{cm}^{-1}$  ist auch hier die C=O-Streckschwingung der Säuregruppe zu sehen. Die Amid-I-Bande erscheint bei 1675  $\text{cm}^{-1}$ . Die Bande bei 1608  $\text{cm}^{-1}$  kann der aromatischen C=C Streckschwingung der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin zugeordnet werden. Bei 1559  $\text{cm}^{-1}$  kann man die Amid-II-Bande erkennen, bei 1255  $\text{cm}^{-1}$  die Amid-III-Bande. Die C-N-Streckschwingung erscheint bei 1166  $\text{cm}^{-1}$ . Die scharfe Bande bei 1005  $\text{cm}^{-1}$  gehört zur Ringatmungs-Schwingung des Phenylalanin.

Um die in den Spektren auftretenden Banden besser charakterisieren zu können, wurden die Banden durch ein Voigt-Profil *angefittet*. Das Voigt-Profil stellt mathematisch eine Faltung aus einem Gauss-Profil und einem Lorentz-Profil dar. Damit berücksichtigt man die beiden voneinander unabhängigen Prozesse, die zu einer Linienverbreiterung führen, nämlich den thermisch bedingten Doppler-Effekt (Gauss-Profil) sowie die natürliche Lini-

**Tabelle 6.1:** Wellenzahlen der Raman-Banden von Proteinen und deren Zuordnung, nach [121].

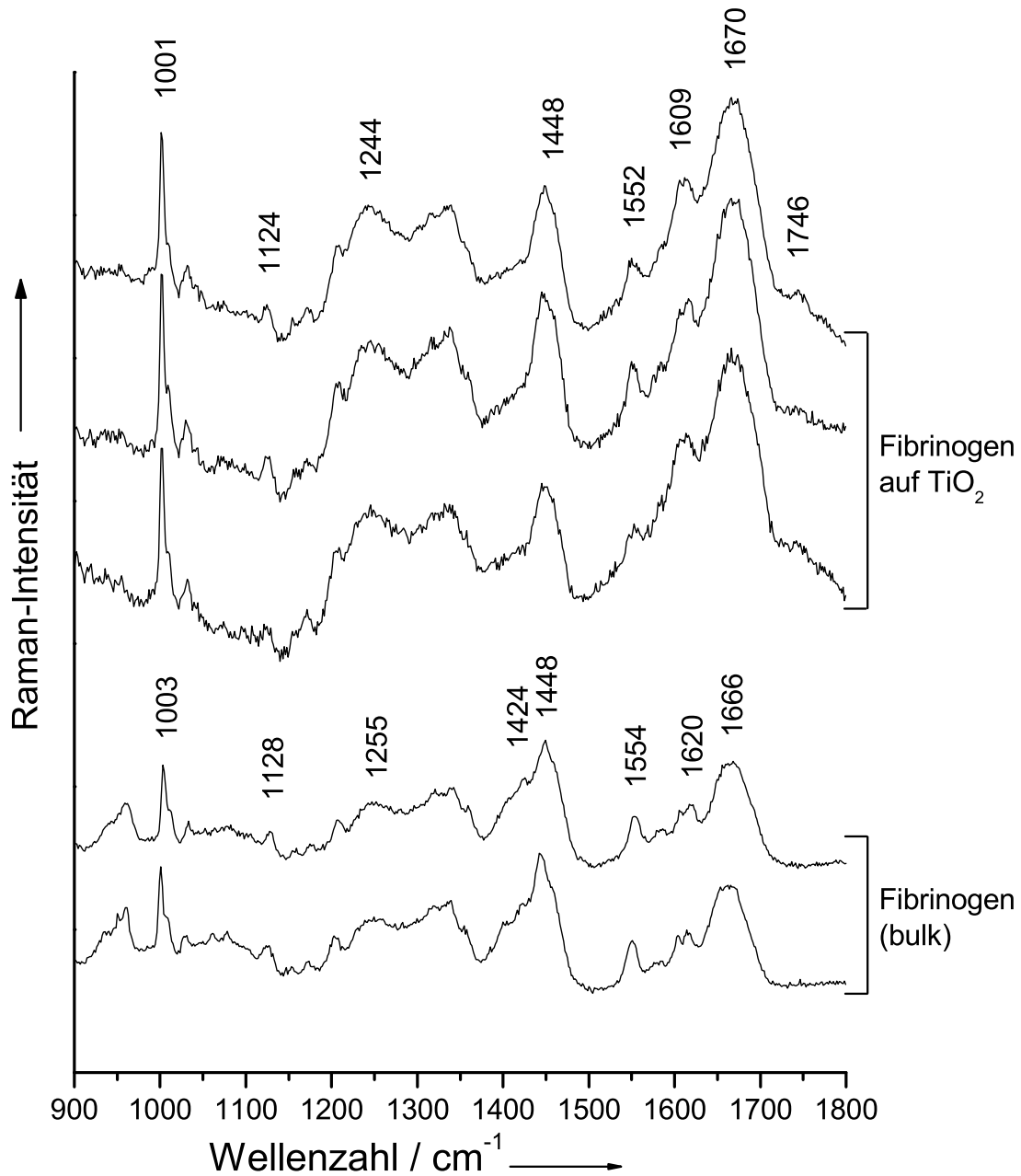
| Wellenzahl (cm <sup>-1</sup> ) | Zuordnung                                     |
|--------------------------------|---|
| 1746                           | $\nu$ (COOH, C=O)                             |
| 1670                           | Amid-I-Bande                                  |
| 1609                           | $\nu$ (C=C <sub>aromat.</sub> ) (Phe, Tyr)    |
| 1552                           | Amid-II-Bande                                 |
| 1448                           | $\delta$ (CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> ) |
| 1424                           | $\nu$ (COO <sup>-</sup> )                     |
| 1244                           | Amid-III-Bande                                |
| 1124                           | $\nu$ (C-N)                                   |
| 1001                           | $\nu$ (CC) (Ringatmungs-Schwingung Phe)       |

$\nu$ , Streckschwingung;  $\delta$ , Deformationsschwingung.

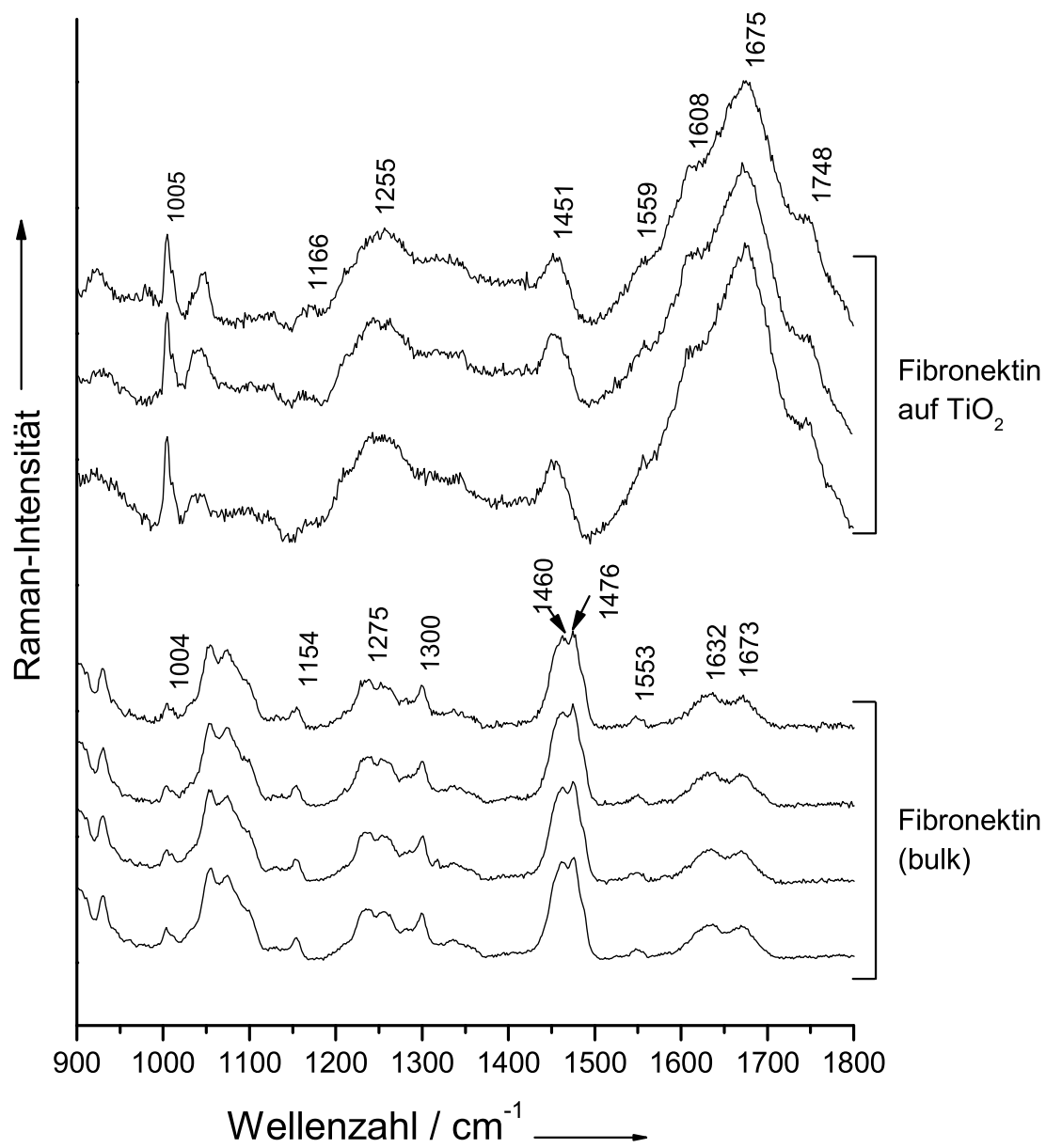
**Tabelle 6.2:** Positionen von Amid-I- und Amid-III-Bande bei unterschiedlichen Sekundärstrukturen, nach [121].

| Bandenposition (cm <sup>-1</sup> ) | Bande          | Strukturinformation                      |
|------------------------------------|----------------|--|
| 1655 ± 5                           | Amid-I-Bande   | $\alpha$ -Helix                          |
| 1670 ± 3                           | Amid-I-Bande   | antiparallele $\beta$ -Faltblattstruktur |
| 1665 ± 3                           | Amid-I-Bande   | ungeordnete Struktur                     |
| ≤ 1275                             | Amid-III-Bande | $\alpha$ -Helix                          |
| 1235 ± 5 (scharf)                  | Amid-III-Bande | antiparallele $\beta$ -Faltblattstruktur |
| 1245 ± 4 (breit)                   | Amid-III-Bande | ungeordnete Struktur                     |





**Abbildung 6.15:** Raman-Spektren von reinem Fibrinogen (*bulk*) und auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln adsorbiertem Fibrinogen. Für eine Basislinienkorrektur wurde das Spektrum von  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln (in PBS-Puffer emulgiert, anschließend zentrifugiert und luftgetrocknet) abgezogen.



**Abbildung 6.16:** Raman-Spektren von reinem Fibronectin (*bulk*) und Fibronectin adsorbiert auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln. Eine Basislinienkorrektur wurde durchgeführt.

enbreite infolge der Unschärfe der Energieniveaus (Lorentz-Profil). Exemplarisch wurde je ein Spektrum von reinem Fibrinogen und Fibronektin sowie von auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln adsorbiertem Fibrinogen bzw. Fibronektin ausgewertet. Es wurde jeweils der Bereich von  $1380\text{ cm}^{-1}$  bis  $1800\text{ cm}^{-1}$  *angefittet*.

Aus den Raman-Spektren können Rückschlüsse über Änderungen in der Sekundärstruktur von Proteinen gezogen werden. Sekundärstruktur-Änderungen erkennt man beispielsweise an einer Verschiebung der Position der Amid-I-Bande.

Bei einer genauen Betrachtung der angefitteten Spektren fällt auf, dass sich die Position der Amid-I-Bande in den Fibrinogen-Spektren leicht von  $1666$  bzw.  $1663\text{ cm}^{-1}$  zu  $1669$  bzw.  $1670\text{ cm}^{-1}$  verschiebt. Die spektrale Auflösung unter den gewählten Messparametern beträgt etwa  $3\text{ cm}^{-1}$  (vgl. Kap. 5.4). Der detektierte Banden-Shift liegt zwar im Bereich der angegebenen Messgenauigkeit, ist jedoch komplett reproduzierbar. Daher kann die Verschiebung der Amid-I-Bande als Indiz für die Strukturänderung des Proteins gesehen werden, die in der Literatur vorhergesagt wird [16–18] (weitere Hinweise über den genaueren Adsorptions-Mechanismus würden polarisierte Messungen sowie temperaturabhängige Messungen liefern, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden).

CD-Spektren bestätigen den hohen Anteil an  $\alpha$ -helikaler-Struktur des reinen Fibrinogen (vgl. Kap. 6.2.1).

Die Position der Amid-I-Bande liegt für eine reine  $\alpha$ -Helix-Struktur bei  $1655 \pm 5\text{ cm}^{-1}$ , für eine reine ungeordnete Struktur (*Random Coil*) bei  $1665 \pm 3\text{ cm}^{-1}$  und für eine reine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur bei  $1670 \pm 3\text{ cm}^{-1}$  (vgl. Tab. 6.2).

Die Verschiebung der Amid-I-Bande zu höheren Wellenzahlen könnte daher mit einem Verlust an  $\alpha$ -Helix-Struktur und ein Gewinn an  $\beta$ -Faltblatt-Struktur erklärt werden.

Die CD-Spektren des Fibronektin lassen auf einen hohen Anteil an ungeordneter sowie einem geringen Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur schließen (vgl. Kap. 6.2.1). Es ist anzunehmen, dass die Amid-I-Bande von Fibronektin von vornherein höher liegt, als die des Fibrinogen, was auch das Raman-Spektrum bestätigt. Die Amid-I-Bande von reinem Fi-

**Tabelle 6.3:** Positionen und Intensitätsverhältnisse der Amid-I-Bande und der CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-Deformationsbande von reinem Fibrinogen und auf TiO<sub>2</sub> adsorbiertem Fibrinogen.

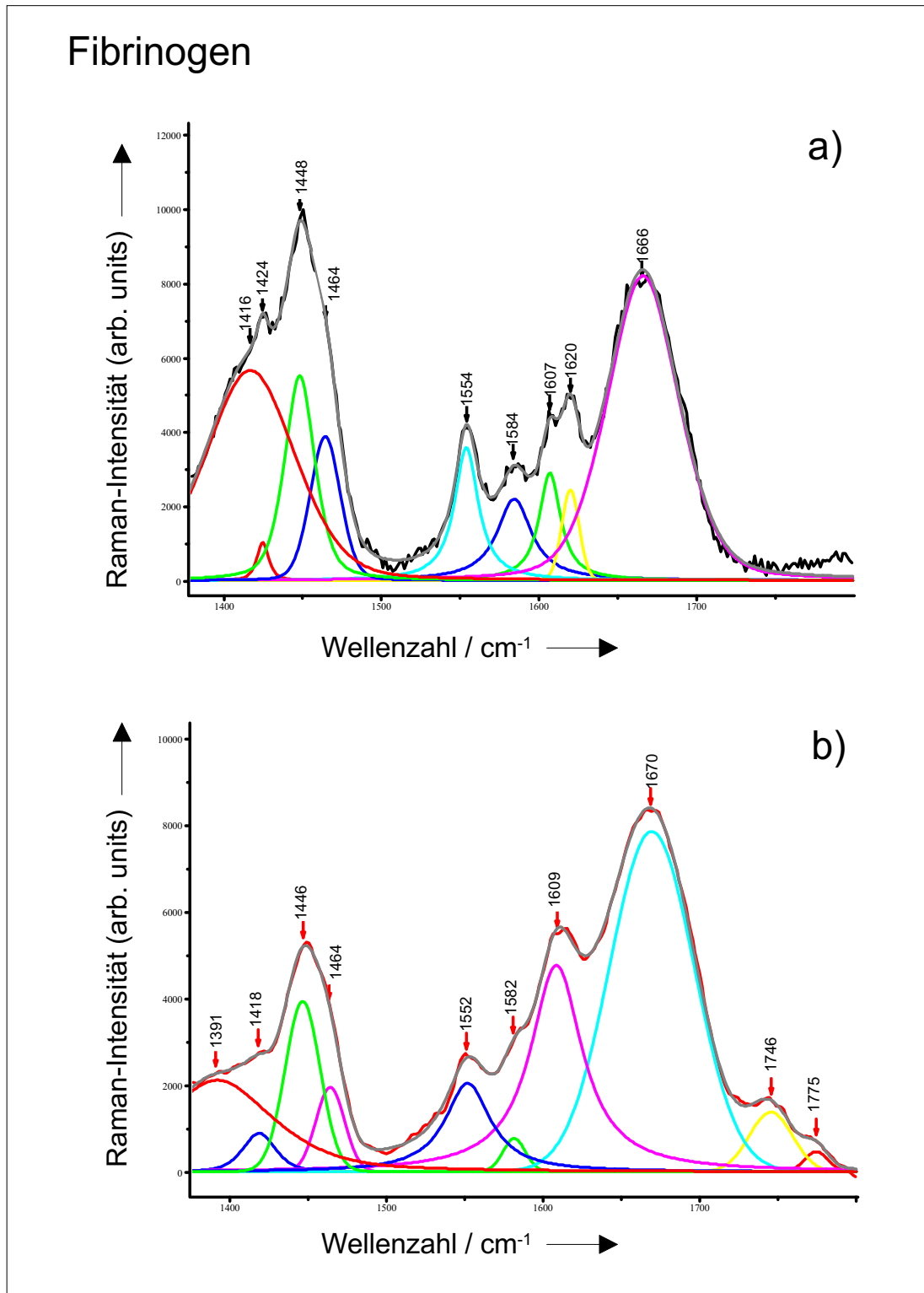
|                            | Amid-I-Bande<br>(cm <sup>-1</sup> ) | $\delta$ (CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> )<br>(cm <sup>-1</sup> ) | Verhältnis der<br>Peakflächen<br>$\delta$ (CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> ) /<br>Amid-I-Bande | Mittelwert |
|----------------------------|-------------------------------------|--|--|------------|
| Fibrinogen                 | 1666                                | 1448   | 0,30   | 0,30       |
|                            | 1663                                | 1459   | 0,30   |            |
| adsorbiertes<br>Fibrinogen | 1669                                | 1446   | 0,21   | 0,19       |
|                            | 1670                                | 1445   | 0,20   |            |
|                            | 1669                                | 1445   | 0,17   |            |

$\delta$ , Deformationsschwingung.

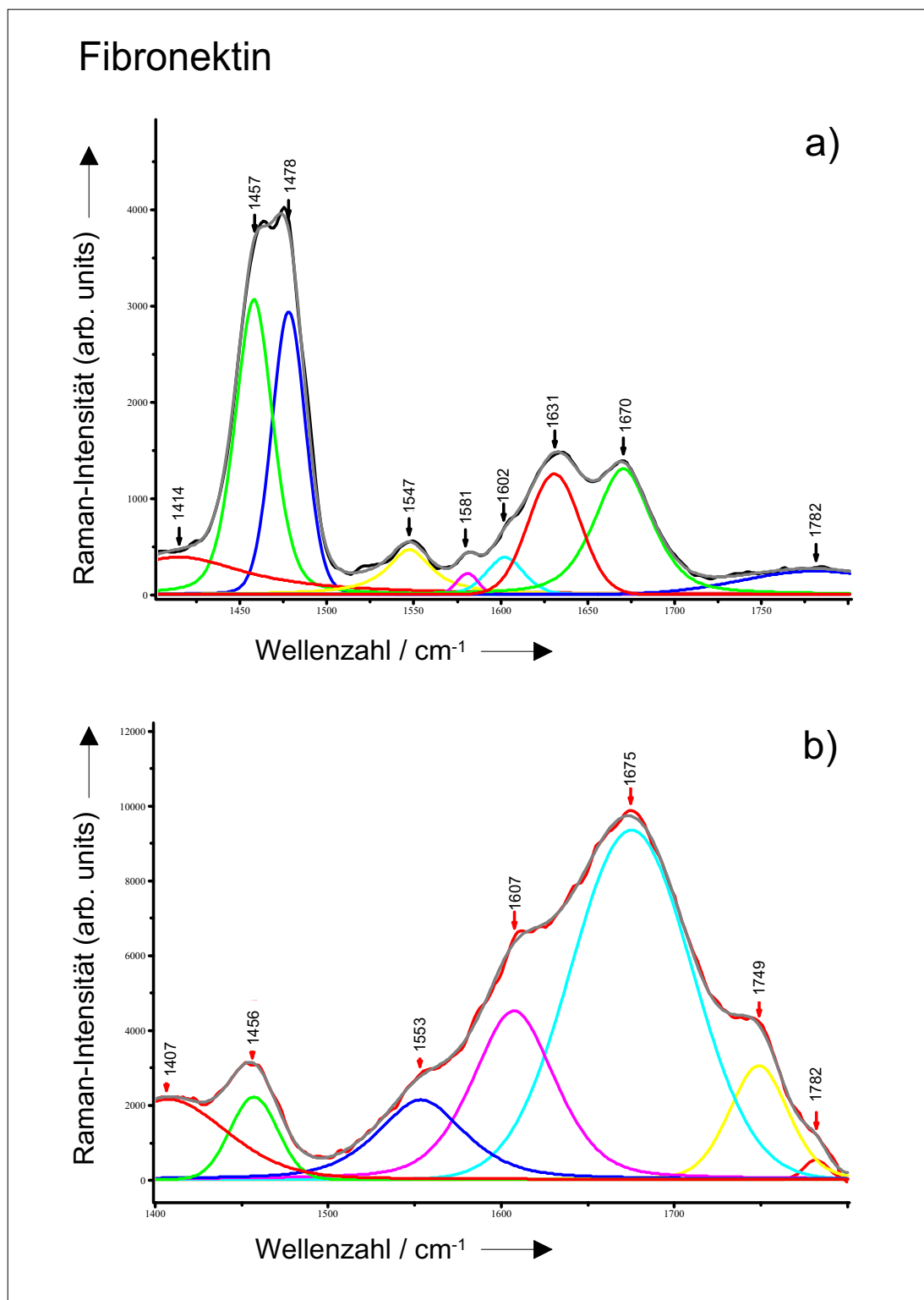
bronektin liegt im Raman-Spektrum bei 1670 cm<sup>-1</sup> bzw. 1674 cm<sup>-1</sup>, von adsorbiertem Fibronektin bei 1675 cm<sup>-1</sup>. Die leichte Verschiebung der Bandenposition könnte mit einem Gewinn an  $\beta$ -Faltblattstruktur und einem Verlust an ungeordneter Struktur erklärt werden.

Bei weiterer Betrachtung der Abb. 6.17 a und b fällt auf, dass sich das Verhältnis der CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-Deformationsmode (1448 cm<sup>-1</sup> und 1666 cm<sup>-1</sup>) zur Amid-I-Bande (1666 cm<sup>-1</sup>) im Spektrum des auf TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln adsorbierten Fibrinogen (b) im Vergleich zum Spektrum von Fibrinogen (a) ändert. Die CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-Deformationsmode nimmt im Spektrum des adsorbierten Fibrinogen relativ zur Amid-I-Bande ab verglichen mit dem Intensitätsverhältnis der Proben des reinen Fibrinogen. Die Verhältnisse der Peakflächen der entsprechenden Banden können Tabelle 6.3 entnommen werden. Das Verhältnis ändert sich von durchschnittlich 0,30 zu 0,19.

Abbildung 6.18 a und b zeigt die gefitteten Spektren des Fibronektin. Hier fällt die Änderung im Peakflächenverhältnis der untersuchten Banden zueinander noch wesentlich stärker aus. Für reines Fibronektin liegt das Verhältnis der Peakflächen der CH<sub>3</sub>,



**Abbildung 6.17:** Anfitzung durch ein Voigt-Profil a) Raman-Spektrum von Fibrinogen (*bulk*) und b) Raman-Spektrum von Fibrinogen auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln (Basislinienkorrektur vgl. Kap. 5.4).



**Abbildung 6.18:** Anfitzung durch ein Voigt-Profil a) Raman-Spektrum von Fibronektin (*bulk*) und b) Raman-Spektrum von Fibronektin auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln (Basislinienkorrektur vgl. Kap. 5.4).

**Tabelle 6.4:** Positionen und Intensitätsverhältnisse der Amid-I-Bande und CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-Deformationsbanden von Fibronectin und Fibronectin adsorbiert auf TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln.

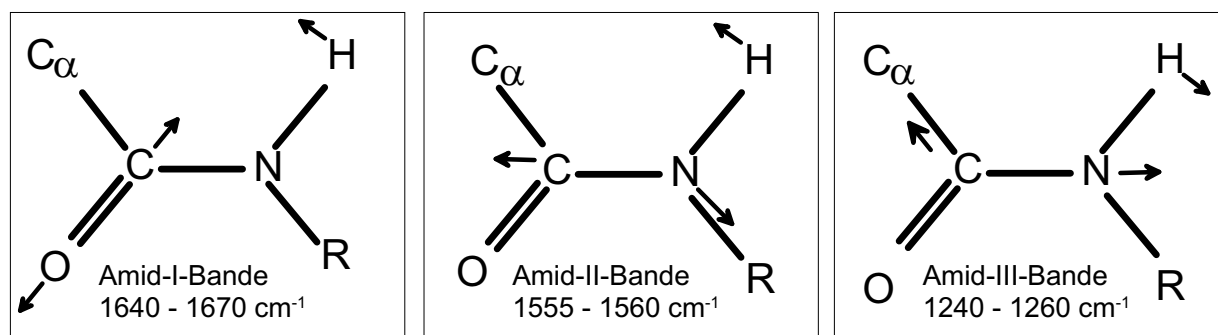
|                             | Amid-I-Bande<br>(cm <sup>-1</sup> ) | $\delta$ (CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> )<br>(cm <sup>-1</sup> ) | Verhältnis der<br>Peakflächen<br>$\delta$ (CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> ) /<br>Amid-I-Bande | Mittelwert |
|-----------------------------|-------------------------------------|--|--|------------|
| Fibronectin                 | 1673                                | 1458   | 2,64   | 2,62       |
|                             | 1670                                | 1457   | 1,42   |            |
|                             | 1674                                | 1457   | 2,51   |            |
|                             | 1674                                | 1458   | 3,94   |            |
| adsorbiertes<br>Fibronectin | 1675                                | 1456   | 0,10   | 0,13       |
|                             | 1675                                | 1455   | 0,17   |            |
|                             | 1675                                | 1456   | 0,12   |            |

$\delta$ , Deformationsschwingung.

CH<sub>2</sub>-Deformationsmode zur Amid-I-Bande bei 2,62 und für adsorbiertes Fibronectin bei 0,13. Es kommt also zu einer sehr deutlichen Abnahme der Peakfläche der CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-Deformationsmode in Relation zur Peakfläche der Amid-I-Bande.

Die Amid-Banden sind die Moden der Gerüstschwingungen des Peptidrückgrats. Diese sind charakteristisch für Proteine und können Informationen zur Struktur durch die Bandenpositionen und -intensitäten beitragen (vgl. Tabelle 6.2). Die Schwingungsmoden der Amid-Banden sind in Abbildung 6.19 dargestellt. Die CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-Deformationsmode resultiert aus den Schwingungen der Seitengruppen. Eine relative Abnahme der Peakfläche dieser Bande lässt vermuten, dass diese Schwingung durch die Adsorption beeinflusst wird. Man geht davon aus, dass die Proteinadsorption vor allem über die negativ geladenen Seitengruppen des Proteins erfolgt, wozu die Asparagin- bzw. Glutaminsäure in Frage kommen [8, 11]. Dies würde die Abnahme der relativen Peakfläche erklären.

Die Raman-Spektren enthalten auch Informationen, die darauf schließen lassen, über



**Abbildung 6.19:** Die Schwingungsmoden der Amid-Ebene (Amid-Banden) der Proteine, nach [22].

welche Seitenketten die Proteinadsorption erfolgt.

Hierzu fällt als weiterer Unterschied zwischen den Spektren der reinen Proteine und den Spektren der auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln adsorbierten Proteine die Bande bei  $1746 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1748 \text{ cm}^{-1}$  auf. Diese erscheint in den Spektren des adsorbierten Fibrinogen als Bande und ist in den Spektren von reinem Fibrinogen (*bulk*) nicht erkennbar (vgl. Abb. 6.15, 6.17). In den Spektren von Fibronectin (vgl. Abb. 6.16, 6.18) kommt diese Bande ebenfalls nur bei den Spektren der adsorbierten Proteine vor. Diese Bande kann, wie bereits erwähnt, der  $\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingung der Säuregruppe zugeordnet werden. Um sicherzustellen, dass es sich bei dieser Bande um die  $\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingung der adsorbierten Carboxylgruppe und nicht die  $\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingung der protonierten Carboxylgruppe handelt, wurden die pH-Werte für Emulsionen von  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln in PBS bzw. dest. Wasser für unterschiedliche Mischungsverhältnisse bestimmt. Der  $\text{pK}_s$ -Wert für die Protonierung der Carboxylgruppe der Seitenkette liegt für die Asparaginsäure bei 3,9, für die Glutaminsäure bei 4,3 [122]; eine Protonierung findet erst bei einem pH-Wert, der saurer ist als dieser  $\text{pK}_s$ -Wert, statt.

Bei der Zugabe von  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln zu PBS-Lösung bleibt der pH-Wert konstant (PBS-Lösung:  $\text{pH}=7,30$ ; 1 mg  $\text{TiO}_2$  in 1 ml PBS:  $\text{pH}=7,45$ ). Der pH-Wert von  $\text{TiO}_2$  in dest. Wasser wird ins saure Milieu verschoben (dest.  $\text{H}_2\text{O}$ :  $\text{pH}=6,72$ ; 1 mg  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel in 1 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$ :  $\text{pH}=5,5$ ).

Die Protein-Adsorption an die Ti-Oberfläche erfolgt aus der PBS-Pufferlösung heraus.



Daher ist davon auszugehen, dass der pH-Wert während des Adsorptionsprozesses konstant bleibt. Beim Waschen wurde für Fibrinogen ebenfalls PBS verwendet, für Fibronectin wurde dest. H<sub>2</sub>O verwendet. Man kann also nur für die Fibrinogen-Proben davon ausgehen, dass der pH-Wert während des Versuches gleich bleibt, für die Fibronectin-Proben gilt dies nur für die Inkubationszeit, die jedoch für die Adsorption entscheidend ist. Bei allen untersuchten Lösungen lagen die pH-Werte noch deutlich oberhalb der pK<sub>s</sub>-Werte der in Frage kommenden Carboxylgruppen der Aminosäuren. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei den gemessenen Proben keine Protonierung der Protein-Seitenketten stattgefunden hat, die das Auftreten der Banden bei 1746 cm<sup>-1</sup> bzw. 1748 cm<sup>-1</sup> erklären könnte.

Um herauszufinden, wie sich das Raman-Spektrum bei einer tatsächlichen Protonierung, beispielsweise bei stark saurem pH-Wert, verändert, wurde Fibrinogen, das in HCl-angesäuertem Wasser (bei pH=7,5, pH=5,5, pH=4,5 und pH=2) umkristallisiert wurde, Raman-spektroskopisch vermessen.

Abbildung 6.20 zeigt Fibrinogen bei den unterschiedlichen pH-Werten. Die Spektren wurden auf die Bande bei 1007 cm<sup>-1</sup> (Ringatmungsschwingung der Phenylgruppe) normiert. Die Ringatmungsschwingung lässt sich nur wenig von äußeren Faktoren (wie beispielsweise pH-Wert-Änderungen oder der Proteinadsorption) beeinflussen und eignet sich daher gut als Normierungsbande. Eine Basislinienkorrektur wurde durchgeführt. Die Spektren sind einander sehr ähnlich. Je kleiner der pH-Wert wird, um so schwächer werden die Banden bei 841 cm<sup>-1</sup> und 881 cm<sup>-1</sup>. Diese Banden können der C–C–Streckschwingung zugeordnet werden. Es fällt auch auf, dass die Bande bei 1422 cm<sup>-1</sup> relativ zur Bande bei 1452 cm<sup>-1</sup> abnimmt, sobald die Probe sich deutlich im sauren Milieu (unterhalb der pK<sub>s</sub>-Werte für die unterschiedlichen Carboxylgruppen) befindet. Dies ist bei einem pH-Wert von 2 in Abb. 6.20 bzw. Abb. 6.21 der Fall. Diese Banden können der COO<sup>-</sup>-Streckschwingung bzw. der CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-Deformationsschwingung zugeordnet werden. Es kommt also bei einem pH-Wert von 2 zu einer deutlichen Abnahme der COO<sup>-</sup>-Streckschwingung, was sich durch die Protonierung der Seitenkette zu COOH erklären lässt.

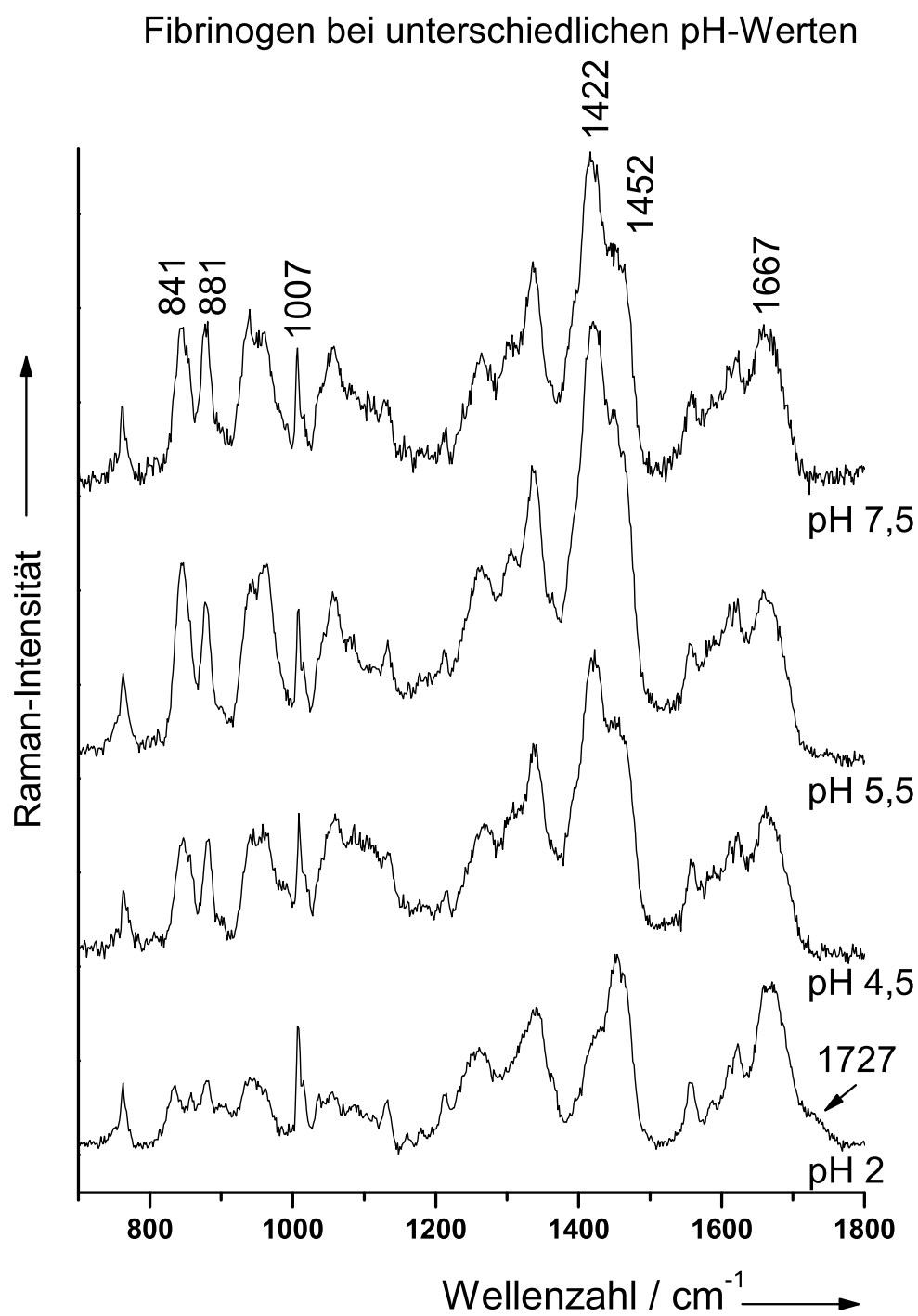


Abbildung 6.20: Raman-Spektren von Fibrinogen bei unterschiedlichen pH-Werten.

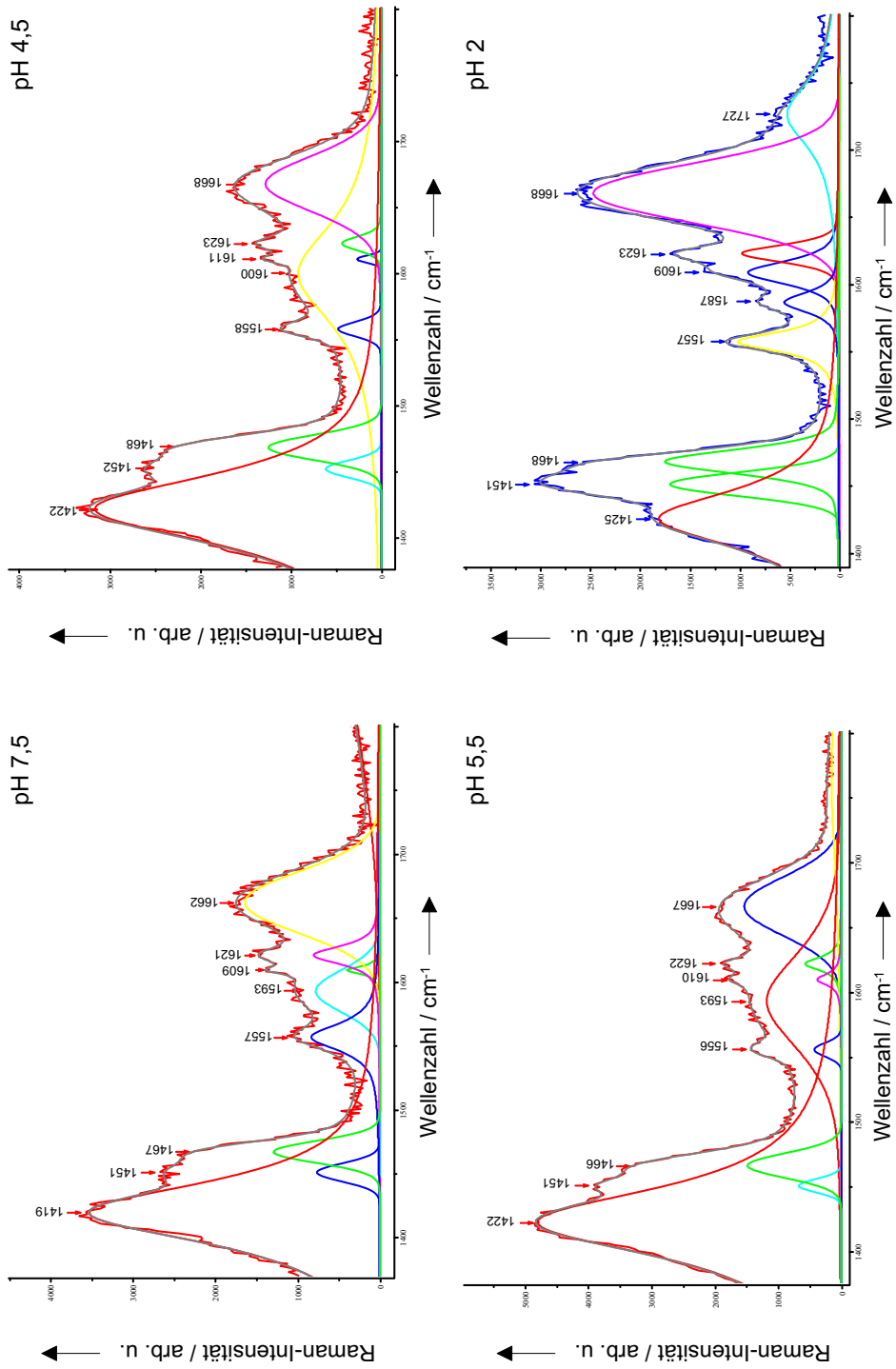
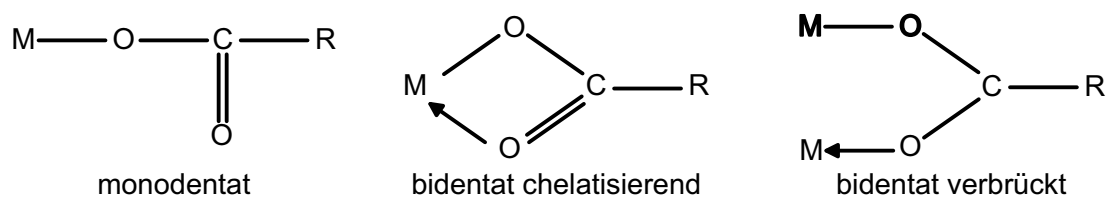


Abbildung 6.21: Anpassung der Raman-Spektren von Fibrinogen bei unterschiedlichen pH-Werten durch ein Voigt-Profil.



**Abbildung 6.22:** Mögliche Koordination einer Carboxylatgruppe ( $\text{R}-\text{COO}^-$ ) an ein Metall-Atom (M). Die Bindung kann monodentat, bidentat chelatisierend oder bidentat verbrückt sein. Nach [123,124].

Ein weiteres Indiz für die Protonierung ist die Bande, die bei  $1727\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum erscheint. Diese Bande lässt sich der  $\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingung der protonierten Carboxylgruppe zuordnen. Mit dem Programm Labspec wurde diese Bande durch ein Voigt-Profil *angefittet* (vgl. Abb. 6.21).

Verglichen mit der Bande, die an  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel adsorbiertes Fibrinogen im Spektrum aufweist, kommt es zu einer deutlichen Verschiebung. In den Spektren des adsorbierten Fibrinogen kann eine Bande bei  $1746\text{ cm}^{-1}$  detektiert werden. Die Verschiebung beträgt etwa  $20\text{ cm}^{-1}$ . Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei dieser Bande um die  $\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingung der an  $\text{TiO}_2$  adsorbierten Carboxylgruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure handelt. Die Bindung scheint monodentat zu sein, da es im Fall einer bidentaten Bindung zu einer Delokalisierung der Elektronen der Carboxylgruppe kommen würde, was eine Bande in einem ganz anderen Bereich des Spektrums erwarten lassen würde. Die möglichen Koordinationen der Carboxylatgruppe an einem Metallatom sind in Abb. 6.22 dargestellt.

Um diese Verschiebung der Carbonylbande besser verstehen zu können, wurde in der Literatur nach vergleichbaren Systemen gesucht. Zum Vergleich werden Systeme herangezogen, die an Stelle des Protons andere Atome und Moleküle am Carboxyl-C-Atom tragen.

Dies ist beispielsweise ein nicht-zyklisches Säureanhydrid, das durch Kondensation zweier Carboxylgruppen entsteht. Bei den Säureanhydriden erscheint die  $\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingung bei  $1750\text{ cm}^{-1}$  [125]. Auch Säurehalogenide können als Vergleich herangezogen

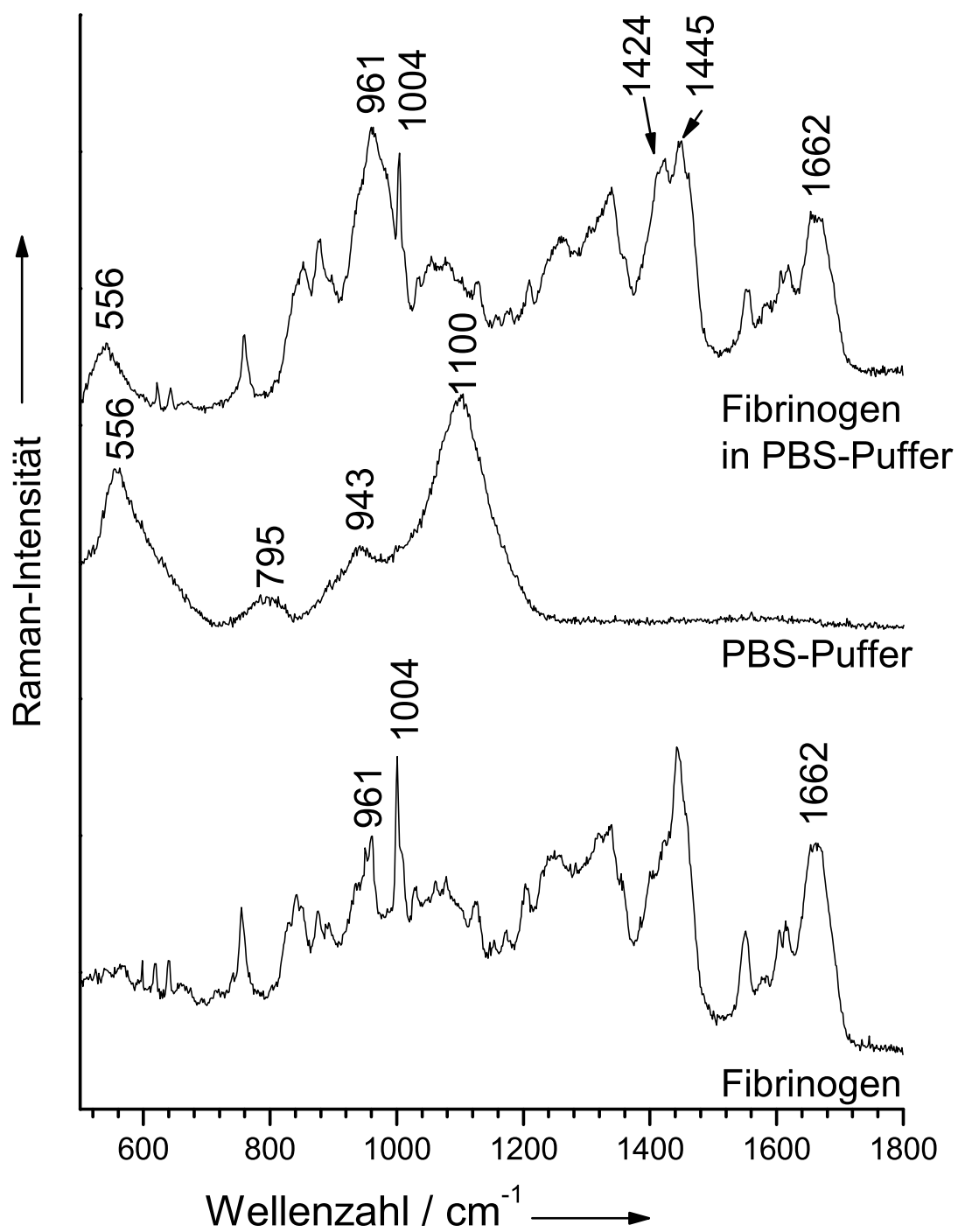
werden. Bei diesen ist die Hydroxygruppe durch ein Halogen substituiert. Dabei weisen Säurebromide in der Regel eine höhere C=O-Frequenz auf, als die entsprechenden Säurechloride. Dieselbe Tendenz ist von Wasserstoff zu Titan zu beobachten. Auch hier nimmt die C=O-Frequenz von der nicht-adsorbierten, protonierten zum an Titandioxid adsorbierten Protein von  $1727\text{ cm}^{-1}$  nach  $1746\text{ cm}^{-1}$  zu [125]. Zieht man den Vergleich zur Verschiebung der Carbonylbande der Ester, so läßt sich feststellen, dass es von Alkylformaten zu den Alkylacetaten ebenfalls zu einer Verschiebung zu höheren Wellenzahlen kommt. Auch hier ist wieder der Effekt zu beobachten, dass sich bei einer Erhöhung der Masse am Carbonyl-C-Atom die C=O-Schwingung zu höheren Wellenzahlen verschiebt.

Bei Aldehyden und Ketonen kommt es durch die höhere Masse des Atoms, welches an das Carbonyl-C-Atom gebunden ist, zu einer Verschiebung der Carbonylbande um  $17\text{ cm}^{-1}$ . Die Schwingung des Ketons tritt bei einer höheren Wellenzahl auf als die des Aldehyds [125].

Auch das Lösungsmittel PBS kann die Spektren und die Bandenlagen beeinflussen. Um ausschließen zu können, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen der Spektren um Veränderungen handelt, die vom Lösungsmittel verursacht wurden, wurde auch dies Raman-spektroskopisch überprüft.

Fibrinogen wurde in PBS gelöst und im Anschluss daran getrocknet. Auch die reine PBS-Lösung wurde eingetrocknet. Beide Proben wurden Raman-spektroskopisch untersucht.

Die Raman-Spektren der Proben sind in Abb. 6.23 dargestellt. Es fällt auf, dass im Raman-Spektrum von Fibrinogen (gelöst in PBS und eingetrocknet) die Bande bei  $1424\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{COO}^-$ -Streckschwingung) im Vergleich zu der Bande bei  $1445\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ -Deformationsschwingung) bei der in PBS gelösten und anschließend getrockneten Probe noch deutlicher hervortritt, als bei der Ausgangsprobe. Eine breite Bande bei  $961\text{ cm}^{-1}$  erscheint im Spektrum. Diese ergibt sich aus einer Überlagerung der Banden des Fibrinogen mit den Banden des Puffers. Die Phosphat-Banden des PBS-Puffers liegen bei  $795\text{ cm}^{-1}$  und  $943\text{ cm}^{-1}$ . Bei  $556\text{ cm}^{-1}$  und  $1100\text{ cm}^{-1}$  erscheinen Glas-Banden des



**Abbildung 6.23:** Raman-Spektren von reinem Fibrinogen (*bulk*), PBS-Puffer (eingetrocknet) und Fibrinogen gelöst in PBS (und wieder eingetrocknet).

Objektträgers, auf welchem der PBS-Puffer getrocknet wurde, im Raman-Spektrum des Puffers. Es kommt zu einer Überlagerung beider Spektren, wodurch es zu Unterschieden in der relativen Intensität einiger Banden (vor allem im Bereich um  $800\text{ cm}^{-1}$ ) kommt. Durch den Einfluss der PBS-Pufferlösung scheint es nicht zu einer Protonierung der Säuregruppe zu kommen. Dies ist auch nicht zu erwarten, da der pH-Wert der PBS-Lösung 7,4 beträgt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es in den Raman-Spektren der adsorbierten Proteine zu einer leichten Verschiebung der Amid-I-Bande kommt, was darauf hindeutet, dass es in der Sekundärstruktur von Fibrinogen zu einer Zunahme von  $\beta$ -Faltblatt-Struktur zu kommen scheint. Dieser Effekt ist auch bei Fibronectin zu beobachten.

Eine neu auftauchende Bande im Spektrum der adsorbierten Proteine kann dahingehend gedeutet werden, dass die Adsorption von Fibrinogen und Fibronectin auf dem Implantat-Material Titandioxid über die Carboxyl-Seitenketten erfolgt. Es wurde überprüft, dass diese Bande nicht durch das Protonieren der Carboxylgruppen entsteht. Auch der Puffer, der als Lösungsmittel verwendet wird, kann das Auftauchen dieser Bande nicht erklären.

Im Teil I dieser Arbeit wurden die räumliche Verteilung von Proteinen auf Implantat-Oberflächen sowie die strukturellen Änderungen von Proteinen durch den Adsorptionsprozess mit unterschiedlichen mikroskopischen und spektroskopischen Methoden untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass sich alle untersuchten Proteine an die Titan-Oberfläche anlagern. Ein Zusammenhang zwischen der hier aufgelösten Oberflächenmorphologie und der Proteinanlagerung konnte nicht festgestellt werden. Bei der Adsorption ändert sich die Sekundärstruktur der Proteine, was unter anderem bewirkt, dass ein höherer Anteil an Seitengruppen in einer Ebene liegt und in Richtung der Implantat-Oberfläche orientiert ist. Da die Adsorption über die Carboxylgruppen bestimmter Aminosäuren erfolgt, kann durch die strukturelle Änderung eine stärkere Anheftung an die Oberfläche erfolgen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können dazu beitragen, das Verständnis über die Adsorptionsprozesse an Implantat-Materialien zu erweitern und so-

mit dem Phänomen der Proteinadsorption weiter auf die Spur zu kommen. Das Fernziel ist eine Nutzung dieses Wissens für die Materialforschung und eine Verbesserung der Biokompatibilität von für die Medizin verwendeten Implantat-Materialien.



## Teil II

# Zusammensetzung und räumliche Verteilung von Propolis in den Waben von *Apis mellifera carnica* POLLM.



## 7 Einleitung und Zielsetzung Teil II

Im Teil II dieser Arbeit werden die chemische Zusammensetzung und die räumliche Verteilung von Propolis, dem Kittharz der Honigbienen, an Wabenproben von *Apis mellifera carnica* untersucht. Die räumliche Verteilung des Kittharzes läßt auf dessen Nutzen schließen, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Propolis wird unter anderem zum Abdichten von Rissen im Stock verwendet und ist vor allem auch wegen seiner antiseptischen Wirkung bekannt [31, 32]. Es sind aber noch andere wichtige Aufgaben des Propolis in der Diskussion. Eine Hypothese ist, dass die Propolissschicht auf einer Wabe den Bienen signalisiert, dass der Bau an dieser Wabe eingestellt werden kann [29, 30]. Dieser Hypothese steht entgegen, dass nicht auf allen Waben Propolis gefunden wird. Eine neu aufgestellte Hypothese ist, dass Propolis in die Waben eingebaut wird, um die Materialbeschaffenheit des Wachses zu ändern, was sich auf die Vibrationsweiterleitung beim Schwänzeltanz der Bienen auswirken könnte. Honigbienen sind als Sozialstaat organisiert. Die ausgeklügelte Aufgabenteilung, die für das Überleben des Bienenvolkes essentiell ist, ist sehr effektiv organisiert [27]. Dies ist nur durch die Kommunikation der Bienen möglich. Diese Kommunikation ist ein sehr komplexer Verhaltensablauf, der einen besonderen Platz in der Verhaltensforschung einnimmt [126, 126–129]. Die Vibrationsweiterleitung beim Schwänzeltanz der Bienen ist für dieses Kommunikationssystem der Bienen von Bedeutung [130] und somit von besonderem Interesse für die Verhaltensforschung. Die Wabenarchitektur fungiert als Träger der mechanischen Kommunikationssignale und es wird diskutiert, dass die einer Tänzerin folgenden Bienen die Tanzbewegungen nicht nur mit den Antennen wahrnehmen, sondern die Detektion der Vibrationen, die beim Tanz auf die Wabe übertragen werden zudem mit Rezeptoren in den Beinen der Bienen erfolgt [130].

Die chemische Zusammensetzung und die räumlichen Verteilung von Propolis in den Waben bzw. auf der Waben-Oberfläche wurde in diesem Teil der Arbeit mit Mikro-Raman-Spektroskopie und Raman-Mapping charakterisiert [118].

Die Raman-Spektroskopie eignet sich sehr gut, um biologische Proben wie beispielsweise pflanzliche und tierische Gewebe [45–47], Wachse und Harze [131, 132] oder Honig [133] zu analysieren. Eine gute räumliche Auflösung der spektralen Information erzielt man unter Verwendung von Raman-*Mapping* oder Raman-*Imaging* [48, 134, 135]. Diese Methoden bieten gegenüber den herkömmlichen Methoden, die für die Analytik von Wachs und Propolis eingesetzt werden, den Vorteil der hohen Ortsauflösung. Diese liegt im Bereich von etwa einem  $\mu\text{m}$ . Mit Analysemethoden wie beispielsweise der Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) [136–141] oder HPLC (Hochflüssigkeitsschromatographie) [142, 143] können die Proben zwar sehr genau analysiert werden, es können aber kaum Informationen zur räumlichen Anordnung von Propolis in den Waben erhalten werden.

Zunächst wird die Charakterisierung von Propolis und Wachs vorgestellt. Hierzu werden jeweils Proben dieser Komponenten sowie repräsentative Einzelkomponenten dieser beiden Stoffgemische Raman-spektroskopisch analysiert. Es werden auch Raman-Spektren verschiedener Pflanzenharze aufgenommen, welche in unseren Breiten als Propolis-Quelle in Frage kommen, um zu untersuchen, welche Harze von den Bienen gesammelt werden.

In einem zweiten Schritt wird die räumliche Verteilung des Propolis in den Waben bzw. auf den Waben-Oberflächen charakterisiert. Bestimmte Bereiche der Waben werden mit Raman-*Mapping* *abgescannt*. Es wird untersucht, wie das Propolis auf den Waben verteilt vorliegt; ob es zu einer Durchmischung von Wachs und Propolis kommt und ob sich Propolis auch im Inneren der Waben befindet.

Das Ziel dieser Arbeit ist, durch ein möglichst umfassendes Wissen über die Verteilung des Propolis in den Waben bzw. auf der Waben-Oberfläche auf dessen Nutzen für die Bienen schließen zu können. Die Verhaltensforschung erhofft sich durch Informatio-

---

nen über die Verteilung des Propolis und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Wabenstruktur weitere Aufschlüsse über die Kommunikation der Honigbienen.

## 8 Grundlagen

In diesem Kapitel sind wichtige Grundlagen dargestellt, die zum Verständnis der spektroskopischen Untersuchungen zum Einbau von Propolis in Bienenwaben von Bedeutung sind. Zunächst wird erläutert, was bisher über die Verwendung von Propolis im Bienenstock bekannt ist. Auch auf die Kommunikation der Bienen über den Schwänzeltanz wird kurz eingegangen. Dies ist wichtig, um zu verstehen, warum sich der Einbau von Propolis in die Waben auf die Kommunikation der Honigbienen auswirken kann. Außerdem werden die chemische Zusammensetzung von Propolis sowie die chemische Zusammensetzung von Wachs beschrieben.

### 8.1 Die Verwendung von Propolis im Bienenstock

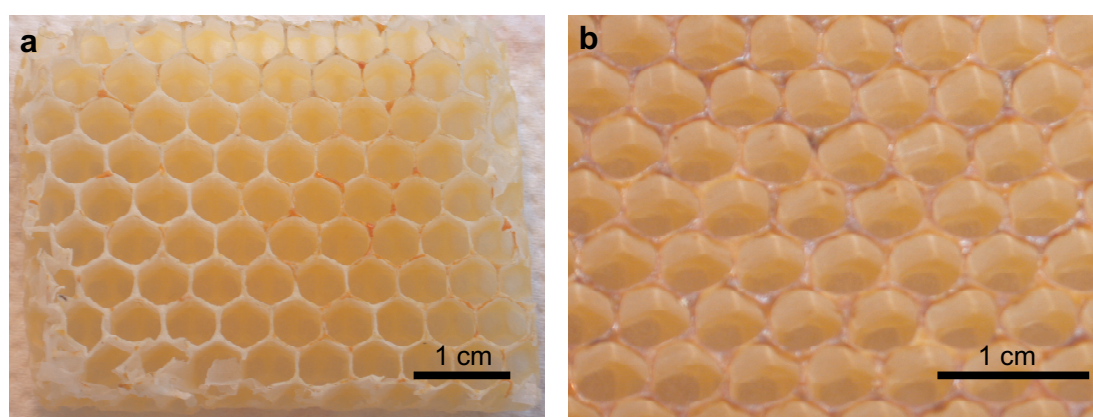
Propolis ist ein Oberbegriff für natürliche, harzige Substanzen, die von Bienen wie beispielsweise *Apis mellifera carnica* POLLM. an Pflanzen und Knospen gesammelt werden [31]. Die Bienen nehmen das Harz mit ihren Mandibeln auf und transportieren es in den Pollenhöschchen zum Stock. Während des Sammelns wird das Harz mit Sekreten der Mandibulardrüsen vermischt [144]. Die Bienen nutzen Propolis zum Abdichten des Stockes [31, 139, 145] und um getötete eingedrungene Feinde, die aufgrund ihrer Größe nicht aus dem Stock befördert werden können, zu mumifizieren [32, 146, 147]. Propolis weist eine antibakterielle, antifungale, antivirale und antioxidative Aktivität auf [32, 139, 148].

Diese Wirkung wird auf die im Propolis enthaltenen Flavonoide sowie aromatische Säuren und Ester zurückgeführt. Galangin, Pinoembrin und Pinostrobin werden als die effektivsten antibakteriellen Komponenten des Propolis angesehen. Ferulasäure und Kaffeesäure werden auch mit dieser Wirkung von Propolis in Verbindung gebracht [32, 33, 149, 150].

Über die Verwendung des Propolis gibt es neben der antiseptischen Wirksamkeit und dem damit verbundenen Nutzen für die Bienen als Desinfektionsmittel noch andere Hypothesen. Darchen [29] stellte in den 1960er Jahren Experimente zum Nestbauverhalten der Honigbienen an. Er postulierte, dass das Propolis auf die Wabenränder aufgebracht wird, um den Baubienen zu signalisieren, mit dem Bau an dieser Wabe zu stoppen. Ein Entfernen der Propolis-Schicht führt zum Weiterbauen der Bienen an den Zellen. Chauvin [30] führte die Experimente weiter und bestätigte diese Beobachtungen. Eine weitere Hypothese ist, dass die gezielte Anwendung von Propolis beim Wabenbau eine wichtige Rolle für die Wabenkonstruktion spielt. Die physikalischen Wachseigenschaften wie beispielsweise Schmelzpunkt, Elastizität etc. können durch eine Beimischung von Propolis beeinflusst werden. Durch den Einbau von Propolis an bestimmten Stellen der Wabe könnte es zu einer Verstärkung bestimmter Wabenstrukturen kommen. Dies hätte einen Einfluss auf die Vibrationsweiterleitung, was auch eine Auswirkung auf die Signalübertragung bei der Kommunikation der Honigbienen über den Schwänzeltanz haben könnte [130]. Durch diesen sind die Bienen in der Lage, Informationen über Entfernung und Richtung einer Futterquelle an die Sammelbienen weiterzugeben. Diese Tänze finden auf den Waben statt. Die Richtung zur Futterquelle wird als Winkel zwischen Sonnenazimut und Futterquelle definiert; im Stock wird dieser Sonnenwinkel in einen Winkel zur Richtung der Schwerkraft übersetzt. Die Entfernung zur Futterquelle wird in der Anzahl Schwänzelläufe pro Zeiteinheit verschlüsselt, mit zunehmender Entfernung der Futterquelle sinkt die Schwänzelfrequenz exponentiell ab. Der Schwänzeltanz wird und von Bienen, die dem Tanz folgen, über die Antennen wahrgenommen. Es wird zudem diskutiert, dass auch über die Beine der Tänzerin Vibrationen an die Wabe weitergegeben werden, welche die Nachfolgerinnen über Rezeptoren in den Beine detektieren können [27, 130]. Die Vibrationsweiterleitung erfolgt in diesem Fall über den Untergrund, sprich: die Bienenwaben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Raman-Mapping untersucht, wie Propolis in den Waben bzw. auf der Waben-Oberfläche verteilt ist. Dabei war auch von Interesse, ob Propolis und Wachs eine einzige oder zwei getrennte Phasen bilden.

In der Literatur wird berichtet, dass Propolis auch einen relativ großen Wachsanteil hat. Es wird von einem Anteil von 30-40 % Wachs am Gesamtpropolis gesprochen [151–153]. Mittels Mikro-Raman-Spektroskopie wurde untersucht, ob reines Propolis, welches zum Abdichten des Stockes verwendet wird, Wachs enthält.



**Abbildung 8.1:** Fotos von Waben der Honigbiene *Apis mellifera carnica* POLLM. a) auf der Wabe sind kleine rote Tröpfchen zu erkennen b) die Wabe ist mit einem braunen Überzug belegt.

Abbildung 8.1 zeigt zwei Fotos von Ausschnitten aus Bienenwaben von *Apis mellifera carnica*. In a sind kleine rote Tröpfchen erkennbar, die sich auf den Wabenrändern befinden. In b sind die Wabenränder dunkel gefärbt. Anhand dieser Aufnahmen kann keine Aussage getroffen werden, um welche Substanz es sich dabei jeweils handelt. Die farblichen Veränderungen können sowohl Alterungserscheinungen (gealtertes Wachs wird im Laufe der Zeit dunkler) als auch eine aufgelagerte Substanz wie beispielsweise Propolis sein. Außerdem soll die Frage geklärt werden, wie diese Substanz mit dem Wachs verbunden ist, ob sie auf dem Wachs liegt oder mit dem Wachs durchmischt vorliegt.



## 8.2 Zusammensetzung von Propolis

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung von Propolis analysiert, um das Raman-Spektrum des Propolis charakterisieren und eine Aussage darüber treffen zu können, ob es sich bei den Proben um reines Propolis oder um Propolis mit Anreicherungen verschiedener anderer Komponenten handelt.

Die Zusammensetzung von Propolis ist in Tab. 8.1 dargestellt. Die Strukturformeln einiger wichtiger Propolis-Inhaltsstoffe sind in Abb. 8.2 dargestellt. Den größten Anteil stellen die Flavonoide, gefolgt von den Estern. Die aromatischen und aliphatischen Säuren sowie weitere aromatischen Komponenten stellen einen geringeren Anteil dar. Die hier aufgeführten Standardsubstanzen nach Hegazi et al. [141] wurden anhand von Gaschromatographie-Massenspektrometrie alkoholischer Propolis-Extrakte gewonnen.

Da die vorherrschenden Baumarten von Standort zu Standort sehr unterschiedlich sein können, variiert auch die Zusammensetzung des Propolis je nach Standort. Beim Vergleich von verschiedenen Propolis-Proben muss daher darauf geachtet werden, Proben von solchen Standorten miteinander zu vergleichen, an denen ähnliche klimatische Bedingungen sowie eine ähnliche Bodenbeschaffenheit vorherrschen. Die Proben, die Hegazi et al. für die GC-MS Analysen verwendet haben stammen aus Hannover. Dieser Standort ist von den klimatischen Bedingungen und der Bodenbeschaffenheit vergleichbar mit dem Standort Würzburg, von welchem die in dieser Arbeit untersuchten Proben stammen. Ein Vergleich mit Würzburger Proben ist daher durchaus gerechtfertigt.

Propolis wird in den gemäßigten Klimazonen von den Bienen vor allem an der Schwarzpappel *Pupulus nigra* gesammelt [136, 141, 152, 154–156]. Weitere Pflanzenarten, die für die Zusammensetzung von Propolis in den gemäßigten Zonen eine Rolle spielen können, sind Birke, Esche, Erle, Buche, verschiedene Koniferen-Arten und die Rosskastanie [31], sowie Prunus-Arten und Akazien [32].

Anhand von Untersuchungen an britischen Proben von Propolis und Pappelharz wurde ein sehr enger Zusammenhang zwischen dem Harz und dem im selben Gebiet gesammel-

**Tabelle 8.1:** Anteile der wichtigsten in Propolis vorkommenden Komponenten und deren prozentualer Anteil am Gesamtpropolis, nach [141].

| Substanzklasse / Substanz                | Anteil an Propolis (% TIC) |
|--|----------------------------|
| <b>Flavonoide</b>                        |                            |
| Galangin                                 | 21,6                       |
| Pinobankasin-3-acetat                    | 9,3                        |
| Pinocembrin                              | 6,9                        |
| Pinobankasin                             | 4,8                        |
| Chrysin                                  | 3,5                        |
| 5, 7- Dihydroxy-3-butanoxylflavanon      | 3,0                        |
| <b>Ester</b>                             |                            |
| 2-Phenylethylkaffeat                     | 17                         |
| Benzylferulat                            | 8,0                        |
| 2-Phenylethylkaffeat                     | 5,8                        |
| Zimtsäurekaffeat                         | 5,6                        |
| Zimtsäure- <i>trans</i> -Kumarat         | 3,4                        |
| Zimtsäureisoferulat                      | 2,8                        |
| Benzyl- <i>trans</i> -4-kumarat          | 2,7                        |
| Benzylkaffeat                            | 1,5                        |
| <b>aromatische Säuren</b>                |                            |
| <i>trans</i> -Kumarsäure                 | 6,7                        |
| Kaffeesäure                              | 2,6                        |
| Benzoessäure                             | 1,3                        |
| <b>weitere aromatische Komponenten</b>   |                            |
| 2,3,5,6-Tetrahydroxymethylglucofuranosid | 1,6                        |

TIC = Total Ion Current

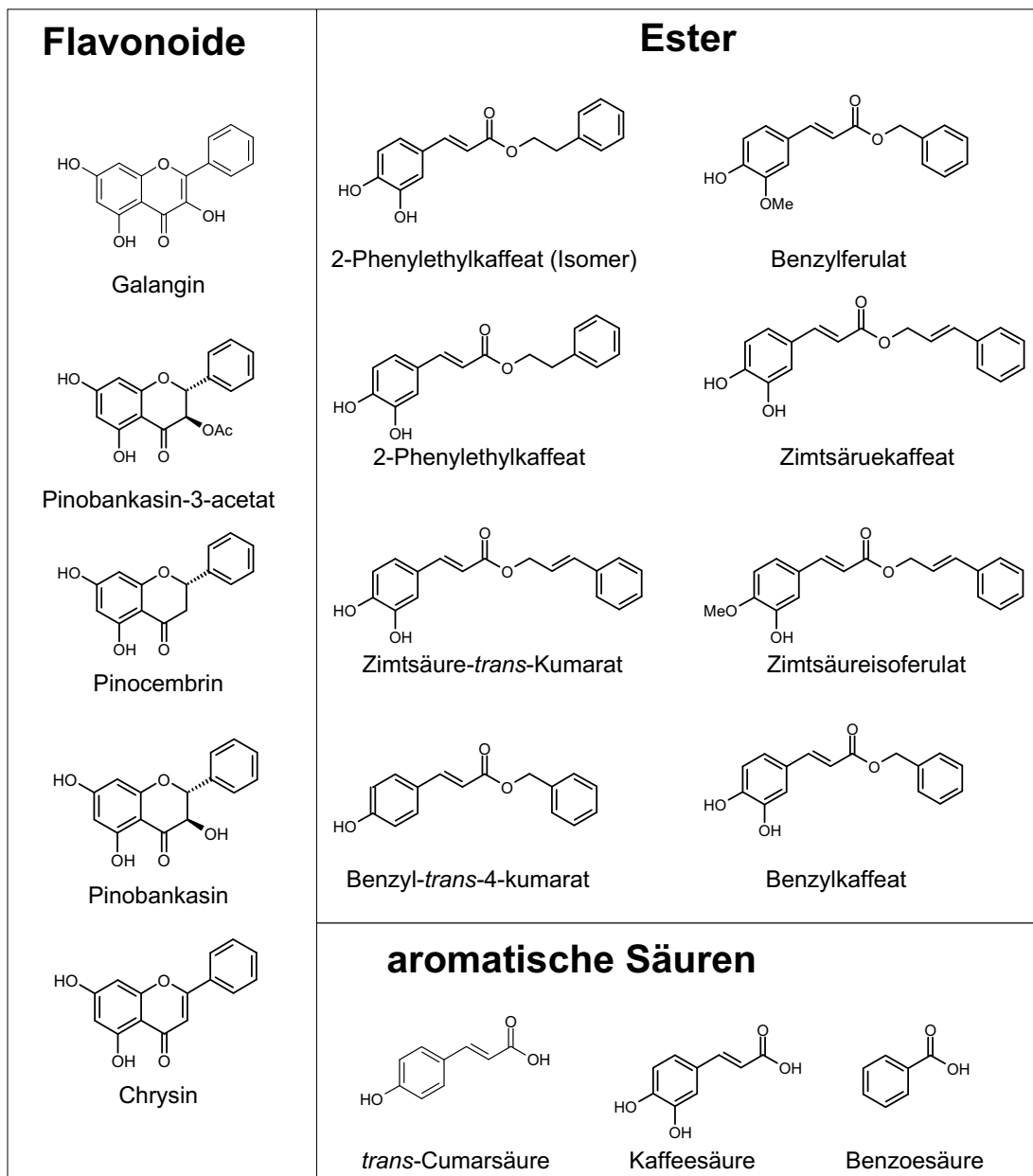
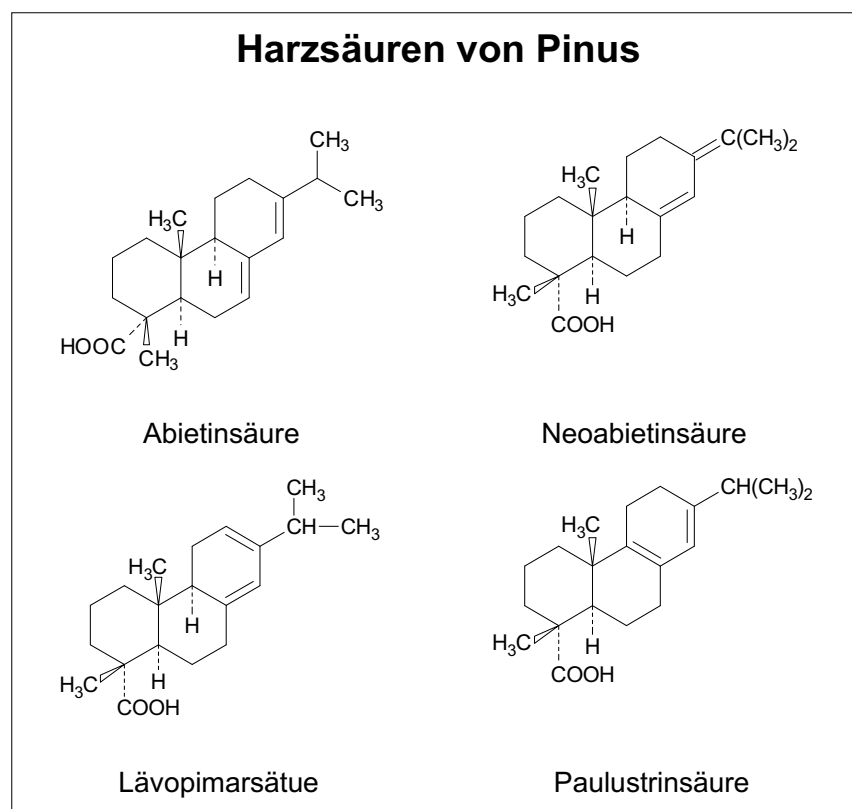


Abbildung 8.2: Strukturformeln einiger Vertreter der wichtigsten Substanzklassen des Propolis



**Abbildung 8.3:** Strukturformeln einiger wichtiger Harzsäuren der Kiefer, nach [157].

ten Propolis festgestellt. In diese Untersuchung wurden auch das Harz der Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*) und Coniferenharz einbezogen. Das Harz der Rosskastanie unterscheidet sich deutlich vom Harz der Pappel. Es enthält keine Benzol- Phenol- und Flavonoidkomponenten. Auch das Coniferenharz unterscheidet sich deutlich vom Harz der Pappel. Es enthält die typischen Harzsäuren (vgl. Abb. 8.3) [158, 159]. In der Arbeit von Greenaway et al. wurde festgestellt, dass diese Harze keinen merklichen Anteil an dem untersuchten Propolis hatten, obwohl es genügend Harzquellen in der unmittelbaren Umgebung des untersuchten Stockes gegeben hätte [152].

## 8.3 Zusammensetzung von Wachs

Auch die Zusammensetzung von Wabenwachs von *Apis mellifera carnica* wurde in dieser Arbeit Raman-spektroskopisch untersucht. Das Ziel war dabei, das Raman-Spektrum von Wabenwachs genau zu charakterisieren, um Fremdbestandteile der Wabenproben von den Wachsbestandteilen unterscheiden zu können. Es wurde auch untersucht, inwiefern sich das Raman-Spektrum von Wachs durch die Kettenlänge der im Wachs vorkommenden Kohlenwasserstoffe ändert. Die Kettenlänge von Kohlenwasserstoffen hat einen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Wachse. Diese würden sich wiederum auf die Vibrationsweiterleitung in den Waben auswirken.

Bienenwachs setzt sich hauptsächlich aus aliphatischen Kohlenwasserstoffen der Kettenlängen C<sub>21</sub> bis C<sub>51</sub> zusammen. Die quantitative Zusammensetzung von mittelaltem Wachs (2-3 Jahre alt) kann der Tabelle 8.2 entnommen werden. Dabei handelt es sich um eine Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Analyse (GC-MS) von Wabenwachs von *Apis mellifera carnica* aus den Beständen der Bienenstation Würzburg [160]. Eine ähnliche Zusammensetzung findet sich auch in den Lehrbüchern wieder [161].

Für die Bienen spielt Wachs eine besondere Rolle, da es zur Bildung von Brut- und Vorratswaben verwendet wird und somit die natürliche Umgebung der Bienen darstellt.

Auch die Bienen selbst haben über der Cuticula eine dünne Wachsschicht, die sie vor zu großem Wasserverlust sowie vor Mikroorganismen, parasitischen Insekten und anderen Feinden schützt [162].

Das Wachs wird von den Bienen synthetisiert und in kleinen Schüppchen abgegeben. Die Sekretion erfolgt über die Wachsdrüsen, die sich zwischen dem dritten und sechsten Hinterleibssegment befinden. Rohstoff-Hauptlieferanten für die Wachssynthese sind Zucker (Fructose, Glucose und Saccharose). Auch Pollen spielt eine Rolle bei der Wachsproduktion, wenn auch nur indirekt. Die im Pollen enthaltenen Proteine sind für die Entwicklung der Wachsdrüsen notwendig und haben somit einen positiven Einfluss auf die Wachsproduktion [163–165].

**Tabelle 8.2:** Anteile der wichtigsten in Bienenwachs von *Apis mellifera carnica* vorkommenden Substanzklassen und deren prozentualer Anteil am Gesamtwachs, nach [160].

| Substanzklasse          | Anteil an mittelaltem Wachs (%) |
|-------------------------|---------------------------------|
| Ester                   | $47 \pm 4,0$                    |
| Alkan                   | $15 \pm 1,7$                    |
| ungesättigte Alkylester | $12 \pm 1,4$                    |
| Alkene                  | $8,8 \pm 0,98$                  |
| Hydroxyalkylester       | $8,1 \pm 1,57$                  |
| Alkohole                | $0,74 \pm 0,128$                |
| Alkadiene               | $0,72 \pm 0,077$                |
| Säuren                  | $0,51 \pm 0,338$                |
| verzweigte Alkane       | $0,46 \pm 0,053$                |
| undefiniert             | $6,2 \pm 2,59$                  |

Die Waben werden nach einer besonderen Bauweise angefertigt. An eine Mittelwand werden beidseitig sechseckige Zellen angebaut. Die Mittelwand bildet den gemeinsamen Boden für die nach beiden Seiten gerichteten Zellen. Diese Konstruktion verleiht den Waben eine besondere Stabilität und ist ausgesprochen ökonomisch, da der größtmögliche Speicherplatz auf kleinstmöglichem Raum geschaffen wird. Die Zellwände sind teilweise nur  $100 \mu\text{m}$  dick. Die auf der Oberseite liegenden Stege der Zellen sind verdickt [27].

Sowohl die Zusammensetzung von Propolis und Wachs als auch die räumliche Verteilung dieser Komponenten wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Raman-Spektroskopie und Raman-Mapping untersucht.

# 9 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden die Geräteparameter des Raman-Spektrometers beschrieben, das bei den Messungen verwendet wurde. Auch die Parameter des ansteuerbaren xy-Tisches, der für das Raman-*Mapping* eingesetzt wurde, werden erläutert. Auf die Probenpräparation wird ebenfalls eingegangen.

## 9.1 Raman-spektroskopische Untersuchungen von Wachs, Propolis und Harzen

**Raman-Spektrometer** Die Raman-Spektren wurden mit einem Mikro-Raman-Setup (Labram, Fa. Jobin Yvon) aufgenommen (detaillierte Beschreibung vgl. Teil I Kapitel 5.4). Als Anregungswellenlänge wurde die 633 nm Linie eines Helium:Neon-Lasers mit einer Laserleistung von 20 mW in Kombination mit dem Olympus MLPlanFL 50x Objektiv verwendet.

**Standardsubstanzen Propolis und Wachs** Für die Herstellung des Modell-Propolis wurde aus den einzelnen Stoffgruppen je eine typische Substanz als Standardsubstanz untersucht. Die Komponenten sind in Tabelle 9.1 aufgelistet. Auch für Wachs wurden Standardsubstanzen analysiert, die Tabelle 9.2 entnommen werden können.

Die Proben von Propolis und Wachs wurden aus Bienenstöcken von *Apis mellifera*

*carnica* POLLM. der Bienenstation der Universität Würzburg entnommen. Die Proben stammen aus unbebrüteten Waben, in denen weder Honig noch Pollen gelagert wurde.

**Tabelle 9.1:** Aufstellung der verwendeten Standardsubstanzen. Für jede im Propolis vorkommende Substanzklasse wurde eine Beispielsubstanz ausgewählt.

| Substanz           | Substanzklasse | Bezugsquelle        |
|--------------------|----------------|---------------------|
| Galangin           | Flavonoide     | Fluka, Deutschland  |
| Phenylethylkaffeat | Ester          | Bachem, Deutschland |
| Kumarsäure         | aromatische    | Fluka, Deutschland  |
| Kaffeesäure        | Säuren         | Fluka, Deutschland  |
| Benzoessäure       |                | Fluka, Deutschland  |

**Tabelle 9.2:** Aufstellung der verwendeten Standardsubstanzen. Für jede im Bienenwachs vorkommende Substanzklasse wurde eine Beispielsubstanz ausgewählt.

| Substanz                                       | Substanzklasse | Bezugsquelle       |
|--|----------------|--------------------|
| Stearinsäure–Stearylester (C <sub>36</sub> es) | Wachs Ester    | Fluka, Deutschland |
| Pentacosan (C <sub>25</sub> an)                | Wachs Alkane   | Fluka, Deutschland |
| 1–Eicosen (C <sub>20</sub> en)                 | Wachs Alkene   | Sigma, Deutschland |
| Triacantanol (C <sub>30</sub> ol)              | Wachs Alkohole | Fluka, Deutschland |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> ac)           | Wachs Säuren   | Fluka, Deutschland |

**Berechnete Spektren von Wachs und Propolis** Für die Berechnung der Summenspektren von Wachs und Propolis aus den Spektren der Standardsubstanzen wurde jeweils eine Basislinienkorrektur (Polynom 9. Ordnung) vorgenommen. Die Spektren wurden normiert, indem sie durch die Integrationszeit (in Sekunden) dividiert und entsprechend ihrer prozentualen Zusammensetzung (in %) (vgl. Kap. 8.2 Tab. 8.1) multipliziert wurden. Anschließend erfolgte die Addition der normierten Spektren [118].



**Modell-Propolis und Modell-Wachs** Das Modell-Propolis wurde nach der im Kapitel 8.2 beschriebenen prozentualen Zusammensetzung des Propolis hergestellt. Für die verschiedenen Substanzklassen wurden charakteristische Substanzen ausgewählt. Als Lösungsmittel wurde Methanol verwendet. Die Raman-Spektren wurden nach dem Abdampfen des Lösungsmittels aufgenommen.

Das Modell-Wachs wurde nach der in Kapitel 8.3 beschriebenen prozentualen Zusammensetzung aus den Standardsubstanzen hergestellt. Für jede Substanzklasse wurde auch hier eine charakteristische Substanz ausgewählt. Die Substanzen wurden in Chloroform gelöst und gut gemischt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Raman-Spektren des Modell-Waxes aufgenommen.

Alle Spektren waren an verschiedenen Stellen der Probe reproduzierbar.

**Harze** Es wurden auch einige Pflanzenharze Raman-spektroskopisch charakterisiert, um herauszufinden, von welchen Quellen die Bienen ihre Harze beziehen. Von der Schwarzpappel *Populus nigra* L., der Rosskastanie *Aesculus hippocastanum* L., der Birke *Betula pendula* L., der Zwetschge *Prunus domestica* L. und der Kiefer *Pinus nigra* L. [166] wurde jeweils das Harz untersucht. Dazu wurden die Harze – soweit möglich – abgekratzt. Die Proben wurden auf einen Objektträger gelegt und Raman-spektroskopisch vermessen.

**Alkane verschiedener Kettenlängen** Die verwendeten Alkane sowie deren Bezugsquellen können Tab. 9.3 entnommen werden. n-Pentan und n-Decan (beide flüssig) wurden jeweils in eine 2 mm-Küvette gefüllt und unter dem Mikroskop vermessen. Die übrigen Alkane (fest) wurden auf einem Objektträger unter dem Mikroskop vermessen. Alle Spektren wurden reproduzierbar an unterschiedlichen Stellen der Probe aufgenommen.

**Tabelle 9.3:** Aufstellung der für die Raman-Spektren verwendeten n-Alkane unterschiedlicher Kettenlängen.

| Substanz      | Summenformel                     | Bezugsquelle       |
|---------------|----------------------------------|--------------------|
| n-Pentan      | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>   | Fluka, Deutschland |
| n-Decan       | C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>  | Fluka, Deutschland |
| n-Eicosen     | C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>  | Fluka, Deutschland |
| n-Triacontan  | C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>  | Fluka, Deutschland |
| n-Tetracontan | C <sub>40</sub> H <sub>82</sub>  | Fluka, Deutschland |
| n-Pentacontan | C <sub>50</sub> H <sub>102</sub> | Fluka, Deutschland |

## 9.2 Raman-Mapping an Wabenproben von *Apis mellifera carnica* POLLM.

**Raman-Mapping** Die Raman-Mapping Plots wurden ebenfalls mit dem Mikro-Raman-Spektrometer (Labram, Fa. Jobin Yvon) aufgenommen, das zusätzlich mit einem elektronisch ansteuerbaren xy-Tisch ausgestattet werden kann. Per Software wird ein Bereich der Probe ausgewählt, der *abgescannt* werden soll. Eine definierte Anzahl von Punkten wird Schritt für Schritt angefahren. Die minimale Schrittweite beträgt 0,1  $\mu\text{m}$ . Der Durchmesser des Laserfokus beträgt bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm und unter Verwendung des Mikroskopobjektivs Olympus ML PlanFL 50x etwa 1  $\mu\text{m}$ . Bei der Verwendung einer Schrittweite von 0,5  $\mu\text{m}$  ist eine gute Überlappung zwischen den Messpunkten gegeben.

**Auswertung** Für die Auswertung der Raman-Mapping Plots wurden im Spektrum von Wachs und Propolis zwei für das jeweilige Spektrum charakteristische Banden ausgewählt. Wichtig für die Auswahl dieser Markierungsbanden ist, dass diese nicht mit Banden des jeweils anderen Spektrums überlappen sollten. Für Wachs wurde der Bereich von 1080  $\text{cm}^{-1}$  bis 1048  $\text{cm}^{-1}$  als Markierungsbande gewählt, für Propolis der Bereich von 1655  $\text{cm}^{-1}$  bis 1570  $\text{cm}^{-1}$ . Die Verteilung der Intensität der gewählten Markierungsbanden wird als

Falschfarben-Grafik dargestellt. Eine Farbskala zeigt dabei die Intensität der gewählten Bande an. Eine Basislinienkorrektur wurde in die Auswertung mit einbezogen [118].



# 10 Ergebnisse und Diskussion

## 10.1 Raman–spektroskopische Untersuchungen an Propolis und Wachs

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der Raman–spektroskopischen Untersuchungen an Propolis und Wachs zusammengefasst. Diese Untersuchungen wurden gemacht, um festzustellen, ob die Zusammensetzung dieser beiden Stoffgemische der jeweils in der Literatur beschriebenen entspricht und ob Abweichungen vorhanden sind, die auf das Auftreten weiterer Komponenten schließen lassen.

Auch einige Harze wurden untersucht, um herauszufinden, von welchen Pflanzen diese von den Bienen als Propolis gesammelt werden.

Bei den Wachs–Spektren wurde auch darauf eingegangen, welche Rolle die Kettenlänge der Alkane, aus denen Wachs hauptsächlich besteht, bei diesen spielt. Die Kettenlänge hat einen Einfluss auf die Viskosität des Wachses.

Eine genaue Charakterisierung der Raman–Spektren von Propolis und Wachs ist außerdem eine wichtige Voraussetzung, um die in den in Kap. 10.2 beschriebenen Raman–*Mapping*–Plots vorkommenden Spektren zu analysieren.

### 10.1.1 Mikro-Raman-spektroskopische Untersuchungen von Propolis

Es gibt zahlreiche Untersuchungsmethoden, um die Zusammensetzung von Propolis zu analysieren. Häufig wird eine Kombination aus Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) eingesetzt [141]. Ein Nachteil dieser Methode liegt darin, dass die Proben zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst werden müssen und leicht flüchtige Substanzen bei dieser Aufbereitung verloren gehen. Auch über die räumliche Verteilung bestimmter Komponenten kann mit dieser Methode keine Aussage getroffen werden. Die Einzelkomponenten, aus denen das untersuchte Stoffgemisch besteht, werden anschließend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und analysiert. Die Trennsäulen des GC sind dabei nur für Substanzen geeignet, deren Molekulargewicht in einem bestimmten Bereich liegt. Die schwer flüchtigen Substanzen werden bei dieser Analyseverfahren nicht erfasst. Die Raman-Spektroskopie umgeht diese Probleme. Eine Aufarbeitung der Proben ist vor der Analyse nicht nötig. Es werden alle auftretenden Einzelkomponenten erfasst. So können alle Veränderungen in der Zusammensetzung des Propolis erfasst werden.

Im Folgenden sind die Raman-spektroskopischen Untersuchungen von Propolis dargestellt [118].

Es wurden Raman-Spektren von einem bis mehreren Vertretern der wichtigsten Substanzklassen des Propolis aufgenommen, um das Raman-Spektrum des Propolis besser interpretieren zu können. Um herauszufinden, inwiefern diese Komponenten das Gesamtspektrum von natürlichem Propolis erklären können, wurde das Propolis-Spektrum durch zwei Methoden simuliert.

Zum einen wurde ein Propolis-Spektrum berechnet, indem die Spektren der Einzelkomponenten auf deren prozentualen Anteil am Gesamtpropolis normiert wurden. Im Anschluss an eine Basislinienkorrektur (Polynom 9. Ordnung) wurden die normierten Spektren addiert.

Zum anderen wurde Modell-Propolis hergestellt, indem diese charakteristischen Ver-

treter der Hauptkomponenten des Propolis nach ihrem prozentualen Anteil am Gesamtpropolis eingewogen und in Methanol gelöst wurden. Nach einer guten Durchmischung der Lösung wurde das Lösungsmittel abgedampft, bevor die Raman-Spektren aufgenommen wurden. Genauere Angaben können den Kapiteln 8.2 und 9.1 entnommen werden.

Abbildung 10.1 zeigt die Ergebnisse der Raman-spektroskopischen Untersuchung von Propolis. An oberster Stelle ist ein Spektrum von natürlichem Propolis aus einem Bienenstock von *Apis mellifera carnica* POLLM. zu sehen. Darunter sind die Spektren des Modell-Propolis sowie des berechneten Propolis dargestellt. Als Vertreter für die Standardsubstanzen des Propolis sind Spektren von Galangin stellvertretend für die Flavonoide, 2-Phenethylkaffeat für die Ester sowie trans-Kumarsäure, Kaffeesäure und Benzoesäure für die aromatischen Säuren gezeigt. Die prozentualen Anteile dieser Komponenten am Gesamtpropolis können Tab. 8.1 entnommen werden.

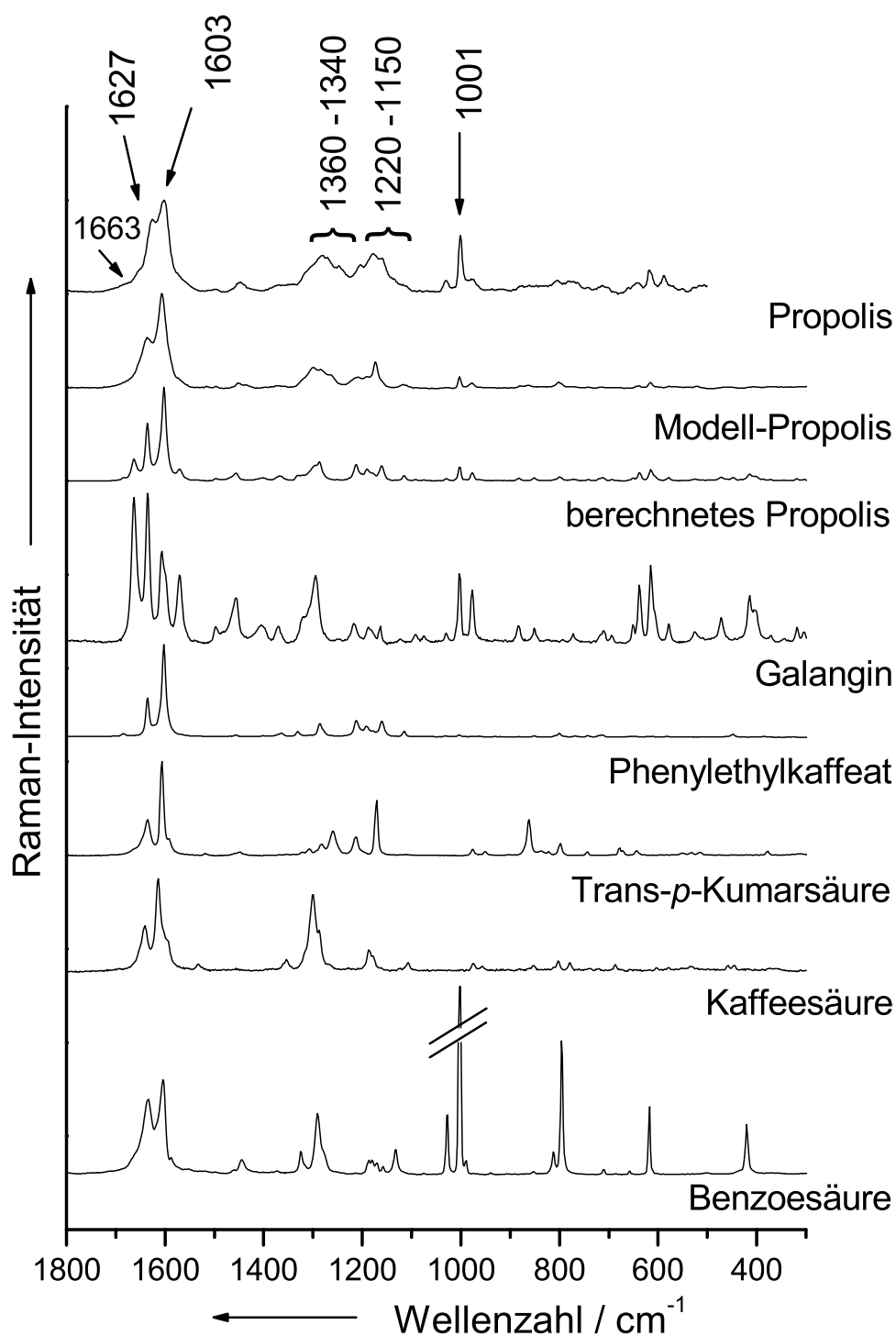
Bei einem Vergleich der Spektren des Modell-Propolis mit dem berechneten Propolis kann man erkennen, dass die Banden im Spektrum des Modell-Propolis stärker überlappen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Proben, der diesen Effekt erklären kann, ist, dass beim Modell-Propolis Wechselwirkungen zwischen den Molekülen vorhanden sind, beim berechneten Propolis keine reelle Mischung vorliegt und somit auch keine Wechselwirkungen auftreten. Es wird vermutet, dass Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Molekülen in der Mischung vorliegen.

**Tabelle 10.1:** Lage und Zuordnung der Raman-Banden von Propolis, nach [125, 167].

| Wellenzahl (cm <sup>-1</sup> ) | Zuordnung                                       |
|--------------------------------|---|
| 1627                           | $\nu$ (C=C) (vinylich)                          |
| 1603                           | $\nu$ (C=C) (aromatisch)                        |
| 1001                           | $\nu$ (CC) (aromatische Ringatmungs-Schwingung) |

$\nu$ , Streckschwingung.

Beim Vergleich zwischen dem Spektrum des Modell-Propolis und dem Spektrum des reinen Propolis fallen ebenfalls einige Unterschiede auf. Die Zuordnung der Banden ist



**Abbildung 10.1:** Raman-Spektren von Propolis, Modell-Propolis und berechnetem Propolis sowie von je einem Vertreter der wichtigsten Substanzklassen der Standardsubstanzen von Propolis.



in Tabelle 10.1 zusammengefasst. Die Banden bei  $1627\text{ cm}^{-1}$  und  $1603\text{ cm}^{-1}$  können der vinylischen und der aromatischen C=C-Streckschwingung zugeordnet werden. Der Anteil der vinylischen C=C-Streckschwingung im Vergleich zum Anteil der aromatischen C=C-Streckschwingung ist im Propolis höher als im Modell-Propolis. Die scharfe Bande bei  $1001\text{ cm}^{-1}$  kann der aromatischen Ringatmungs-Schwingung zugeordnet werden. Diese Bande taucht nur bei den Molekülen auf, die einen Phenylrest aufweisen. Dies ist bei den untersuchten Standardsubstanzen bei Galangin, Phenylethylkaffeeat und Benzoesäure der Fall. Bei der trans-Cumarsäure sowie der Kaffeesäure sind an den Phenylresten Wasserstoff-Atome durch Hydroxylgruppen substituiert (vgl. Abb. 8.2 in Kap. 8.2), was zu einer Verschiebung dieser Bande zu niedrigeren Wellenzahlen führt. In den Bereichen von  $1360\text{ cm}^{-1}$  bis  $1340\text{ cm}^{-1}$  und von  $1150\text{ cm}^{-1}$  bis  $1220\text{ cm}^{-1}$  gibt es ebenfalls Unterschiede zwischen dem Spektrum des Modell-Propolis und dem des natürlichen Propolis. Die Banden überlappen in diesen Bereichen stark und eine Identifizierung einzelner Banden ist schwierig. Im Spektrum des Propolis sind Banden bei  $1281\text{ cm}^{-1}$ ,  $1270\text{ cm}^{-1}$ ,  $1247\text{ cm}^{-1}$ ,  $1204\text{ cm}^{-1}$ ,  $1178\text{ cm}^{-1}$  und  $1159\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen, beim Modell-Propolis lassen sich Banden bei  $1300\text{ cm}^{-1}$ ,  $1285\text{ cm}^{-1}$ ,  $1264\text{ cm}^{-1}$ ,  $1211\text{ cm}^{-1}$ ,  $1191\text{ cm}^{-1}$  und  $1174\text{ cm}^{-1}$  identifizieren. In beiden Proben sind einige Banden in diesen Bereichen erkennbar, die jedoch verschoben auftreten. Es wird vermutet, dass in der realen Mischung weitere Komponenten vorhanden sind, die zu Wechselwirkungen führen, welche zu einer Verschiebung der Raman-Banden führen.

Zieht man zu diesem Vergleich noch das Spektrum des berechneten Propolis hinzu, fallen ebenfalls einige Unterschiede auf. Die Bande bei  $1663\text{ cm}^{-1}$  im berechneten Propolispektrum erscheint nur als Schulter im Spektrum des natürlichen Propolis und kann im Modell-Propolis kaum erkannt werden. Die relativen Intensitäten der Bande bei  $1001\text{ cm}^{-1}$  sind im berechneten Propolispektrum sowie im Spektrum des Modell-Propolis schwächer als im Spektrum des natürlichen Propolis. Wenn man jedoch bedenkt, dass nur eine kleine Auswahl an Standardsubstanzen für das berechnete Propolispektrum sowie für das Spektrum des Modell-Propolis verwendet wurden, ist die Übereinstimmung dieser Spektren mit dem Spektrum des natürlichen Propolis sehr gut.

Durch den Vergleich der Spektren können einige Schlüsse zur Zusammensetzung des Propolis gemacht werden. Die spektroskopischen Daten bestätigen, dass der Anteil an Flavonoiden am Propolis relativ hoch ist. Die Intensität der aromatischen Ringatmungsschwingung ist beim Propolis-Spektrum höher als im Spektrum des Modell-Propolis und des berechneten Propolis. Das Grundgerüst der Flavonoide weist einen Phenylrest auf. Auch viele der enthaltenen Ester besitzen Phenylreste. Von den ausgewählten Standardsubstanzen haben einige der eingesetzten Standardsubstanzen keine Phenylreste. Dies sind die Trans-p-Kumarsäure und die Kaffeesäure, die mit 6,7% und 2,6% einen relativ großen Anteil am Modell-Propolis sowie am berechneten Propolis haben. Eine quantitative Aussage über die Anteile bestimmter Substanzen am Propolis ist durch einen einfachen Vergleich der Raman-Spektren nicht möglich. Mit Hilfe von statistischen Auswertverfahren wäre dies möglich, diese sind jedoch sehr aufwendig und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

### 10.1.2 Mikro-Raman-spektroskopische Untersuchungen an Pflanzenharzen

In diesem Kapitel soll der Frage nachgegangen werden, inwiefern neben dem Harz der Schwarzpappel (*Pupulus nigra*) auch andere Pflanzenharze einen Anteil an dem hier untersuchten Propolis stellen könnten. Wie bereits in Kapitel 8.2 erwähnt, wird Propolis von den Bienen an unterschiedlichen Pflanzen gesammelt. In unseren Breiten ist vor allem die Schwarzpappel *Pupulus nigra* von Bedeutung, es wurde aber auch von Birke, Esche, Erle, Buche, verschiedenen Koniferen-Arten, Rosskastanie, Prunus-Arten sowie Akazien berichtet, die für den Eintrag von Propolis in den Stock eine Rolle spielen [31, 32, 136, 141, 152, 154–156].

Es wurde eine Auswahl an Pflanzenharzen untersucht, die für den Propoliseintrag in der Gegend um Würzburg eine Rolle spielen könnten. Hierfür wurden Spektren von Harzen der

Schwarzpappel *Pupulus nigra* L., der Rosskastanie *Aesculus hippocastanum* L., der Birke *Betula pendula* L., der Zwetschge *Prunus domestica* L. und der Kiefer *Pinus nigra* L. [166] aufgenommen. Diese sind in Abb. 10.2 dem Spektrum des Propolis gegenübergestellt, um einen direkten Vergleich zwischen den Spektren vornehmen zu können.

Die geringste Ähnlichkeit zu Propolis weist das Kiefernharz auf. Das Harz der Koniferen ist überwiegend aus Harzsäuren auf der Basis von Diterpenen mit der Bruttoformel  $C_{20}H_{30}O_2$  aufgebaut. Beispiele für diese Substanzen sind Abietin-, Neoabietin-, Lävopimar- und Paulustrinsäure. Die Strukturformeln dieser Verbindungen sind in Abbildung 8.3 dargestellt [157, 168, 169]. Im Vergleich mit den Standardsubstanzen des Propolis fällt auf, dass es sich bei diesen Verbindungen nicht um konjugierte aromatische Systeme handelt. Das erklärt die deutlichen Unterschiede zwischen dem Spektrum des Kiefernharzes und dem Spektrum des Propolis. Auch die spektralen Unterschiede zwischen dem Spektrum des Kiefernharzes und dem Spektrum der Pappel sowie der den Spektren von Kastanie, Birke und Pflaume sind erkennbar.

Tabelle 10.2 zeigt eine Zuordnung der Raman-Banden des Kiefernharzes. Bei  $1645\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1612\text{ cm}^{-1}$  erscheinen die Banden der C=C-Streckschwingungen im Raman-Spektrum. Bei  $1570\text{ cm}^{-1}$  kann eine aromatische CCH-Streckschwingung beobachtet werden. Die Bande bei  $1470\text{ cm}^{-1}$  kann einer Kombination aus  $CH_2$ - und COH-Streckschwingung zugeordnet werden. Bei  $1444\text{ cm}^{-1}$ ,  $1380\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1303\text{ cm}^{-1}$  erscheinen ebenfalls  $CH_2$ -Deformationsschwingungen. Bei  $1222\text{ cm}^{-1}$  ist eine COH-Deformationsschwingung zu erkennen. Die Bande bei  $1202\text{ cm}^{-1}$  ist eine Kombination aus einer COH- und einer CCH-Deformationsschwingung. Bei  $1139\text{ cm}^{-1}$  ist eine Bande zu erkennen, die sich aus einer Kombination einer COC- mit einer CC-Streckschwingung ergibt. Eine  $CH_3$ -Pendelschwingung kann der Bande bei  $972\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet werden, eine  $CH_2$ -Pendelschwingung der Bande bei  $880\text{ cm}^{-1}$ . Die Banden bei  $739\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $706\text{ cm}^{-1}$  können einer C-C-Streckschwingung zugeordnet werden [132]. Ein Vergleich dieser Banden mit den Banden des Propolis-Spektrums ergibt bis auf die Bande bei  $1447\text{ cm}^{-1}$  ( $CH_2$ -Deformationsschwingung) kaum Übereinstimmungen. Es wird daher davon ausgegangen, dass in dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Propolis die Kiefernharze maximal einen sehr geringen

Anteil bilden.

Die Banden bei  $1626\text{ cm}^{-1}$  und  $1602\text{ cm}^{-1}$  sind im Spektrum von Pappelharz wiederzufinden. Bei Kastanie und Kiefer ist dagegen ein Peak bei etwa  $1612\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten, der ebenfalls der vinylischen C=C-Streckschwingung zugeordnet werden kann, jedoch um einigen Wellenzahlen verschoben auftritt. Dies könnte an der unterschiedlichen Zusammensetzung dieser Harze liegen. Der für aromatische Verbindungen charakteristische scharfe Peak um  $1000\text{ cm}^{-1}$  tritt sowohl im Spektrum von Propolis als auch im Spektrum des Pappelharzes sehr deutlich hervor. Bei der Kastanie ist dieser Peak kaum erkennbar. Vor allem das Harz der Pappel scheint einen deutlichen Anteil aromatischer Verbindungen zu enthalten, die auch im Propolis zu finden sind. Auch die Bande bei  $1602\text{ cm}^{-1}$ , die den aromatischen C=C-Doppelbindungen zugeordnet werden kann, deutet auf einen hohen Anteil aromatischer Verbindungen im Propolis und im Pappelharz hin. Diese Bande kann auch bei der Birke ( $1606\text{ cm}^{-1}$ ) und der Pflaume ( $1604\text{ cm}^{-1}$ ) erkannt werden.

Diese Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass das hier untersuchte Propolis überwiegend aus Pappelharz besteht. Auch Anteile von Birken- und Pflaumenharz können enthalten sein. Dagegen scheint kaum Kiefernharz von den Bienen gesammelt zu werden. Da nicht alle in Frage kommenden Pflanzenharze untersucht werden konnten, könnten noch andere Pflanzenharze im Propolis vorhanden sein. Diese Zusammensetzung entspricht überwiegend der in der Literatur beschriebenen [31, 32, 136, 141, 152, 154–156].

Ein Vergleich zwischen Pappelharz und Propolis ist wichtig, um eventuell von den Bienen vorgenommene Veränderungen des Harzes zu detektieren. An Unterschieden zwischen den beiden Komponenten ist festzustellen, dass das Intensitätsverhältnis der Banden bei  $1626\text{ cm}^{-1}$  und  $1602\text{ cm}^{-1}$  beim Pappelharz annähernd gleich groß ist, beim Propolis die Bande bei  $1602\text{ cm}^{-1}$  eine höhere Intensität hat als die Bande bei  $1626\text{ cm}^{-1}$ . Der Anteil der vinylischen C=C Streckschwingung nimmt also im Vergleich zur aromatischen C=C Streckschwingung ab. Beim Pappelharz fallen außerdem Banden bei  $1563\text{ cm}^{-1}$ ,  $1515\text{ cm}^{-1}$  und  $1319\text{ cm}^{-1}$  auf, die beim Propolis schwächer ausgebildet sind. Dies legt den Schluss nahe, dass beim Propolis einzelne Substanzen, die in frischem Harz noch vorhanden sind, fehlen. Man könnte sich vorstellen, dass das Harz leicht flüchtige Komponenten enthält,

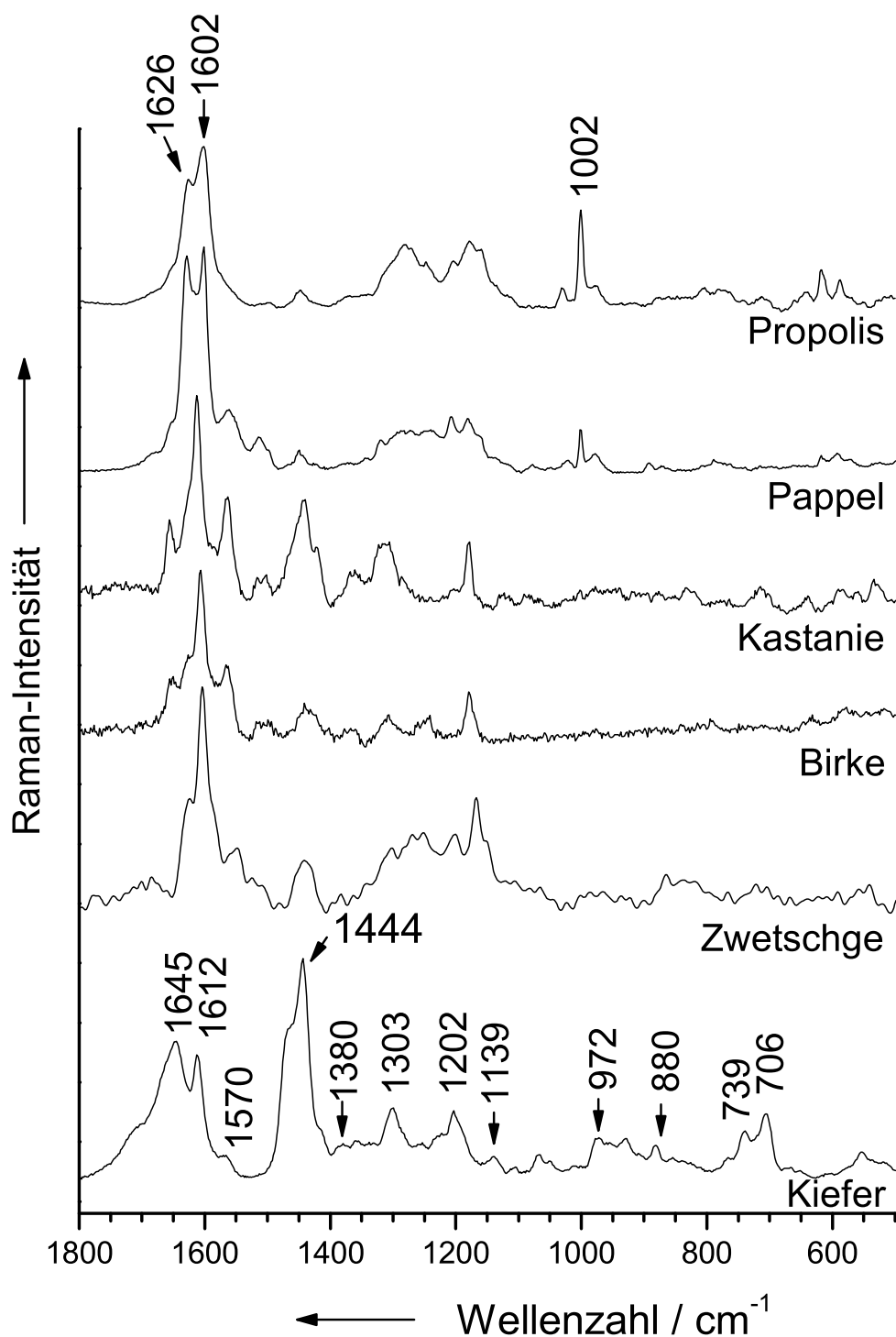


Abbildung 10.2: Raman-Spektren von Propolis sowie Spektren von Pflanzenharzen von unterschiedlichen Arten wie Pappel, Kastanie, Birke, Pflaume, und Kiefer.

**Tabelle 10.2:** Wellenzahlen der Raman-Banden von Kiefernharz und deren Zuordnung, nach [125, 132, 167].

| Wellenzahl (cm <sup>-1</sup> ) | Zuordnung                               |
|--------------------------------|---|
| 1645 (m, sh)                   | $\nu$ (C=C) (cis)                       |
| 1612 (s)                       | $\nu$ (C=C)                             |
| 1570 (mw)                      | $\nu$ (CCH)(aromatisch)                 |
| 1470 (m, sh)                   | $\nu$ (CH <sub>2</sub> )<br>$\nu$ (COH) |
| 1444 (s)                       | $\delta$ (CH <sub>2</sub> )             |
| 1380 (w)                       | $\delta$ (CH <sub>2</sub> )             |
| 1303 (mw)                      | $\delta$ (CH <sub>2</sub> )             |
| 1222 (w)                       | $\delta$ (COH) ( <i>out-of-plane</i> )  |
| 1202 (m)                       | $\delta$ (COH)<br>$\delta$ (CCH)        |
| 1139 (mw)                      | $\nu$ (COC)<br>$\nu$ (CC)               |
| 972 (mw)                       | $\rho$ (CH <sub>3</sub> )               |
| 880 (w)                        | $\rho$ (CH <sub>2</sub> )               |
| 739 (mw)                       | $\nu$ (C-C)                             |
| 706 (mw)                       | $\nu$ (C-C)                             |

$\nu$ , Streckschwingung;  $\delta$ , Deformationsschwingung;  $\rho$  Pendelschwingung; s, strong; m, medium; w, weak; v, very; sh, shoulder; *out-of-plane* außerhalb der Ebene.

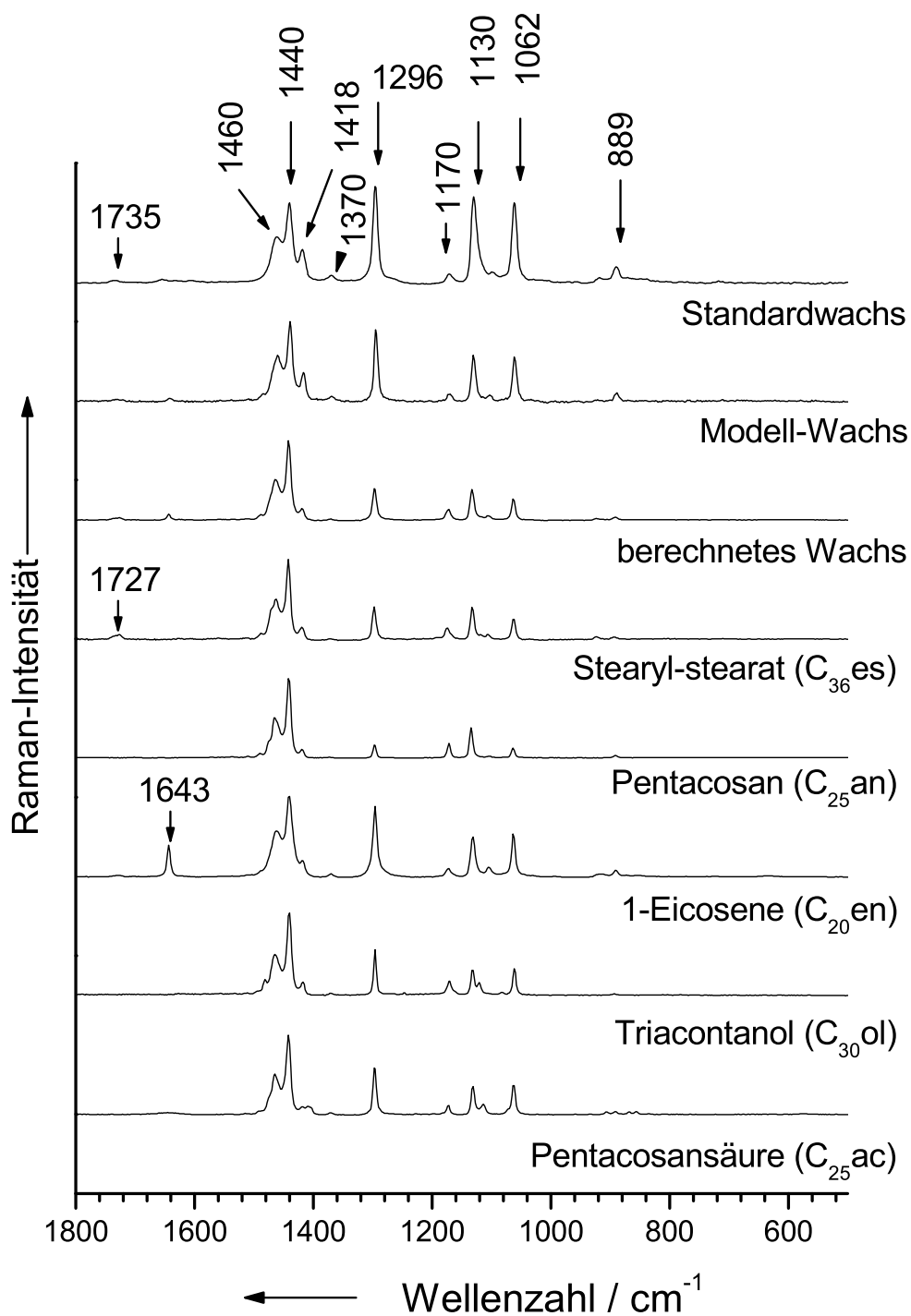
die bei dessen Weiterverarbeitung zum Propolis verlorengehen. Demgegenüber fällt auf, dass keine neuen Komponenten zum Propolis hinzuzukommen scheinen. Es wird in der Literatur davon berichtet, dass Propolis einen relativ großen Anteil Wachs enthält. Um dies näher zu untersuchen, wird im folgenden Kapitel die Zusammensetzung von Wachs Raman-spektroskopisch untersucht.

### 10.1.3 Mikro-Raman-spektroskopische Untersuchungen von Wachs

Wachs wird nicht von außen in den Stock eingetragen, sondern von den Bienen selbst synthetisiert. Es ist somit immer verfügbar und wird zum Bau der Waben eingesetzt. Es wird in der Literatur davon berichtet, dass auch Propolis einen relativ großen Anteil an Wachs enthält. Um herauszufinden, inwiefern Wachs und Propolis als Gemisch vorliegen, wurde auch das Wachs analog zum Propolis genau analysiert. Von charakteristischen Vertretern der Hauptkomponenten des Wachses wurden Raman-Spektren aufgenommen. Die Zusammensetzung von mittelaltem Wabenwachs ist in Kapitel 8.3 dargestellt.

Es sind auch hier Spektren eines Modell-Wachses, das aus den Standardsubstanzen gemischt wurde, sowie eines mathematisch errechneten Wachses (Addition der Spektren der Standardsubstanzen), gezeigt. Vor der Spektrenaddition wurde eine Basislinienkorrektur vorgenommen und die Spektren wurden entsprechend der jeweiligen Integrationszeit und der prozentualen Anteile normiert [118]. Nähere Informationen sind den Kapiteln 8.3 und 9.1 zu entnehmen.

In Abb. 10.3 sind die Raman-Spektren von Wachs, Modell-Wachs, berechnetem Wachs und den Standardsubstanzen des Wachses dargestellt. Als Standardsubstanzen wurden Stearyl-Stearat ( $C_{36}$ -Ester), Pentacosan ( $C_{25}$ )-Alkan, 1-Eicosen ( $C_{20}$ -Alken), Triacontanol ( $C_{30}$ -Alkohol) und Pentacosansäure ( $C_{25}$ -Carbonsäure) Raman-spektroskopisch untersucht.



**Abbildung 10.3:** Raman-Spektren von Standardwachs, Modell-Wachs und berechnetem Wachs sowie von je einem Vertreter der wichtigsten Substanzklassen der Standardsubstanzen von "mittelaltem" Wachs



Die Bandenzuordnung ist in Tab. 10.3 zusammengefasst. Die Bande bei  $1735\text{ cm}^{-1}$  kann der C=O Streckschwingung des Esters zugeordnet werden. Bei  $1643\text{ cm}^{-1}$  erscheint die C=C Streckschwingung der Doppelbindung. Die Bande bei  $1460\text{ cm}^{-1}$  wird der asymmetrischen  $\text{CH}_3$ -Pendelschwingung und bei  $1440\text{ cm}^{-1}$  der  $\text{CH}_2$ - Scherschwingung zugeordnet. Die Banden bei  $1418\text{ cm}^{-1}$  und  $1318\text{ cm}^{-1}$  entsprechen einer  $\text{CH}_2$ - Deformationschwingung. Bei  $1296\text{ cm}^{-1}$  erscheint die  $\text{CH}_2$ - Torsionsschwingung (in Phase) und bei  $11726\text{ cm}^{-1}$ ,  $11306\text{ cm}^{-1}$  sowie  $10626\text{ cm}^{-1}$  erscheinen C-C-Streckschwingungen im Spektrum. Bei  $889\text{ cm}^{-1}$  taucht die Bande der  $\text{CH}_2$ -Pendelschwingung im Spektrum auf.

Die drei Wachs-Spektren (Standard-Wachs, Modell-Wachs und berechnetes Wachs) sind einander sehr ähnlich, unterscheiden sich aber doch in einigen Punkten. Während die relativen Raman-Intensitäten der Banden bei  $1460\text{ cm}^{-1}$  und  $1440\text{ cm}^{-1}$  in allen drei Spektren gleich sind, ändert sich die Intensität der Bande bei  $1418\text{ cm}^{-1}$ . Ihre relative Intensität steigt vom berechneten Wachs über das Modell-Wachs zum Standard-Wachs immer weiter an. Auch die Banden bei  $1296\text{ cm}^{-1}$ ,  $1130\text{ cm}^{-1}$  und  $1062\text{ cm}^{-1}$  ändern sich im Vergleich zu der Bande bei  $1440\text{ cm}^{-1}$ . Die relativen Intensitäten dieser Banden sind bei den berechneten Spektren viel niedriger als bei den Modell-Wachs-Spektren und die Bande bei  $889\text{ cm}^{-1}$  verschwindet in dem berechneten Wachsspektrum beinahe vollständig. Das synthetisierte Modell-Wachs ist dem natürlichen Bienenwachs ähnlicher, als das berechnete Wachsspektrum. Dies ist auch hier auf ein Fehlen von Van-der-Waals-Wechselwirkungen im Spektrum des berechneten Wachses zurückzuführen, das durch eine Addition der Einzelspektren der Standardsubstanzen entstanden ist. Das Fehlen einer Komponente kann für den Unterschied zwischen berechnetem Wachsspektrum und Modell-Wachs-Spektrum nicht verantwortlich sein, da die Substanzen aus den gleichen Komponenten zusammengesetzt sind, wobei einmal eine reelle Mischung vorliegt und einmal die Mischung nur mathematisch, durch Spektrenaddition, vollzogen wurde.

Die Spektren der einzelnen Wachs-Standardsubstanzen sind einander sehr ähnlich. Als Standardsubstanzen wurden langkettige Alkane, die sich nur in ihrer funktionellen Gruppe unterscheiden, verwendet. Die Alkan-Banden dominieren die Spektren. Die Raman-Banden des Standard-Wachses können in nahezu allen Spektren der Standardsubstanzen

gefunden werden.

**Tabelle 10.3:** Zuordnung der Raman-Banden von Wachs, nach [125, 132, 167].

| Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Zuordnung                                       |
|---------------------------------|---|
| 1735 (w)                        | $\nu$ (C=O)(Ester)                              |
| 1643 (vw)                       | $\nu$ (C=C)                                     |
| 1460 (ms)                       | $\rho$ ( $\text{CH}_3$ ) (antisymmetrisch)      |
| 1440 (s)                        | $\delta$ ( $\text{CH}_2$ )                      |
| 1418 (ms)                       | $\delta$ ( $\text{CH}_2$ )                      |
| 1380 (w)                        | $\delta$ ( $\text{CH}_2$ )                      |
| 1296 (s)                        | $\delta$ ( $\text{CH}_2$ ) (Torsionsschwingung) |
| 1172 (mw)                       | $\nu$ (C-C)                                     |
| 1130 (ms)                       | $\nu$ (COC), $\nu$ (C-C)                        |
| 1062 (ms)                       | $\nu$ (C-C)                                     |
| 889 (mw)                        | $\rho$ ( $\text{CH}_2$ )                        |

$\nu$ , Streckschwingung;  $\delta$ , Deformationsschwingung;  $\rho$  Pendelschwingung;

s, strong; m, medium; w, weak; v, very.

Um herauszufinden, inwiefern die Kettenlänge der Alkane einen Einfluss auf die Raman-Spektren hat, und somit bei der Auswahl der Standardsubstanzen berücksichtigt werden sollte, wurden Alkane unterschiedlicher Kettenlängen vermessen. Es wurden jeweils unverzweigte, gesättigte Alkane als *Bulk*-Proben vermessen. Pentan und Decan liegen in flüssiger, Eicosan, Triacontan, Tetracontan sowie Pentacontan liegen in fester Phase vor.

Auffällig ist das Verhältnis der Banden bei  $1460 \text{ cm}^{-1}$  und  $1440 \text{ cm}^{-1}$ . Bei  $1460 \text{ cm}^{-1}$  erscheint eine asymmetrische  $\text{CH}_3$ -Pendelschwingung, bei  $1440 \text{ cm}^{-1}$  eine  $\text{CH}_2$ -Deformationsschwingung im Spektrum. Bei ansteigender Kettenlänge steigt die Anzahl der  $\text{CH}_2$ -Gruppen und der Anteil an  $\text{CH}_3$ -Gruppen des Moleküls wird geringer. So wird die relative Intensität der asymmetrischen  $\text{CH}_3$ -Pendelschwingung immer geringer im Vergleich zum Anteil der  $\text{CH}_2$ -Deformationsschwingung.

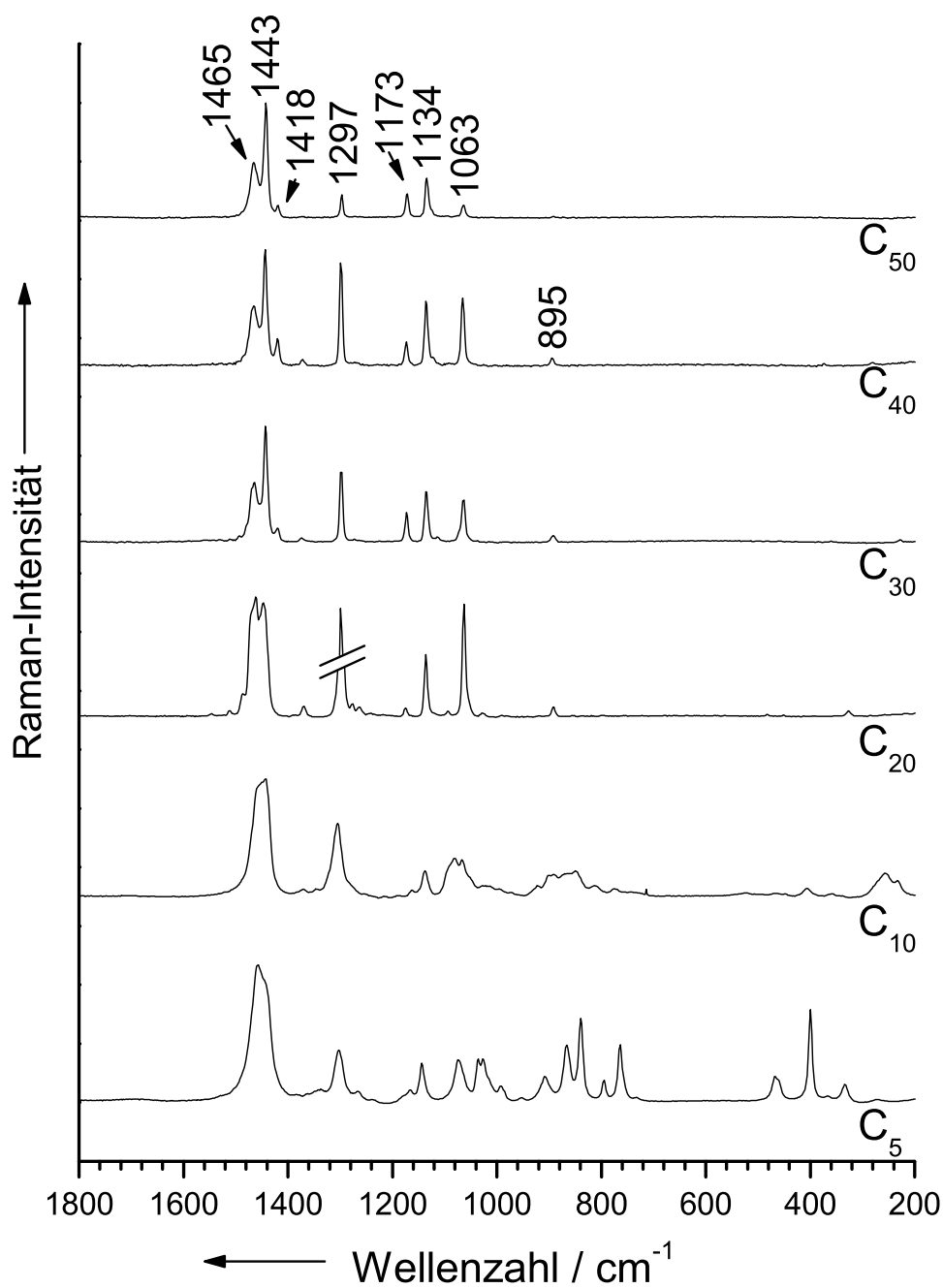


Abbildung 10.4: Raman-Spektren von unverzweigten gesättigten Alkanen unterschiedlicher Kettenlänge.

Im Allgemeinen fällt auf, dass sich ab einer Kettenlänge von etwa 20 bis 30 C-Atomen kaum etwas an den Spektren ändert. Da sich Bienenwachs aus Alkanen der Kettenlänge  $C_{21}$  bis  $C_{51}$  zusammensetzt, also in diesem Bereich liegt, kann davon ausgegangen werden, dass die Kettenlänge der für die Wachspektren ausgewählten Standardsubstanzen keinen Einfluss auf die Raman-Spektren hat.

Um zu überprüfen, ob in dem untersuchten Propolis Wachs enthalten ist, sind die Spektren von Propolis, Pappelharz und Standardwachs einander in Abb. 10.5 gegenübergestellt. Es ist davon auszugehen, dass reines Pappelharz kein Wachs enthält. Im Vergleich von Propolis und Pappelharz fallen keine Banden im Propolis auf, die im Harz nicht vorhanden sind. Die Banden von Standardwachs unterscheiden sich von den Banden im Propolis-Spektrum, jedoch sind in vielen Bereichen, in denen die Wachs-Banden auftreten, auch im Propolis Banden vorhanden. Die Wachs-Bande bei  $1062\text{ cm}^{-1}$  gehört von ihrer Intensität her zu den größten Banden im Wachs. Diese taucht im Propolis nicht auf. Dies beweist, dass Propolis nicht homogen mit Wachs vermischt vorliegt und dass an der untersuchten Stelle reines Propolis vorliegt.

Als Schlussfolgerung kann man festhalten, dass die Raman-Spektren von Propolis und Wachs gut charakterisiert werden können. Propolis liegt nicht homogen mit Wachs vermischt vor. Ein Grund, warum laut Literatur Propolis einen Anteil von bis zu 30% Wachs enthält, könnte sein, dass in den meisten Analysen nicht orts aufgelöst gemessen wird, wie dies bei der Mikro-Raman-Spektroskopie der Fall ist, sondern "größere" Probenmengen gelöst und analysiert werden. Bei der Mikro-Raman-Spektroskopie wird nur das gemessen, was im Laserfokus liegt. Dieser hat bei einer Wellenlänge von 633 nm und einem 50x Objektiv bei dem verwendeten Spektrometer (vgl. Kap. 9.1) einen Durchmesser von  $1,16\text{ }\mu\text{m}$  und eine Länge von  $6,68\text{ }\mu\text{m}$ . Die Fokusslänge kann durch Einschalten eines konfokalen Pinholes weiter eingeschränkt werden. Das Probenvolumen, welches pro Spektrum gemessen wird ist also sehr klein. Es wurden an mehreren Stellen des Propolis Raman-Spektren aufgenommen, es konnte jedoch kein Wachs gefunden werden.

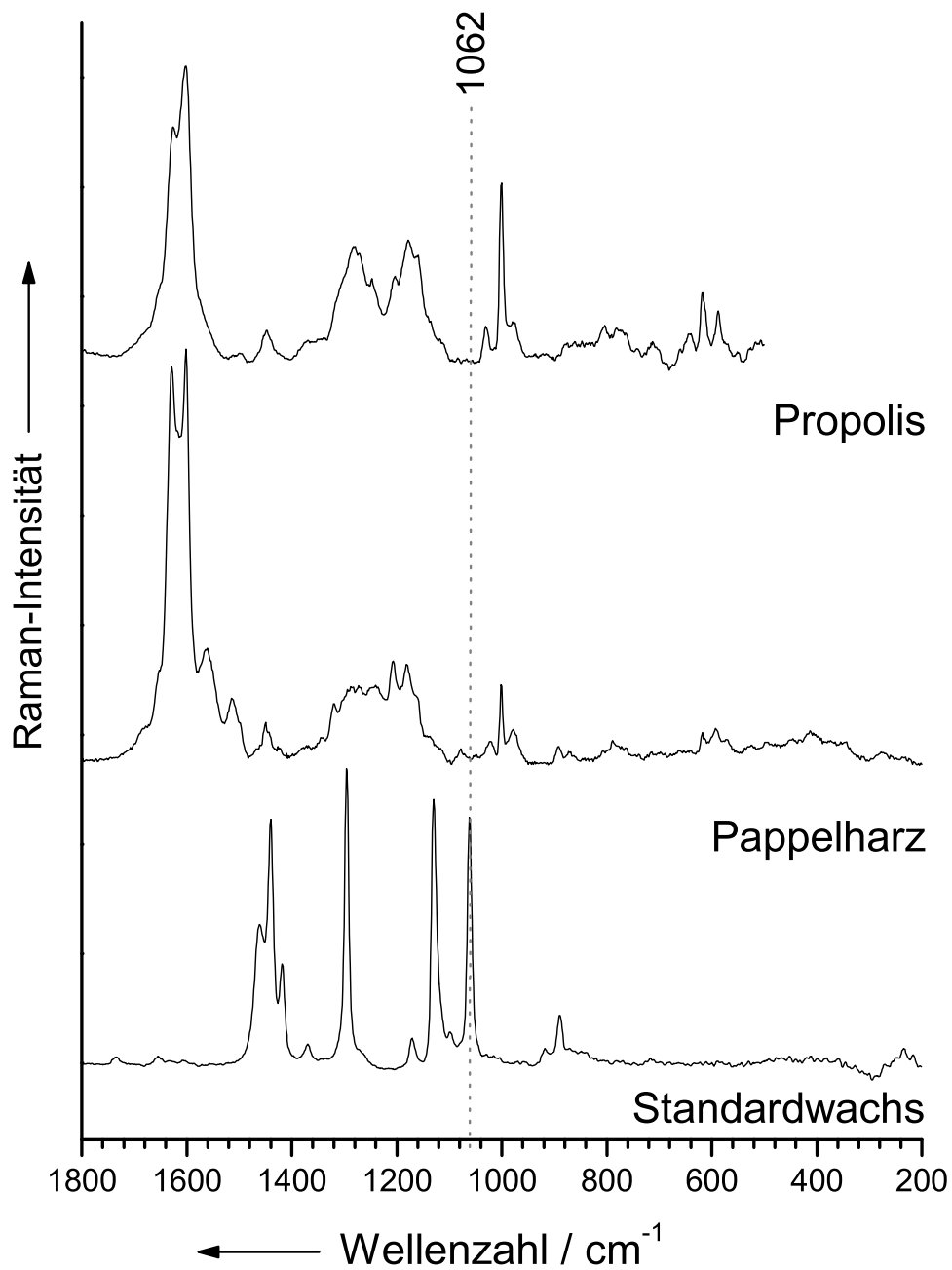


Abbildung 10.5: Raman-Spektren von Propolis, Pappelharz und Standardwachs.



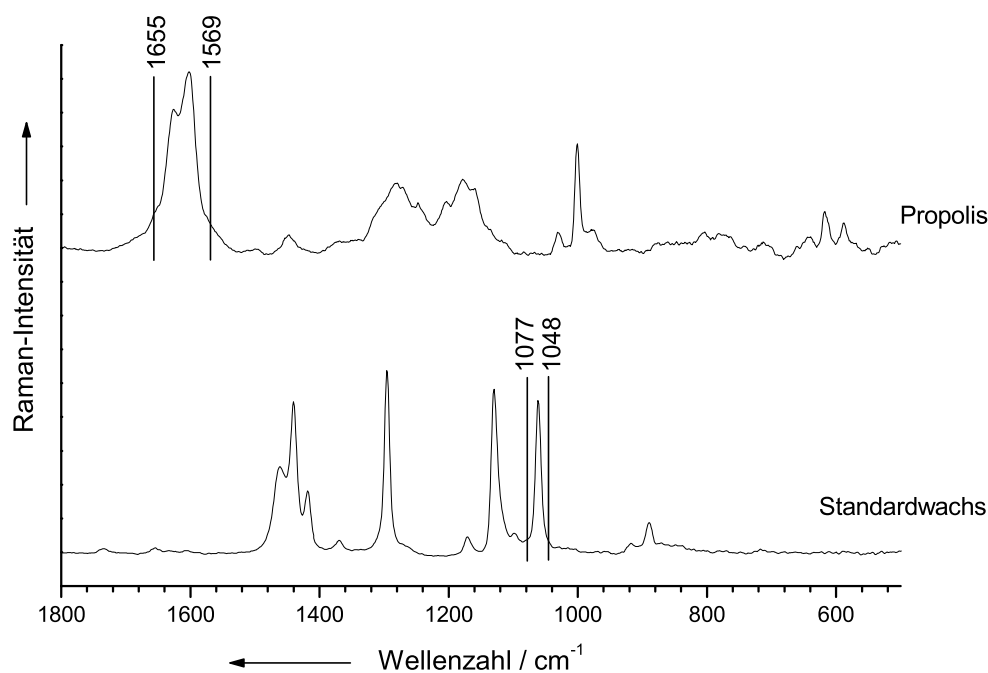
## 10.2 Raman-Mapping an Wabenproben von *Apis mellifera carnica* POLLM.

Die räumliche Verteilung von Propolis in den Waben von *Apis mellifera carnica* kann mit Raman-Mapping untersucht werden. Propolis wurde auf den Stegen der Waben gefunden. Dies bewirkt eine Verstärkung der Waben auf den Stegen. Ziel ist es dabei herauszufinden, wie das Propolis auf dem Wachs verteilt ist und ob es zu einer Durchmischung von Propolis und Wachs kommt. Die Banden in den Raman-Spektren von Bienenwachs und Propolis können sehr gut zugeordnet werden und eine Unterscheidung der Raman-Spektren dieser Substanzen ist möglich (vgl. Kap. 10.1).

Eine Voraussetzung für das Raman-Mapping ist, bestimmte Banden der Raman-Spektren der Komponenten, deren Verteilung gezeigt werden soll, als Markierungsbanden zu definieren. In Abb. 10.6 sind zwei charakteristische Raman-Spektren des Standard-Bienenwachses einer Wabe sowie des Propolis von *Apis mellifera carnica* POLLM. gezeigt. Die Spektren haben charakteristische Banden, die es ermöglichen, diese gegeneinander abzugrenzen. Die Markierungsbanden wurden so gewählt, dass in den jeweiligen spektralen Bereichen keine Banden der anderen Komponente fallen. Für Propolis wurde der Bereich von  $1655\text{ cm}^{-1}$  bis  $1569\text{ cm}^{-1}$  und für Wachs der Bereich von  $1077\text{ cm}^{-1}$  bis  $1048\text{ cm}^{-1}$  gewählt [118].

In Abb. 10.7 sind die Ergebnisse der Raman-Mapping-Aufnahmen dargestellt. Abbildung 10.7 a zeigt eine mikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts auf einem Wabensteg. Der Kasten zeigt den Bereich, der *abgescannt* wurde. Dieser Bereich hat eine Größe von  $20\text{ }\mu\text{m}$  x  $36\text{ }\mu\text{m}$ . In einem Abstand von  $0,5\text{ }\mu\text{m}$  wurden Punkt für Punkt Raman-Spektren aufgenommen.

In Abb. 10.7 b und c sind die Falschfarben-Plots des *abgescannten* Bereiches dargestellt. Abbildung 10.7 b zeigt den Falschfarben-Plot der Intensitätsverteilung der Markierungsbande des Wachses während Abbildung 10.7 c den Falschfarben-Plot der Intensitätsverteilung der Markierungsbande des Propolis zeigt. Eine hellere Farbe zeigt eine höhere



**Abbildung 10.6:** Markierungsbanden für die Erzeugung der Raman-*Mapping*-Plots

Intensität der jeweiligen Markierungsbande an. Die Intensitätsskala ist jeweils rechts neben den Bildern aufgeführt. Die Größen sind relativ bezogen auf die jeweils vorliegende Intensität der Bande.

In der mikroskopischen Aufnahme (Abb. 10.7 a) kann man unterschiedlich strukturierte Bereiche auf der Wabe erkennen. In der linken oberen Hälfte sind dunkle, raue Strukturen erkennbar wohingegen unten rechts eine helle, glatte Struktur vorliegt. Eine Zuordnung dieser Strukturen zu bestimmten chemischen Komponenten kann anhand der mikroskopischen Aufnahme nicht vorgenommen werden. Abhilfe können die Raman-*Mapping*-Aufnahmen schaffen. Jeder Aufnahme liegen 2880 Spektren zugrunde. Jedes Spektrum kann Aufschluss über die chemische Zusammensetzung an der jeweiligen Position geben, an der es gemessen wurde. So kann über den gesamten *gescannten* Bereich eine Aussage über die Anteile der jeweiligen Komponenten gemacht werden. Abbildung 10.7 b zeigt eine Raman-*Mapping*-



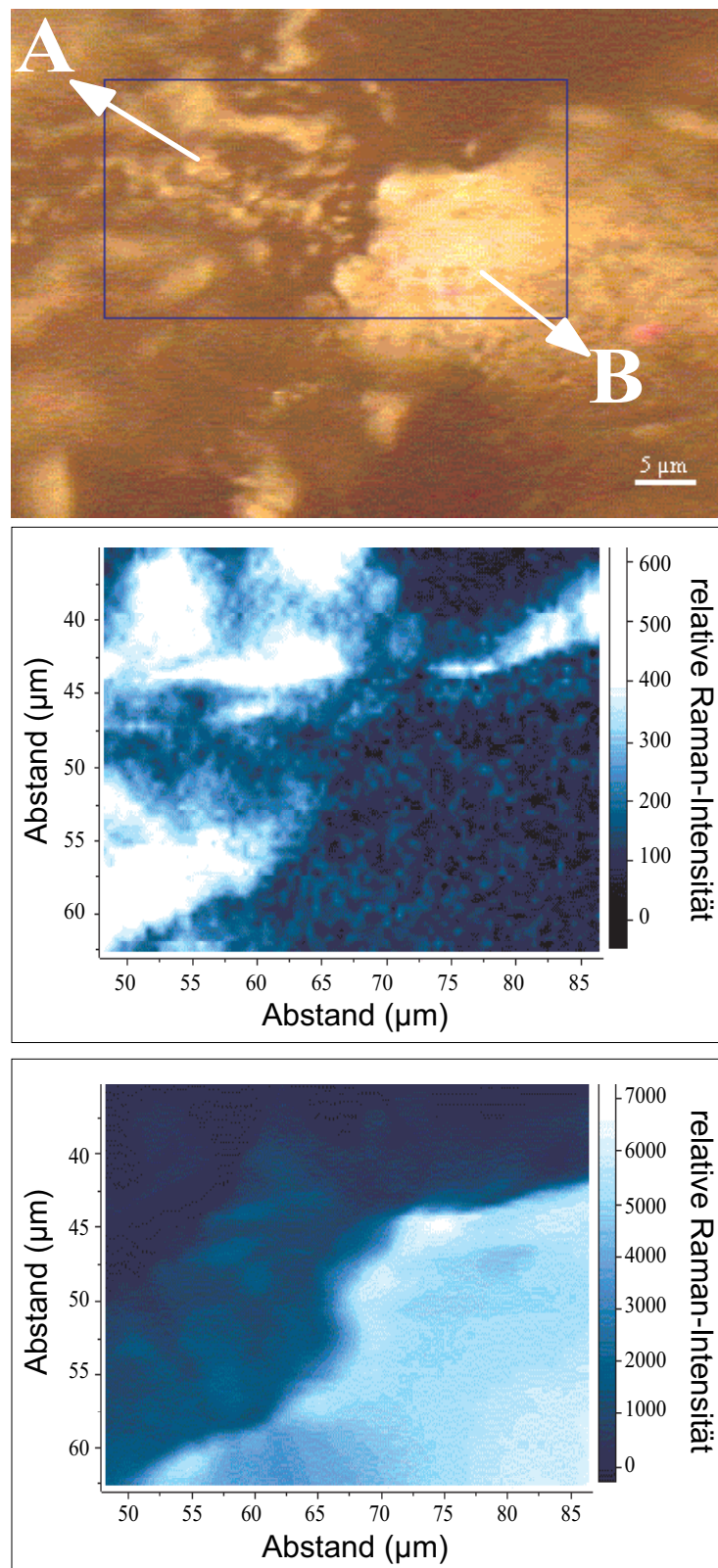
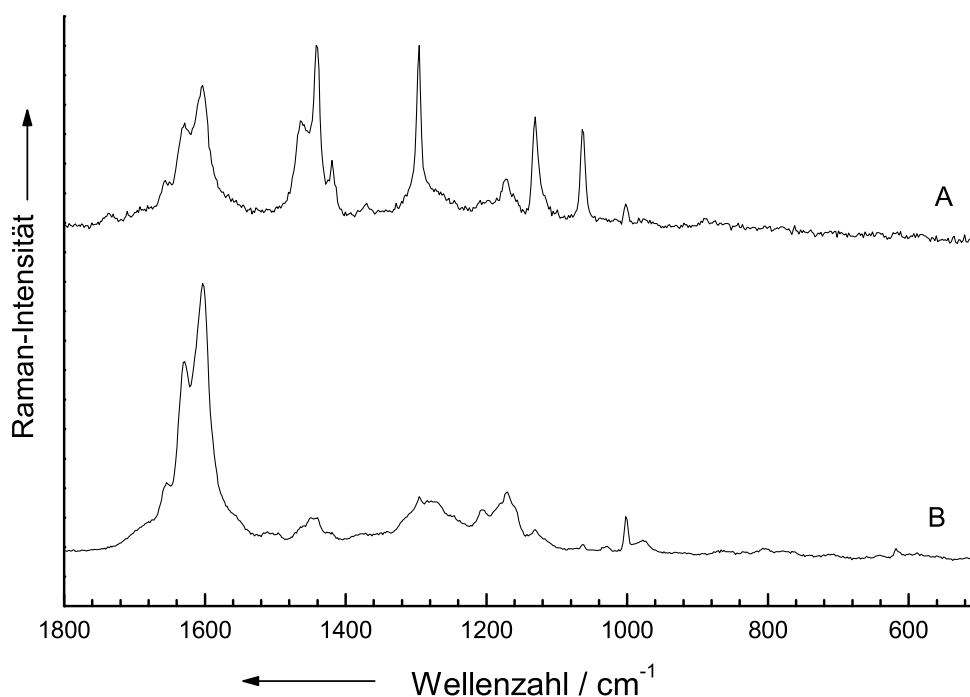


Abbildung 10.7: Raman-Mapping eines ausgewählten Bereichs auf einer Wabenprobe.

Aufnahme, bei der die Verteilung der relativen Raman-Intensität der Markierungsbande von Wachs ( $1048\text{ cm}^{-1}$ – $1077\text{ cm}^{-1}$ ) gezeigt wird. An den hellen Stellen ist die Raman-Intensität dieser Bande besonders hoch, was bedeutet, dass in der mikroskopischen Aufnahme die dunklen rauen Strukturen im linken Bereich viel Wachs enthalten. Die hellen glatten Bereiche unten rechts zeigen dagegen keinen bzw. nur einen geringen Wachsanteil. Ob diese Bereiche im Gegensatz dazu viel Propolis enthalten, kann Abb. 10.7 c entnommen werden. Hier ist die Verteilung der relativen Raman-Intensität eines Propolis-Spektrums dargestellt. Auch hier korrelieren die hellen Bereiche in der mikroskopischen Aufnahme mit einer hohen Raman-Intensität der Propolis-Markierungsbande ( $1669\text{ cm}^{-1}$ – $1655\text{ cm}^{-1}$ ). Das Falschfarbenbild zeigt die umgekehrte Situation zu der in der Abb. 10.7 b gezeigten. Die Konzentration an Propolis ist im unteren rechten Bereich der Probe hoch, wohingegen im oberen linken Bereich kein oder nur sehr wenig Propolis vorzuliegen scheint. Aufschluss darüber, welche Substanzen tatsächlich in diesen Bereichen vorhanden sind, erhält man, wenn man die Raman-Spektren bestimmter Positionen auf der Probe analysiert. In Abb. 10.8 sind zwei Einzelspektren A und B gezeigt, die aus den beiden unterschiedlichen Bereichen stammen und in Abb. 10.7 mit A und B markiert sind. Spektrum A zeigt sowohl Banden des Wachses, als auch Banden, die dem Propolis zugeordnet werden können. Dieser Teil der Probe enthält somit beide Komponenten. Spektrum B enthält überwiegend Propolis-Banden. Vom Wachs sind schwache Raman-Banden bei  $1296\text{ cm}^{-1}$ ,  $1172\text{ cm}^{-1}$ ,  $1130\text{ cm}^{-1}$  und  $1062\text{ cm}^{-1}$  erkennbar. In diesem Bereich der Probe scheint sehr wenig Wachs vorzuliegen.

Für die Verteilung des Propolis auf dem Wachs können daraus folgende Schlussfolgerungen gezogen werden. Das Propolis wird von den Bienen anscheinend so auf den oberen Wachsrand der Waben aufgebracht, dass es an den Randstellen, wo es in direkten Kontakt mit dem Wachs kommt, mit diesem vermischt wird. In Anschluss daran scheint immer mehr reines Propolis auf diese Mischung aufgebracht zu werden. An Stellen, an denen das Propolis sehr dick auf dem Wachs aufliegt, verringert sich der Wachsanteil zunehmend. Die hohe Ortsauflösung (der Fokus hat unter den hier verwendeten Messparametern einen Durchmesser von  $1,16\text{ }\mu\text{m}$  und eine Tiefe von  $6,68\text{ }\mu\text{m}$ ) gewährleistet, dass ein sehr kleines



**Abbildung 10.8:** Spektren an den in Abb. 10.7 mit A und B gekennzeichneten Positionen.

Probenvolumen je Raman-Spektrum analysiert wird und die Durchmischung der beiden Komponenten in diesem Volumenbereich liegt.

Erneut wird der Frage nachgegangen, ob Propolis generell einen großen Wachsanteil (in der Literatur wird von einem Anteil von bis zu 30 % gesprochen) enthält. Vergleicht man die Raman-Spektren von Propolis, das nicht auf den Waben, sondern an anderen Stellen des Stockes zum Abdichten verwendet wurde (Abb. 10.1 und 10.2), mit dem Mischspektrum A in der Abb. 10.8, das an einer Stelle auf den Stegen der Waben aufgenommen wurde, an der Wachs und Propolis durchmischt vorliegen, so können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden. Bei den reinen Propolisproben können keine Wachsbanden erkannt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass Propolis nur dann Wachs enthält, wenn es auf dem Wachs befestigt werden soll, wohingegen zum Abdichten des Stockes das reine Propolis verwendet wird. Unter Umständen wird bei Propolismangel auch Wachs zu

diesem Zweck verwendet. Ein 30 %iger Wachsanteil am Propolis, der in der Literatur angegeben ist, sagt jedoch nichts darüber aus, in welcher Form eine Durchmischung erfolgt. Die Ergebnisse der Mikro-Raman-spektroskopischen Messungen legen den Schluss nahe, dass die Durchmischung vor allem zur Verankerung des Propolis auf dem Wachs dient. Da an vielen Stellen auch reine Propolis-Spektren erhalten wurden, die sich kaum vom Harz der Pappel unterscheiden, wird davon ausgegangen, dass es nicht generell zu einer Durchmischung von Propolis und Wachs kommt.

Es wurden auch Schnitte durch die Waben angefertigt und an verschiedenen Positionen der Zellen Mikro-Raman-spektroskopische Aufnahmen gemacht. Es konnte jedoch kein Propolis in den Wänden der Zellen detektiert werden. Das Propolis scheint nur auf den oberen Rändern der Zellen zur Verstärkung aufgebracht zu sein und nicht – wie vermutet wurde – zur Verstärkung der Zellwände verwendet zu werden.

Als Schlussfolgerung kann man zusammenfassen, dass Propolis beim Bau der Waben eingesetzt wird, um die Stege der Wabenzellen zu verstärken. In Kapitel 8.1 wurden einige Hypothesen vorgestellt, die mögliche Gründe für den Einsatz von Propolis auf den Wabenstegen diskutieren. Nach Darchen und Chauvin verwenden die Bienen Propolis auf den Wabenrändern, um zu signalisieren, dass diese Wabe fertig gebaut ist. Da jedoch auch fertiggestellte Waben gefunden wurden, die keine Propolisschicht enthalten, kann diese Hypothese als nicht sehr wahrscheinlich angesehen werden. Als zweite Hypothese wurde diskutiert, dass die Propolisschicht auf den Waben die physikalischen Eigenschaften des Wachses beeinflusst, was sich wiederum auf die Vibrationsweiterleitung bei der Kommunikation der Bienen auswirkt. Um diese Hypothese weiter zu verstärken sollte die Propolisverteilung auf den gesamten Waben eines Stockes genau kartiert werden. Dann könnte man herausfinden, ob das Propolis vor allem auf den Tanzböden (Bereiche der Waben, auf denen die Tänze der Bienen zur Mitteilung von Richtung und Entfernung von Futterquellen erfolgen) gefunden wird, was diese Hypothese verstärken würde. Außerdem wäre es auch von Interesse, die Vibrationsweiterleitung von Schwingungen in den Waben mit und ohne Propolisschicht auf den Wabenstegen zu analysieren. Wenn sich hierbei Unterschiede zwischen den beiden Varianten ergeben würden, wäre dies eine weitere Bestätigung der

hier aufgestellten Hypothese.



# 11 Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden biologisch relevante Oberflächen untersucht, die in der Medizin bzw. in der Biologie eine wichtige Rolle spielen. Die Proteinadsorption auf Implantat-Oberflächen wurde charakterisiert, um wichtige Informationen über den Adsorptionsprozess zu erhalten. Das Fernziel hierbei ist, durch ein umfassendes Wissen über diesen für die Implantation wichtigen Schritt Biomaterialien mit möglichst hoher Gewebeverträglichkeit zu entwickeln. Die Verteilung von Propolis auf der Wachs-Oberfläche von Bienenwaben wurde untersucht, um mehr über dessen Nutzen, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist, zu erfahren und um auf mögliche Auswirkungen einer veränderten Wabenstruktur auf die Kommunikation der Honigbienen Rückschlüsse ziehen zu können.

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war, das Adsorptionsverhalten der Proteine Fibrinogen, Albumin und Fibronectin auf Titandioxid, einem in der Medizin häufig als Implantat eingesetzten Material, zu studieren. Die Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche von Implantaten ist ein wichtiger Schritt für die Gewebeverträglichkeit bzw. Biokompatibilität dieser Materialien.

Es wurden sowohl die räumliche Verteilung der Proteine auf den Implantat-Oberflächen als auch die durch die Adsorption hervorgerufenen strukturellen Veränderungen der Proteine untersucht.

Eine homogene Verteilung der Proteine auf der Implantat-Oberfläche ist wichtig, damit an allen Stellen des Implantats Zellen anwachsen können. Die meisten Untersuchungsmethoden (z.B. Bradford-Assay) liefern lediglich quantitative Aussagen über die Menge der

adsorbierten Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurden die Laser-Raster-Mikroskopie (LSM) und die Kraftfeldmikroskopie (AFM) eingesetzt, um die räumliche Verteilung von Fibrinogen, Albumin und Fibronectin auf Titandioxid-Oberfläche zu untersuchen.

LSM ist vor allen Dingen geeignet, große Oberflächenbereiche in kurzer Zeit abzubilden. Die Proteine wurden zu diesem Zweck mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Verteilung von Proteinen kann mit dieser Methode in drei Dimensionen gemessen werden. Ein z-Scan gibt die Verteilung der Fluoreszenzintensität der markierten Proteine in einer Messkammer, bestehend aus einem Deckglas, auf das ein Tropfen Proteinlösung pipettiert wurde und einem darauf platzierten Titan-Plättchen, wieder. Alle untersuchten Proteine lagern sich sowohl an die Titan-Oberfläche als auch an die Glas-Oberfläche an. Am Glas ist die Fluoreszenzintensität höher als am Titan, was auf die Sedimentation zurückzuführen ist. Dieser Effekt tritt auch auf, wenn anstelle des Titan-Plättchens ein zweites Deckglas in der Messkammer verwendet wird. Es wurde auch getestet, inwiefern sich die Proteinschicht auf den Titan-Oberflächen mit Pufferlösung abwaschen läßt. Alle drei Proteine bleiben an der Titan-Oberfläche haften und auch nach längerer Beobachtungszeit findet kein Übertritt der adsorbierten Proteine in frische Lösung und an eine saubere Glas-Oberfläche statt. Der reine Farbstoff Alexa wurde ebenfalls in der Messkammer untersucht. Bringt man Alexa-Lösung zwischen die beiden Oberflächen, so kommt es zu keiner Adsorption des reinen Farbstoffes und nach dem Abwaschen des Titan-Plättchens kann keine Fluoreszenz im System detektiert werden. Die Titan-Oberflächen wurden auch in xy-Richtung mit LSM untersucht. Es kann sowohl die Fluoreszenz der markierten Proteine als auch die Oberflächenmorphologie abgebildet werden. Man erkennt einzelne größere Proteincluster auf der Titan-Oberfläche. Ein Zusammenhang zwischen der Adsorption dieser Proteine und der Oberflächenmorphologie (z. B. bevorzugte Anlagerung der Proteine an bestimmten Kanten der Oberfläche) kann nicht festgestellt werden.

Die Auflösung bei der LSM ist durch das Abbe-Limit begrenzt und liegt somit in der Größenordnung der Anregungswellenlänge, also bei etwa 500 nm. Um eine Auflösung im Bereich weniger Nanometer zu erhalten, wurde die Kraftfeldmikroskopie angewendet. Ein Deckglas wurde mit Titan beschichtet und Proteine wurden darauf adsorbiert. Die Titan-



---

Schicht wurde so dünn aufgetragen, dass ein Laser diese Schicht passieren kann und von der Unterseite LSM-Messungen, von der Oberseite AFM-Messungen durchgeführt werden konnten. Auch in dieser Anordnung wurden Proteincluster beobachtet, deren Größe mittels AFM auf eine Höhe von 75 bis 95 nm und einen Durchmesser etwa 100 nm bestimmt wurden. Der Abstand zwischen den einzelnen Clustern beträgt etwa 100 nm.

AFM und LSM liefern Informationen über die Verteilung bzw. Größe von Proteinen auf der Oberfläche. Um Aussagen über die strukturelle Änderung der Proteine durch die Adsorption machen zu können wurden die CD-Spektroskopie und die Raman-Spektroskopie als Untersuchungsmethoden herangezogen.

Zunächst wurde mittels CD-Spektroskopie die Sekundärstruktur von Fibrinogen und Fibronectin charakterisiert. Fibrinogen weist demnach einen hohen Anteil an  $\alpha$ -helikaler-Struktur auf. Bei Fibronectin lassen die Spektren auf einen hohen Anteil an ungeordneter sowie einem geringen Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur schließen.

Es wurden Mikro-Raman-Spektren der auf Titandioxid-Nanopartikeln adsorbierten Proteinen Fibrinogen und Fibronectin aufgenommen und mit Raman-Spektren von reinen Proben dieser Proteine verglichen.

Eine leichte Verschiebung der Position der Amid-I-Bande in den Raman-Spektren zu höheren Wellenzahlen kann sowohl bei Fibrinogen als auch bei Fibronectin beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis für die in der Literatur beschriebene Änderung der Sekundärstruktur von der  $\alpha$ -helikalen zur  $\beta$ -Faltblatt-Struktur sein.

Die Adsorption verläuft über negativ geladene Seitenketten. Die Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure kommen dafür in Betracht. Das Verhältnis der Peakflächen der  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ -Deformationsmode, die von den Seitenketten stammt, zur Amid-I-Bande liegt für reines Fibronectin bei 2,62 und für auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln adsorbiertes Fibronectin bei 0,13. Beim Fibrinogen liegt das Verhältnis dieser Banden für reines Fibrinogen bei 0,30 und für auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln adsorbiertes Fibrinogen bei 0,19. Daraus läßt sich schließen, dass die Schwingungen der Seitenketten durch die Adsorption beeinflusst werden.

In den Spektren der auf  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln adsorbierten Proteine läßt sich eine Bande bei 1746 bzw. 1748  $\text{cm}^{-1}$  erkennen, die in den Spektren der reinen Proteine nicht erscheint. Diese Bande kann der C=O-Streckschwingung der monodentat adsorbierten Säuregruppe zugeordnet werden. Bei der protonierten Säuregruppe (dies ist bei reinen Proteinen bei einem pH-Wert von 2 der Fall) erscheint die C=O-Streckschwingung bei 1727  $\text{cm}^{-1}$  im Raman-Spektrum. Diese Bande ist also bei adsorbierten Proteinen um etwa 20  $\text{cm}^{-1}$  gegenüber Proteinen, die sich im sauren Milieu befinden, verschoben. Auch diese Ergebnisse deuten auf eine Adsorption der Proteine über die Seitenketten der Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure hin.

Durch ein umfassendes Wissen über den Adsorptionsprozess der Proteine auf Implantat-Materialien können die Oberflächen der Implantate dahingehend verändert werden, dass es zu einer besseren Proteinadsorption und dadurch zu einer noch geringeren Rate an Abstoßungsreaktionen kommt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse können einen Teil zum Verständnis des Adsorptionsprozesses beitragen.

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es, die chemische Zusammensetzung von Propolis (dem Kittharz der Bienen) und Wabenwachs von *Apis mellifera carnica* POLLM. sowie die räumliche Verteilung von Propolis auf den Waben-Oberflächen zu untersuchen. Hierzu wurden die Raman-Spektroskopie und Raman-*Mapping* eingesetzt.

Es wurden zunächst Raman-Spektren von Propolis-Proben sowie Raman-Spektren von charakteristischen Standardsubstanzen des Propolis aufgenommen. Das Propolis-Spektrum wurde durch eine Auswahl an Standardsubstanzen simuliert. Zum einen erfolgte die Simulation durch Spektrenaddition der Standardsubstanzen, zum anderen wurden die Standardsubstanzen reell gemischt (indem die Standardsubstanzen gelöst und das Lösungsmittel wieder abgedampft wurde). Von dieser Mischung wurden Raman-Spektren aufgenommen. Das Raman-Spektrum von Wachs wurde in gleicher Weise simuliert.

Die Übereinstimmung zwischen den simulierten Spektren mit den Propolis- bzw. Wachs-Spektren ist in beiden Fällen sehr gut. Die durch Mischen der Standardsubstanzen entstandenen Spektren ähneln den "echten" Spektren von Wachs und Propolis mehr, als die

---

durch Spektrenaddition simulierten Spektren. Die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen haben einen Einfluss auf die Bandenform in den Raman-Spektren. Die Wechselwirkungen, die hier eine Rolle spielen, sind van-der-Waals Wechselwirkungen.

Um herauszufinden, welche Harze von den Bienen gesammelt und als Propolis im Stock verwendet werden, wurden von einigen Harzen, die als Propolis-Quellen in Betracht kommen, Raman-Spektren aufgenommen. Vor allem das Harz der Schwarzpappel *Pupulus nigra* L. ist hier von Bedeutung. Das Spektrum ist dem Propolis-Spektrum sehr ähnlich. Die Harze von Rosskastanie *Aesculus hippocastanum* L., Birke *Betula pendula* L., Zwetschge *Prunus domestica* L. und Kiefer *Pinus nigra* L. scheinen dabei keine große Bedeutung zu haben, zumal sich das Harz der Kiefer aus anderen Komponenten zusammensetzt als die Harze der übrigen untersuchten Arten.

Es wurde auch analysiert, ob die Kettenlängen der Alkane, aus denen die Wachse bestehen, einen Einfluss auf die Raman-Spektren hat. Dazu wurden Spektren von Alkanen verschiedener Kettenlängen aufgenommen. Sowohl die Spektren des Wachses, als auch die Spektren der simulierten Wachse haben Kettenlängen, die in der gleichen Größenordnung liegen.

Mittels Raman-*Mapping* wurde schließlich die räumliche Verteilung von Propolis auf der Waben-Oberfläche untersucht. Es wurde ein Bereich auf den Stegen der Waben *abgescannt*, der sowohl Wachs als auch Propolis enthält. Das Propolis liegt dem Wachs oben auf. In den Randbereichen, in denen diese beiden Komponenten aufeinanderstoßen, werden Mischspektren erhalten, in denen sowohl Raman-Banden von Wachs als auch von Propolis vorhanden sind. Dies deutet auf eine Durchmischung der beiden Substanzen an der Phasengrenze Wachs/Propolis hin, die zur Befestigung des Propolis auf dem Wachs dient. Konfokale Messungen können das detektierte Volumen der Probe weiter einschränken und zu einer höheren Auflösung führen. Derartige Messungen wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Auf der Wachs-Oberfläche im Inneren der Wabenzellen konnte kein Propolis gefunden werden. Propolis, welches zu Desinfektionszwecken in den Wabenzellen verwendet wird,

scheint lediglich in einer sehr dünnen Schicht aufgetragen zu werden. Auch in den Waben selbst scheint kein Propolis vorhanden zu sein. Bei durch die Waben angefertigten Schnitten konnte kein Propolis gefunden werden.

Die reinen Propolisproben, die von den Bienen zum Abdichten des Stockes angebracht werden, wurden auf das Vorhandensein von Wachs untersucht. Hier konnten nur Propolis-Spektren und keine Wachs-Spektren bzw. Mischspektren aufgezeichnet werden. Das in der Literatur beschriebene Auftreten von größeren Mengen Wachs (bis zu einem Anteil von 30 %) im Propolis läßt sich wohl darauf zurückführen, dass bei der Probenentnahme z. T. auch Wachs mit abgekratzt wird, welches bei den Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Messungen mit detektiert wird. Durch die hohe Ortsauflösung der Raman-Spektroskopie konnte bestimmt werden, dass Propolis nicht generell Wachs enthält, sondern dass nur in bestimmten Bereichen auf der Wabe, wo Wachs und Propolis aneinander grenzen, eine Mischung von beiden Komponenten vorliegt.

Die hier charakterisierten biologisch relevanten Oberflächen spielen eine wichtige Rolle in der Medizin und in der Biologie. Die Analyse mit mikroskopischen und spektroskopischen Methoden verschafft einen Einblick in die Prozesse, die sich an diesen Oberflächen abspielen. Die Proteinadsorption auf Implantat-Oberflächen sind für die Implantationsmedizin von Bedeutung. Es werden ständig neue Materialien entwickelt, die eine möglichst gute Biokompatibilität aufweisen sollen. Erkenntnisse über die Prozesse, die hierfür eine Rolle spielen, helfen bei der Entwicklung neuer Materialien. Die Verteilung von Propolis auf den Wachs-Oberflächen hat einen Einfluss auf die Materialbeschaffenheit der Waben. Dies könnte die Vibrationsweiterleitung beim Schwänzeltanz der Honigbienen, der für deren Kommunikation von Bedeutung ist, beeinflussen. Die Verteilung des Propolis auf den Waben konnte für kleine Ausschnitte gezeigt werden. Inwiefern eine Propolisschicht auf den Stegen der Waben die Vibrationsweiterleitung tatsächlich beeinflusst, muss durch weiterführende Experimente herausgefunden werden.

## 12 Summary

In this work biologically relevant surfaces are investigated, which play an important role in medicine and biology, respectively. The protein adsorption on implant surfaces has been characterized in order to gain important information about the adsorption process. The future goal lies in the development of biomaterials with the highest possible tissue compatibility on the basis of an extensive knowledge about this step which is essential for the implantation. The distribution of propolis on the wax surface of honeycomb was studied to reveal information about its use, which is so far not fully known, and to draw conclusions if a changed honeycomb structure has any influence on the communication of honeybees.

The aim of the first part of this work was to study the adsorption behavior of the proteins fibrinogen, albumin and fibronectin on titanium dioxide, a commonly used implant material in medicine. The protein adsorption on an implant surface is an important process for the materia's tissue or biocompatibility.

The spatial distribution of the protein on the implant surfaces was studied as well as structural changes of the protein due to adsorption.

A homogenous protein distribution on the implant surface is important so that cells can grow on any position on the implant. Most investigation methods (e. g. Bradford assay) only give quantitative results about the amount of adsorbed protein. In this work laser scanning microscopy (LSM) and atomic force microscopy (AFM) were used to determine the spatial distribution of fibrinogen, albumin and fibronectin on a titanium dioxide

surface.

LSM is especially suited to generate an image of large surface areas in a short time. Therefore, the proteins were labeled with a fluorescence dye. The protein distribution can be measured in three dimensions with this method. A z-scan shows the distribution of the fluorescence intensity of the labeled proteins. The measurements were performed in a chamber consisting of a cover slide on which a drop of the protein solution is applied and a titanium platelet on top. All proteins under investigation settle on the titanium surface as well as on the glass surface. The fluorescence intensity is higher on the glass than on titanium, due to sedimentation. This effect occurs also when instead of a titanium platelet a second cover slide is used. Additionally, it has been investigated if the protein layer on the titanium surface can be washed off with a buffer solution. All three proteins stick on the titanium surface. Even after a longer observation time no transgression of adsorbed protein into a fresh solution or onto a clean glass surface takes place. The pure fluorescence dye Alexa was also studied. When Alexa solution is placed between the two surfaces no adsorption of the pure dye takes place and after rinsing the titanium platelet with buffer solution no fluorescence can be detected in the system. The titanium surface was also scanned in xy-direction with LSM. The fluorescence of the labeled proteins as well as the surface morphology can be monitored. Bigger protein clusters can be identified on the titanium surface. A correlation between the protein adsorption and the surface morphology (e. g. a preferred protein accumulation on certain edges of the surface) could not be determined with the LSM due to its insufficient resolution and the low structuring of the sample.

The LSM resolution is limited through the Abbe limit and is, therefore, in the order of the excitation wavelength at around 500 nm. To obtain a nanometer resolution the atomic force microscopy was employed. A cover slide was coated with titanium and proteins were adsorbed thereon. The titanium layer was prepared thin enough so that a laser can pass this layer and LSM measurements can be performed from below and AFM measurements from above. With this arrangement protein clusters were observed. Using AFM the size of the protein clusters were determined to a height of 75 to 95 nm and an diameter of about

---

100 nm. The distance between the single clusters was about 100 nm.

AFM and LSM give information about the distribution and size of the proteins on the surface. To obtain information about structural changes of the proteins due to the adsorption, CD and Raman spectroscopy have been applied as measurement techniques.

First of all the secondary structure of fibrinogen and fibronectin has been characterized by means of CD spectroscopy. The CD spectrum of fibrinogen exhibits a high amount of an  $\alpha$  helical structure. For fibronectin the spectra indicate a high share of random plus a small amount of  $\alpha$  helical structure.

Micro Raman spectra of fibrinogen and fibronectin adsorbed on titanium dioxide nanoparticles were recorded and compared with Raman spectra of the pure protein samples.

A small position shift of the amide-I-band to higher wavenumbers in the Raman spectra can be observed for fibrinogen as well as for fibronectin. This might be an indication for a change in the secondary structure from  $\alpha$  helical towards  $\beta$  sheet structure as described in the literature.

The adsorption proceeds via negatively charged side chains. Possible candidates might be the amino acids aspartic acid and glutamic acid. The peak area ratio of the amide I band versus the  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  deformation mode arising from the side chains is 2.62 for pure fibronectin and 0.13 for fibronectin adsorbed on  $\text{TiO}_2$  nanoparticles. The corresponded ratio for fibrinogen is 0.30 for the pure substance and 0.19 for the adsorbed species. For this it can be deduced, that the vibrations of the side chains are influenced by the adsorption.

The spectra of the proteins adsorbed on  $\text{TiO}_2$  nanoparticles show a band at  $1746\text{ cm}^{-1}$  and  $1748\text{ cm}^{-1}$ , respectively, which can't be seen in the spectra of the pure protein. This band can be assigned to the  $\text{C}=\text{O}$  stretching mode of the monodentate adsorbed acid group. The protonated acid group (for pure proteins this is the case at  $\text{pH}=2$ ) the  $\text{C}=\text{O}$  stretch mode is found at  $1727\text{ cm}^{-1}$  in the Raman spectrum. For adsorbed proteins this band is shifted about  $20\text{ cm}^{-1}$  compared to proteins in a acid environment. These results also indicate a protein adsorption via the side chains of the amino acids aspartic and glutamic acid.

With a profound knowledge about the adsorption process of proteins on implant materials the implant surfaces can be altered in such a way that a better protein adsorption takes place and the amount of repulsive reactions is lowered. The results presented in this work can contribute to a better understanding of such an adsorption process.

The goal of the second part of this work was the investigation of the chemical composition of propolis and of the honeycomb wax from the honeybee *Apis mellifera carnica* POLLM.. Furthermore the spatial distribution of propolis on the honeycomb surfaces was determined employing Raman spectroscopy and Raman mapping.

First of all Raman spectra of characteristic propolis samples and characteristic standard components of propolis have been recorded. The propolis spectrum was simulated through a selection of various standard components. In a first approach the spectra of the standard components were added. Second the standard components were mixed by solving the standard components and removing the solvent afterwards. Raman spectra of this mixture were recorded. The Raman spectrum of the wax was simulated in an analog way.

The simulated spectra are in good agreement with the actual propolis and wax spectra, respectively. Spectra from the mixed standard substances resemble the 'real' wax or propolis spectra more than the spectra obtained through a sample addition of the spectra of the standard components. Molecular interactions have an influence on the shape of the Raman bands. Here, van-der-Waals interactions are of importance.

To discover the kind of resins collected by the bees and used as propolis in the hive, Raman spectra of certain resins which can be considered as the propolis source were measured. Especially the resin of the black poplar *Pupulus nigra* L. is of importance and its spectrum resembles that of propolis very good. Resins of conker *Aesculus hippocastanum* L., birch *Betula pendula* L., damson *Prunus doméstica* L. and pine *Pinus nigra* L. seem to play a negligible role, especially as the pine resin is composed of different components as compared to the other resins under investigation.

Additionally, a possible influence of the chain length of the alkanes forming the waxes



---

on the Raman spectra was investigated. Therefore, spectra of alkanes with different chain lengths were measured. Wax spectra as well as the spectra of the simulated wax show chain lengths of same size.

The spatial resolution of propolis on the honeycomb surface has been studied by means of Raman mapping. The region of the ligament of the honeycomb was scanned as well as regions containing both wax and propolis. Propolis occurs on top of the wax. In border areas where both components are present, mixed spectra exhibiting Raman bands of both the wax as well as of propolis could be obtained. This indicates a mixing of both substances at the phase border wax/propolis, which serves as a fixation of propolis on the wax.

On wax surfaces in the inner part of the honeycomb cells no propolis was found. Propolis which is used for disinfection in the honeycomb cells seems just to be spread in a very thin layer. Even on the honeycomb itself no propolis could be obtained. Cuts through the honeycomb did not show any propolis.

Pure propolis samples which are used by the bees for sealing of the hive were investigated in order to find out if there is any wax present. Only propolis spectra and not wax or mixed spectra could be measured. The occurrence of higher amounts of wax in propolis (up to 30 %) might be ascribed to the mixing procedure itself. Wax might be partially scraped off during the sampling process and is then detected by the gaschromatographic-massspectrometric analysis. Due to the high spatial resolution of Raman spectroscopy it was possible to determine that propolis does not generally contain wax. Only certain regions on the honeycomb where wax and propolis lie next to each other exhibit a mixture of both components.

The biologically relevant surfaces characterized in this work play an important role in medicine and biology. The analysis employing microscopic and spectroscopic methods gives insight into the processes on the surface.

Protein adsorption on implant surfaces are important for implantation medicine. All the time new materials are developed with an improved biocompatibility. Knowledge about

the processes taking place are of relevance for the development of new materials.

The distribution of propolis on wax surfaces has an impact on the material condition of the honeycomb. This might be of interest for the vibration prolongation during the wagging dances of the honeybees, which is important for their communication. The propolis distribution on the honeycomb has been determined for some small sectors. In further experiments the role of the propolis layer on the ligaments of the honeycomb for the vibration prolongation needs to be investigated.

# Literaturverzeichnis

- [1] R. Wehner, W. Gehring (Hg.), *Zoologie*, Walter de Gruyter, Berlin (1984).
- [2] O. Dornblüth, W. Pschyrembel (Hg.), *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, Thieme-Verlag, Stuttgart (1990).
- [3] [http://www.umweltfibel.de/lexikon/l/lex\\_l\\_lotusblueteneffekt.htm](http://www.umweltfibel.de/lexikon/l/lex_l_lotusblueteneffekt.htm) (2003).
- [4] F. Grinnell, M. Milam, P. A. Spree, Attachment of normal and transformed hamster kidney cells to substrata varying in chemical composition, *Biochem. Med.* **7**, 87–90 (1973).
- [5] J. G. Steele, C. McFarland, B. J. Dalton, G. Johnson, M. D. Evans, C. R. Howlett, Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: The effect of surface chemistry upon initial cell attachment, *Biomater. Sci., Polym. Edn.* **5**, 245–257 (1993).
- [6] H. Kleinig, P. Sitte (Hg.), *Zellbiologie*, Fischer Verlag, Stuttgart, 2 Aufl. (1986).
- [7] J. M. Grunkemeier, W. B. Tsai, M. R. Alexander, D. G. Castner, T. A. Horbett, Platelet adhesion and procoagulant activity induced by contact with radiofrequency glow discharge polymers: roles of adsorbed fibrinogen and vWF, *J. Biomed. Mater. Res.* (2000), *51(4)*, 669–679. **51**, 669–679 (2000).
- [8] R. Urlaub, *Carbon- und Aminosäure-modifizierte Oberflächen von Werkstoffen für Implantate*, Dissertation, Universität Würzburg, Deutschland (1999).

- [9] M. Abe, CRC Press, Boca Raton, S. 161–273 (1982).
- [10] D. T. H. Wassell, G. Embery, Adsorption of bovine serum albumin onto titanium powder, *Biomaterials* **17**, 859–864 (1996).
- [11] A. Klinger, D. Steinberg, D. Kohave, M. N. Sela, Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research* **36**, 387–392 (1997).
- [12] J. E. Sundgren, P. Bodoie, I. Lundstroem, Auger electron spectroscopic studies of the interface between human tissue and implants of titanium and stainless steel, *Journal of Colloid Interface Science* **110**, 9–20 (1986).
- [13] D. McQueen, J. E. Sundgren, B. Ivarsson, I. Lundstroem, B. Ekenstam, A. Svensson, P. I. Braenemark, T. Albrektsson, Auger electron spectroscopic studies of titanium implants, *Adv. Biomater. (Clin. Appl. Biomater.)* **4**, 179–185 (1982).
- [14] G. Bernardi, T. Kawasaki, Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns, *Biochimica et Biophysica Acta* **160**, 301–310 (1968).
- [15] S. L. Vasin, I. B. Rosanova, V. I. Sevastianov, The role of proteins in the nucleation and formation of calcium-containing deposits on biomaterial surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research* **39**, 491–497 (1998).
- [16] C. Yongli, Z. Xiufang, G. Yandao, Z. Nanming, Z. Tingying, S. Xinqi, Conformational Changes of Fibrinogen Adsorption onto Hydroxyapatite and Titanium Oxide Nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science* **214**, 38–45 (1999).
- [17] T. J. Lenk, B. D. Ratner, R. M. Gendreau, K. K. Chittur, IR spectral changes of bovine serum albumin upon surface adsorption, *J. BIOMED. MATER. RES.* **23**, 549–569 (1989).
- [18] P. Schwinte, J.-C. Voegel, C. Picart, Y. Haikel, P. Schaaf, B. Szalontai, Stabilizing Effects of Various Polyelectrolyte Multilayer Films on the Structure of Adsorbed/Embedded Fibrinogen Molecules: An ATR-FTIR Study, *J. Phys. Chem. B* **105**, 11906–11916 (2001).

- [19] F. A. Husband, M. J. Garrood, A. R. Mackie, G. R. Burnett, P. J. Wilde, Adsorbed protein secondary and tertiary structures by circular dichroism and infrared spectroscopy with refractive index matched emulsions, *J. of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 859–866 (2001).
- [20] A. Bentaleb, A. Abele, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel, FTIR-ATR and Radiolabeling Study of Structural Modifications during Protein Adsorption on Hydrophilic Surfaces. 2. The Case of Apo-lactalbumine, *Langmuir* **15**, 4930–4933 (1999).
- [21] R. J. Jakobsen, F. M. Wasacz, Infrared Spectra-Structure Correlations and Adsorption Behavior for Helix Proteins, *Appl. Spec.* **9**.
- [22] A. T. Tu (Hg.), *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications*, John Wiley and Sons, New York (1982).
- [23] A. Desormeaux, J. E. Blochet, M. Pezolet, M. Didier, Amino acid sequence of a non-specific wheat phospholipid transfer protein and its conformation as revealed by infrared and Raman spectroscopy. Role of disulfide bridges and phospholipids in the stabilization of the helix structure, *Biochim. Biophys. Acta* **1121**, 137–152 (1992).
- [24] G. J. J. Thomas, New structural insights from Raman spectroscopy of proteins and their assemblies, *Biopolymers* **61**, 214–225 (2002).
- [25] K. von Frisch, Über die Sprache der Bienen, eine tierphysiologische Untersuchung, *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* **40**, 1–186 (1923).
- [26] K. von Frisch (Hg.), *Tanzsprache und Orientierung der Bienen*, Springer Verlag, Berlin (1965).
- [27] K. von Frisch (Hg.), *Aus dem Leben der Bienen*, Springer Verlag, Berlin (1993).
- [28] T. D. Seeley (Hg.), *Honigbienen: Im Mikrokosmos des Bienenstocks*, Birkhäuser Verlag, Basel (1997).
- [29] R. Darchen, *Traité de biologie de l'abeille* **2**, 241–331 (1968).

- [30] R. Chauvin, Le signal de reconstruction chez les abeilles: l' "esprit de la ruche" et les expériences de Darchen, *C. R. Acad. Sci. Paris* **314**, 361–363 (1992).
- [31] E. L. Ghisalberti, Propolis: A Review, *Bee world* **60**, 59–84 (1979).
- [32] Mc Marcucci, Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie* **26**, 83–99 (1995).
- [33] V. Dimov, N. Ivanovska, V. Bankova, N. Nikolov, S. Popov, Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of water-soluble derivate, *Vaccine* **10**, 817–823 (1992).
- [34] J. P. Pérez (Hg.), *Optik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1 Aufl. (1996).
- [35] W. E. Kalisch, T. Whitmore, A. Siegel, Laser scanning microscopy of surface spread polytene chromosomes, *Journal of Microscopy* **137**, 217–224 (1985).
- [36] R. E. Marchant, M. D. Barb, J. R. Shainoff, S. J. Eppell, Three-dimensional structure of human fibrinogen under aqueous conditions, *Thrombosis and Haemostasis* **77**, 1048–1051 (1997).
- [37] S. G. Lipson, H. S. Lipson, D. S. Tannhäuser (Hg.), *Optik*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 3 Aufl. (1995).
- [38] W. Schmidt (Hg.), *Optische Spektroskopie*, Wiley-VCH, Weinheim, 2 Aufl. (2000).
- [39] A. Smekal, *Naturwissenschaften* (1923).
- [40] C. V. Raman, *Nature* (1928).
- [41] W. Demtröder (Hg.), *Laser-Spektroskopie*, Springer-Verlag, Berlin, 3 Aufl. (1993).
- [42] H. Naumer, W. Heller (Hg.), *Untersuchungsmethoden in der Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 3 Aufl. (1996).
- [43] B. Schrader (Hg.), *Infrared and Raman Spectroscopy*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1 Aufl. (1995).
- [44] C. N. Banwell, E. M. McCash (Hg.), *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, McGraw-Hill Publishing Company, Berkshire, 4 Aufl. (1997).

- [45] B. Schrader, H. H. Klump, K. Schenzel, H. Schulz, Non-destructive NIR-FT-Raman analysis of plants, *J. Mol. Struct.* **509**, 201–212 (1999).
- [46] B. Schrader, H. Schulz, G. N. Andreev, H. H. Klump, J. Sawatzki, Non-destructive NIR-FT-Raman spectroscopy of plant and animal tissues, of food and works of art, *Talanta* **53**, 35–45 (2000).
- [47] G. J. Puppels, C. Otto, J. Greve, Confocal Raman microspectroscopy in biology: applications and future developments, *Trends Anal. Chem.* **10**, 249–253 (1991).
- [48] P. Dhamelinourt, *Raman Microscopy*, John Wiley and Sons, Chichester, Bd. 2, S. 1419–1428 (2002).
- [49] M. Delhaye, P. Dhamelinourt, Raman microprobe and microscope with laser excitation, *J. Raman Spectrosc.* **3**, 33–43 (1975).
- [50] P. Dhamelinourt, *Etude et Réalisation d'une Microsonde Moléculaire à Effect Raman - Quelques Domaines d'Application*, Dissertation, Université de Lille, France (1979).
- [51] P. Dhamelinourt, *Developements and Applications of the MOLE Laser Raman Microprobe*, San Fransisco Press, San Fransisco, S. 155–164 (1979).
- [52] [http://iser.urz.unibas.ch/SEM/konfokal/Konfokal\\_TextDemo.htm](http://iser.urz.unibas.ch/SEM/konfokal/Konfokal_TextDemo.htm) (2003).
- [53] J. G. White, W. B. Amos, M. Fordham, An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy., *Journal of Cell Biology* **105**, 4148 (1987).
- [54] T. Wilson, C. Sheppard (Hg.), *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy*, Academic Press, London, 3 Aufl. (1984).
- [55] R. Tabaksblat, R. Meier, J. Robert, B. J. Kip, Confocal Raman microspectroscopy: theory and application to thin polymer samples., *Applied Spectroscopy* **46**, 60–68 (1992).
- [56] *Confocal Laser Scanning Microscopy - Principles*, Zeiss (2002).

- [57] Molecular Probes, Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit, *Bestell-Nummer: A-10235*, *Instruction Booklet: BK10235* .
- [58] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).
- [59] [www.ikp.uni-stuttgart.de/allgemeines/abteilungen/PP/PP-Mo-AFM.html](http://www.ikp.uni-stuttgart.de/allgemeines/abteilungen/PP/PP-Mo-AFM.html) (2003).
- [60] W. C. Johnson, Jr., Proteins secondary structure and circular dichroism: A practical guide, *Proteins* **7**, 205–214 (1990).
- [61] W. C. Johnson, Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures, *Proteins* **35**, 307–312 (1999).
- [62] R. Petry, *Spektroskopische Strukturanalytik Synthetischer Polypeptide*, Dissertation, Universität Würzburg, Deutschland (2002).
- [63] M. Delhaye, P. Dhamelincourt, J. Barbillat, *J. Microbeam Anal.* **23**, 153–158 (1988).
- [64] W. Kiefer, *Raman-Spektroskopie*, Steinkopff Verlag, S. 117–147 (1995).
- [65] J. Barbillat, *Raman Imaging*, Academic Press, London, S. 175–200 (1996).
- [66] P. J. Treado, M. D. Morris, *Raman Infrared Chemical Imaging*, Marcell Dekker, New York (1993).
- [67] M. D. Schaeberle, H. R. Morris, J. F. Turner, P. J. Treado, Raman chemical imaging spectroscopy, *Analytical Chemistry* **71**, 175A – 181A (1999).
- [68] H. Lodisch, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. E. Darnell (Hg.), *Molekulare Zellbiologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 4 Aufl. (2001).
- [69] R. Winklbauer, C. Stoltz, Fibronectin fibril growth in the extracellular matrix of the *Xenopus* embryo, *Journal of Cell Science* **108**, 1575–1586 (1995).
- [70] K. D. Mörike, E. Betz (Hg.), *Biologie des Menschen*, Quelle & Meyer, Wiesbaden, 14 Aufl. (1997).
- [71] D. F. Williams, I. N. Askill, R. Smith, Protein adsorption and desorption phenomena on clean metal surfaces, *J Biomed Mater Res* **19**.



- [72] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, *Nature* **309**, 30–33 (1984).
- [73] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins, *Science* **238**, 491–497 (1987).
- [74] C. Naidet, M. Sémériva, K. M. Yamada, J. P. Thiery, Peptides containing the cell-attachment recognition signal Arg-Gly-Asp prevent gastrulation in *Drosophila* embryos, *Nature* **325**, 348–350 (1997).
- [75] R. O. Hynes, Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* **69**, 11–25 (1992).
- [76] E. Koivunen, B. Wang, E. Ruoslahti, Phage Libraries Displaying Cyclic Peptides with different Ring Sizes: Ligand Specificities of the RGD-Directed Integrins, *Biotechnology* **13**, 265–270 (1995).
- [77] S. Johansson, G. Svineng, K. Wennerberg, A. Armulik, L. Lohikangas, Fibronectin-Integrin Interactions, *Frontiers in Bioscience* **2**, D126–D146 (1997).
- [78] G. Altankov, V. Thom, T. Groth, K. Jankova, G. Jonsson, M. Ulbricht, Modulating the biocompatibility of polymer surfaces with poly(ethylene glycol): Effect of fibronectin, *J Biomed Mater Res* **52**, 219–230 (2000).
- [79] B. K. Mann, A. T. Tsai, T. Scott-Burden, J. L. West, Modification of surface with cell adhesion peptides alters extracellular matrix deposition, *Biomaterials* **20**.
- [80] [www.deutschetitan.de/ger/profi/kb33.html](http://www.deutschetitan.de/ger/profi/kb33.html) (2002).
- [81] [www.barmenia-medline.de/barmenia/koerper/KOERPER/gewebe-1.html](http://www.barmenia-medline.de/barmenia/koerper/KOERPER/gewebe-1.html) (2003).
- [82] R. Thull, Implantat und Körper müssen harmonieren, *Blick, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg* **1**, 88–94 (1998).
- [83] [www.rheuma-info.de/offen/anatomie/Knochengewebe/text.html](http://www.rheuma-info.de/offen/anatomie/Knochengewebe/text.html) (2003).
- [84] S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif, *Trends in Biochemical Sciences* **16**, 246–250 (1991).

- [85] A. L. Main, T. S. Harvey, M. Baron, J. Boyd, I. D. Campbell, The Three-dimensional Structure of the Tenth Type III Module of Fibronectin: an Insight into RGD-mediated Interactions, *Cell* **71**, 671–678 (1992).
- [86] P. I. Branemark, R. Adell, U. Breine, B. O. Hansson, J. Lindstrom, A. Ohlsson, Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **3**, 81–100 (1969).
- [87] P. I. Branemark, B. O. Hansson, R. Adell, U. Breine, J. Lindstrom, O. Hallen, A. Ohman, Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **16**, 1–32 (1977).
- [88] P. Tengvall, I. Lundström, Physicochemical considerations of titanium as a biomaterial, *J Clin Mater* **9**, 115–134 (1992).
- [89] B. Wälivaara, B.-O. Aronsson, M. Rodahl, J. Lausmaa, P. Tengvall, Titanium with different oxides: in vitro studies of protein adsorption and contact activation, *Biomaterials* **15**, 827–834 (1994).
- [90] Y. Okazaki, T. Tateishi, Y. Ito, *Mater. Trans.* **38**, 78 (1997).
- [91] Y. Okazaki, S. Rao, Y. Ito, T. Tateishi, Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new Ti alloys without Al and V, *Biomaterials* **19**, 1197–1215 (1998).
- [92] J. F. McAleer, L. M. Peter, Instability of anodic oxide films on titanium, *J. Electrochem. Soc.* **129**, 1252 (1982).
- [93] J. E. Ellingsen, A study on the mechanism of protein adsorption to titanium dioxide, *Biomaterials* **12**, 593–596 (1991).
- [94] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox (Hg.), *Prinzipien der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin (1998).
- [95] J. J. Ramsden, Experimental methods for investigating protein adsorption kinetics at surfaces, *Quarterly Reviews of Biophysics* **27**, 41–104 (1993).

- [96] V. Hlady, C. H. Ho, D. W. Britt, Quantitative analysis of protein adsorption kinetics, *Surfactant Science Series* **88**, 405–418 (2000).
- [97] J. J. Ramsden, *J Stat Phys* **73**, 853–877 (1993).
- [98] P. Francois, P. Vaudaux, M. Taborelli, M. Tonetti, D. P. Lew, P. Descouts, Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (II) Adsorption isotherms and biological activity of immobilized fibronectin, *Clinical Oral Implants Research* **8**, 217–225 (1997).
- [99] M. Könönen, M. Hormia, J. Kivilahti, J. Hautaniemi, I. Thesleff, Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium, *J Biomed Mat Res* **26**, 1325–41 (1992).
- [100] J. Vesenka, C. Mosher, S. Schaus, L. Ambrosio, E. Henderson, Combining optical and atomic force microscopy for life sciences research, *BioTechniques* **19**, 240–246 (1995).
- [101] L. A. Kolodny, D. M. Willard, L. L. Carillo, M. W. Nelson, A. Van Orden, Spatially correlated fluorescence/AFM of individual nanosized particles and biomolecules, *Analytical Chemistry* **73**, 1959–1966 (2001).
- [102] S. Döpner, F. Müller, P. Hildebrandt, R. T. Müller, Integration of metallic endoprostheses in dog femur studied by near-infrared Fourier-transform Raman microscopy, *Biomaterials* **23**, 1337–1345 (2002).
- [103] T. E. Creighton (Hg.), *Proteins: Structures and Molecular Properties*, Freeman, New York, 4 Aufl. (1992).
- [104] W. Groß, D. Ring, E. Lodemann (Hg.), *Physiologische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1 Aufl. (1989).
- [105] H. Zeng, K. K. Chittur, W. R. Lacefield, Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces, *Biomaterials* **20**, 377–384 (1999).

- [106] J. Buijs, W. Norde, W. T. Lichtenbelt, Changes in the Secondary Structure of Adsorbed IgG and F(ab')<sub>2</sub> Studied by FTIR Spectroscopy, *Langmuir* **12**.
- [107] L. J. Koenig, Raman spectroscopy of biological molecules. Review, *J Polymer Science Part D* **6**, 59–177 (1972).
- [108] S. U. Sane, S. M. C. T. M. Przybycien, A Holistic Approach to Protein Secondary Structure Characterization Using Amide I Band Raman Spectroscopy, *Analytical Biochemistry* **296**, 255–272 (1999).
- [109] S. A. Overman, G. J. J. Thomas, Raman Markers of Nonaromatic Side Chains in an alpha-Helix Assembly: Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, and Val Residues of Phage fd Subunits, *Biochemistry* **38**, 4018–4027 (1999).
- [110] J. T. Pelton, L. R. McLean, Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure, *Analytical Biochemistry* **277**, 167–176 (2000).
- [111] M. Schöller, A. Hauck, R. Thull, R. Steinmeyer, R. Hedrich, F. W. Schneider, W. Kiefer, J. Popp, Laser Scanning Microscopy Study on Adsorption of Biologically Relevant Proteins on Implant Materials, *Biopolymers* **67**, 344–348 (2002).
- [112] M. Benes, J. Hudneczek, P. Anzenbacher, M. Hof, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **66**, 855–869 (2001).
- [113] M. A. Strehle, M. Gerunda, V. Deckert, A. Hauck, R. Thull, W. Kiefer, J. Popp, Investigation of the spatial distribution of fibrinogen adsorbed on implant materials, *in Vorbereitung* .
- [114] M. A. Strehle, A. Hauck, R. Thull, W. Kiefer, J. Popp, A Raman Spectroscopic Study of the Adsorption of Biologically Relevant Proteins on Titanium Dioxide Nanoparticles, *in Vorbereitung* .
- [115] L. Stryer (Hg.), *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Oxford (1999).
- [116] [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/), *Protein Data Bank* (2002).
- [117] Z. Yang, I. Mochalkin, L. Veerapandian, M. Riley, R. F. Doolittle, Crystal Structure

- of Native Chicken Fibrinogen at 5.5-Å Resolution, *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* **97**, 3907 (2000).
- [118] M. A. Strehle, F. Jenke, B. Fröhlich, J. Tautz, M. Riederer, W. Kiefer, J. Popp, Raman Spectroscopic Study Spatial Distribution of Propolis in Comb of *Apis mellifera carnica* (Pollm.), *Biopolymers, im Druck* .
- [119] S. P. S. Porto, P. A. Fleury, T. C. Damen, Raman spectra of titanium oxide, magnesium fluoride, zinc fluoride, ferrous fluoride, and manganese fluoride, *Physical Review* **154**, 522–526 (1967).
- [120] R. J. Capwell, F. Spagnolo, M. A. DeSesa, Rapid determination of low concentrations of anatase in rutile titanium dioxide pigments by Raman spectroscopy, *Applied Spectroscopy* **26**, 537–539 (1972).
- [121] F. S. Parker (Hg.), *Applications of Infrared, Raman and Resonance Raman Spectroscopy*, Plenum Press, New York (1983).
- [122] K. Peter, C. Vollhardt (Hg.), *Organische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1 Aufl. (1990).
- [123] S. Doeuff, M. Henry, C. Sanchez, J. Livage, Hydrolysis of Titanium Alkoxides: Modification of the Molecular Precursor by Acetic Acid, *Journal of Non-Crystalline Solids* **89**, 206–216 (1987).
- [124] K. Nakamoto (Hg.), *Infrared and Raman spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley, New York, 3 Aufl. (1978).
- [125] D. Lin-Vien, N. B. Coulthup, W. G. Fateley, J. G. Grasselli (Hg.), *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, Boston (1991).
- [126] H. E. Esch, S. Zhang, M. V. Srinivasan, J. Tautz, Honeybee dances communicate distances measured by optic flow, *Nature* **411**, 581–583 (2001).
- [127] G. Sherman, P. K. Visscher, Honeybee colonies achieve fitness through dancing, *Nature* **419**, 920–922 (2002).

- [128] J. C. Nieh, J. Tautz, Selective blocking of contact chemosensilla in *Apis mellifera*, *J. Eyp. Biol.* **230**, 1573–1579 (2000).
- [129] R. Menzel, U. Müller, Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates, *Annual Review of Neuroscience* **19**, 379–404 (1996).
- [130] D. Sandeman, J. Tautz, M. Lindauer, Transmission of vibration across honeycombs and its detection by bee leg receptors, *J. Exp. Biol.* **199**, 2585–2594 (1996).
- [131] H. G. M. Edwards, M. J. P. Falk, Fourier-transform Raman spectroscopic study of unsaturated and saturated waxes, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **53A**, 2685–2694 (1997).
- [132] H. G. M. Edwards, D. W. Farwell, L. Daffner, Fourier-transform Raman spectroscopic study of natural waxes and resins, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **52A**, 1639–1648 (1996).
- [133] L. F. C. De Oliveira, R. Colombara, H. G. M. Edwards, *Appl. Spectrosc.* **56**, 306–311 (2002).
- [134] P. J. Treado, M. P. Nelson, *Raman Microscopy*, John Wiley and Sons, Chichester, Bd. 2, S. 1429–1459 (2002).
- [135] M. Bowden, N. M. Dixon, D. J. Gardiner, S. F. Carter, Raman microscopic analysis of gaseous and solid inclusions in fluoride glass optical fibers, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* **1**, 34–38 (1990).
- [136] K. R. Markham, HPLC and GC/MS of the major organic constituents in New Zealand propolis, *Phytochemistry* **42**, 205–211 (1996).
- [137] V. Bankova, A. Dyulgerov, S. Popov, N. Marekov, A GC/MS Study of Propolis Phenolic Constituents, *Z. Naturforsch.* **42**.
- [138] W. Greenaway, S. Englisch, F. R. Whatley, Variation in Bud Exudate Composition of *Populus nigra* Assessed by Gas-Chromatography-Mass spectrometry, *Z. Naturforsch.* **45**.

- [139] C. Garcia-Viguera, W. Greenaway, F. R. Whatley, Composition of Propolis from Two Different Spanish Regions, *Z. Naturforsch.* **47C**, 634–637 (1992).
- [140] V. Bankova, R. Christov, S. Popov, Volatile Constituents of Propolis, *Z. Naturforsch.* **49**.
- [141] A. G. Hegazi, F. K. Abd El Hady, F. A. M. Abd Allah, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis, *Z. Naturforsch.* **55c**, 70–75 (2000).
- [142] V. Bankova, S. Popov, L. Marekov, High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Flavonoids from Propolis, *J. of Chromatography* **242**, 135–143 (1982).
- [143] M. Vanhaelen, R. Vanhaelen-Fastré, High-performance liquid, gas-liquid and thin-layer chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds, *J. of Chromatography* **187**, 255–260 (1980).
- [144] W. Meyer, “Propolis bees” and their activities, *Bee world* **37**, 25–36 (1956).
- [145] W. Greenaway, T. Scaysbrook, F. R. Whatley, Identification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of 150 Compounds in Propolis, *Z. Naturforsch.* **46c**, 111–121 (1991).
- [146] A. Nicolas, Cire d’abeilles et propolis, *Nancy: Thomas* S. 141–142 (1947).
- [147] W. Brummfit, J. T. M. H. Miller, I. Franklin, *J. Microbios* **62**, 19–22 (1990).
- [148] B. König, J. H. Dustmann, Baumharze, Bienen und antivirale Chemotherapie, *Naturwissenschaftliche Rundschau* **41**, 43–53 (1988).
- [149] S. A. B. E. van Acker, M. J. de Groot, D.-J. van den Berg, M. N. J. L. Tromp, G. D.-O. den Kelder, W. J. F. van der Vijgh, A. Bast, A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids, *Chem. Rev. Toxicol.* **9**, 1305–1312 (1996).
- [150] E. Debuyser, *La Propolis*, Dissertation, Université de Nantes, France (1983).
- [151] [www.geocites.com/bienenprodukte/hauptteil\\_propolis\\_zusammensetzung.html](http://www.geocites.com/bienenprodukte/hauptteil_propolis_zusammensetzung.html) (2002).

- [152] W. Greenaway, J. May, T. Scaysbrook, F. R. Whatley, The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis by gas chromatography-mass spectrometry, *Proc. R. Soc. Lond. B* **232**, 249–272 (1987).
- [153] B. Kedzia, E. Holderna-Kedzia, Chemical composition of propolis in up-to-date studies, *Herba Polonica* **37**, 95–110 (1991).
- [154] E. Wollenweber, Y. Asakawa, D. Schillo, U. Lehmann, H. Weigel, A novel caffeic acid derivate and other constituents of *Populus* bud exudate, *Z. Naturforsch.* **42c**, 1030–1034 (1987).
- [155] V. Bankova, A. Dyulgerov, S. Popov, L. Evstatieva, L. Kuleva, O. Pureb, Z. Zamjan-zan, Propolis in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin, *Apidologie* **23**, 79–85 (1992).
- [156] J. S. Bonhevi, C. F. Ventura, J. R. Escola, The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics, *J Aoccs.* **71**, 529–532 (1994).
- [157] B. Fugmann (Hg.), *Römpp Lexikon, Naturstoffe*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997).
- [158] D. O. Foster, D. F. Zinkel, Qualitative and quantitative analysis of diterpene resin acids by glass capillary gas-liquid chromatography, *J. Chromatogr.* **248**, 89–98 (1982).
- [159] D. F. Zinkel, Pine resin acids as chemotaxonomic and genetic indicators., *Tappi Forest Biology Wood Chemistry Conference, Atlanta. Georgia* S. 53–56 (1977).
- [160] B. Fröhlich, J. Tautz, M. Riederer, Chemometric Classification of Comb and Cuticular Waxes of the Honeybee *Apis mellifera carnica*, *Journal of Chemical Ecology* **26**, 123–137 (2000).
- [161] H. R. Hepburn, *Composition and Synthesis of beewax*, Springer Verlag, Berlin, S. 44–46 (1986).
- [162] J. S. Bruckner, *Cuticular polar lipids of insects*, University of Nebraska Press, Lincoln, S. 227–270 (1993).



- [163] K. R. Hepburn (Hg.), *Honeybees and Wax. An Experimental Natural History*, Springer Verlag, Berlin (1986).
- [164] L. Dreyling, Über die wachsverarbeitenden Organe der Honigbiene, *Zool. Anz.* **26**, 710–715 (1903).
- [165] K. Weiss, Über den Zuckerverbrauch und die Beanspruchung der Bienen bei der Wachserzeugung, *Z. Bienenforschung* **8**, 106–124 (1965).
- [166] W. Rauh, K. Senghas (Hg.), *Schmeil, Fitschen, Flora von Deutschland und seinen angrenzenden Gebieten*, Quelle und Meyer, Heidelberg, 87 Aufl. (1982).
- [167] F. R. Dollish, W. G. Fateley, F. F. Bentley (Hg.), *Applications of Infrared, Raman and Resonance Raman Spectroscopy*, John Wiley and Sons, New York (1974).
- [168] Urban, Schwarzenberg (Hg.), *Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie* (1985).
- [169] Mark (Hg.), *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* (1985).



# Abkürzungen und Symbole

|         |   |
|---------|---|
| AFM     | <i>atomic force microscopy</i> (Kraftfeldmikroskopie)                                 |
| AC      | Gleichstrom   |
| ATR     | <i>attenuated total reflection</i>  |
| CCD     | <i>charge coupled device</i> (Detektor)   |
| CD      | <i>circular dichroism</i> (Circulardichroismus)                                       |
| FCS     | <i>fluorescence correlation spectroscopy</i> (Fluoreszenz–Korrelations–Spektroskopie) |
| FTIR    | <i>fourier transform infrared spectroscopy</i>  |
| HPLC    | <i>high performance liquid chromatography</i> (Hochflüssigkeitschromatographie)       |
| IR      | <i>infrared spectroscopy</i>  |
| kD      | kilo Dalton   |
| L.      | Linné   |
| GC-MS   | Gaschromatographie–Massenspektrometrie  |
| LSM     | <i>laser scanning microscopy</i> (Laser-Raster-Mikroskopie)                           |
| NA      | Numerische Apertur  |
| PBS     | <i>phosphate buffer saline</i>  |
| PDB     | <i>Protein Data Bank</i> (Proteindatenbank in der Schweiz)                            |
| POLL.M. | Pollmann  |
| PVD     | <i>physical vapour deposition</i>   |
| RGD     | Aminosäuresequenz Arg–Gly–Asp   |

TIC *total ion current*

UV ultraviolett

### Kennzeichnung von Schwingungen

|          |                    |    |                             |
|----------|--------------------|----|-----------------------------|
| $\delta$ | <i>deformation</i> | as | antisymmetrisch (als Index) |
| $\nu$    | <i>stretching</i>  | ip | <i>in plane</i>             |
| $\rho$   | <i>rocking</i>     | m  | <i>medium</i>               |
| $\tau$   | <i>twisting</i>    | op | <i>out of plane</i>         |
| $\omega$ | <i>wagging</i>     | s  | <i>strong</i>               |
|          |                    | sh | <i>shoulder</i>             |
|          |                    | v  | <i>very</i>                 |
|          |                    | w  | <i>weak</i>                 |

### Aminosäuren

|   |     |                |   |     |              |
|---|-----|----------------|---|-----|--------------|
| A | Ala | Alanin         | L | Leu | Leucin       |
| R | Arg | Arginin        | K | Lys | Lysin        |
| N | Asn | Asparagin      | M | Met | Methionin    |
| D | Asp | Asparaginsäure | F | Phe | Phenylalanin |
| C | Cys | Cystein        | P | Pro | Prolin       |
| Q | Gln | Glutamin       | S | Ser | Serin        |
| E | Glu | Glutaminsäure  | T | Thr | Threonin     |
| G | Gly | Glycin         | W | Trp | Tryptophan   |
| H | His | Histidin       | Y | Tyr | Tyrosin      |
| I | Ile | Isoleucin      | V | Val | Valin        |

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden oder werden veröffentlicht:**

M. Schöller, A. Hauck, R. Thull, R. Steinmeyer, R. Hedrich, F.W. Schneider, W. Kiefer, J. Popp, Laser Scanning Microscopy Study on Adsorption of Biologically Relevant Proteins on Implant Materials, *Biospectroscopy* **67**, 344-348 (2002).

M. A. Strehle, F. Jenke, B. Fröhlich, J. Tautz, M. Riederer, W. Kiefer, J. Popp, Raman Spectroscopic Study of Spatial Distribution of Propolis in Comb of *Apis mellifera carnica* (Pollm.), *Biospectroscopy*, im Druck.

M. A. Strehle, V. Deckert, M. Gerunda, A. Hauck, R. Thull, W. Kiefer, J. Popp, The Adsorption of Proteins on Implantat Materials investigated by a coupled AFM–LSM Study, in Vorbereitung.

M. A. Strehle, A. Hauck, R. Thull, W. Kiefer, J. Popp, A Raman Spektroskopische Study of the Adsorption of Biologically Relevant Proteins on Titanium Dioxide Nanoparticles, in Vorbereitung.

**Tagungsbeiträge:**

M. Schöller, P. Meuer, R. Thull, W. Kiefer, J. Popp, Raman Spectroscopic Investigations of Biological Relevant Oligopeptides, Proceedings of the XVIIth International Conference on Raman Spectroscopy, S. L. Zhang and B. F. Zhu, Editors, John Wiley & Sons, Chichester, August 2000, 942-943.

M. Schöller, A. Hauck, R. Thull, R. Steinmeyer, R. Hedrich, W. Kiefer, J. Popp, A Study on the Adsorption of Biological Relevant Proteins on Implantat Materials by Laser

Scanning Microscopy ,9th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM2001), Prag, Tschechische Republik, 08.–13.09.2001.

M. Schöller, B. Fröhlich, J. Tautz, M. Riederer, W. Kiefer and J. Popp, Eine Raman-spektroskopische Analyse der räumlichen Verteilung von Propolis in den Waben von *Apis mellifera carnica* POLLM., GDCh-Jahrestagung Chemie (2001), Würzburg, Deutschland, 23.–29.09.2001.

M. Schöller, A. Hauck, R. Thull, W. Kiefer and J. Popp, A Raman Spectroscopic Study of the Adsorption of biologically relevant Proteins on titanium dioxide nanoparticles, Proc. XVIIIth International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2002), Budapest, Ungarn, 25.–30.08.2002.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt zunächst Prof. Jürgen Popp für die gute Betreuung meiner Doktorarbeit. Bei Problemen konnte ich mich jederzeit an ihn wenden. Sehr geholfen haben mir auch die vielen fruchtbaren Diskussionen der Ergebnisse.

Desweiteren bedanke ich mich bei Prof. Wolfgang Kiefer für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Vergabe des interessanten Protein-Themas und die Unterstützung bei meiner Doktorarbeit.

Bei beiden bedanke mich auch dafür, dass ich an vielen nationalen und internationalen Tagungen teilnehmen durfte.

Vielen Dank auch an Prof. Jürgen Tautz. Die Begeisterung für die Bienen, die ich bei meiner Zulassungsarbeit durch ihn erfahren durfte, hat mich seither nicht mehr losgelassen. Ich bedanke mich für unsere gute Zusammenarbeit, die wir auch im Rahmen meiner Doktorarbeit fortgesetzt haben.

Bei unserer Sekretärin Frau Müller, den Laborantinnen Belinda Leimeister und Melanie Grom sowie der Feinmechanik- und der Elektronik-Werkstatt des Institutes für Physikalische Chemie in Würzburg sowie bei Frau Rummel und Frau Friedlein von der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg und bei Frau Schwark vom Physikalischen Institut der Universität Würzburg und Imkermeister Demmel vom Zoologischen Institut der Universität Würzburg bedanke ich mich für die technische Unterstützung und die freundliche Atmosphäre.

Meinen Zimmerkollegen in Würzburg, Ralph Geßner, Petra Rösch und Petra Meuer, sowie Ioana Pavel, Adriana Szeghalmi, Damien Moigno, den “Femtos” und allen anderen Kolleginnen und Kollegen danke ich recht herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schönen Erlebnisse auf den Tagungen. Es war immer sehr lustig mit der “Reisegruppe”.

Dr. Michael Schmitt und Dr. Renate Petry danke ich für sprachliche Hilfestellung beim Verfassen der Veröffentlichungen in englischer Sprache.

Die vielfältige Beleuchtung meiner beiden Themengebiete wäre ohne wissenschaftliche Kooperationen nicht möglich gewesen.

Dr. Angela Hauck danke ich recht herzlich für die Diskussionen über Implantate und dafür, dass ich durch sie einige Einblicke in die Zellbiologie erhalten habe. Prof. Roger Thull danke ich dafür, dass ich die Geräte in der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg nutzen durfte. Dr. Jan Bieschke vom MPI in Göttingen danke ich dafür, dass er mich in die Geheimnisse des Labelns der Proteine eingeführt hat. Ralf Steinmeyer vom Botanischen Institut der Universität Würzburg und Prof. R. Hedrich danke ich für die Hilfestellungen und die Erlaubnis zur Benutzung des LSM. Prof. F. Schneider vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Würzburg danke ich dafür, dass ich das FCS nutzen durfte. Prof. Martin Hof sowie Angelika Häfner danke ich für die Diskussionen über FCS an Proteinen. Dr. Volker Deckert danke ich dafür, dass ich an der ETH Zürich die LSM–AFM–Messungen durchführen konnte. Gemeinsam mit Mimmo Gerunda wurden auch Tip–Sers–Messungen an den adsorbierten Proteinen getestet. Mimmo danke ich für die nette Gesellschaft und die Hilfe bei den Marathon–Messungen bis in die tiefe Nacht hinein. Michael Dreyer (Arbeitskreis Prof. Dr. Bringmann, Universität Würzburg) danke ich für die CD–Messungen. Dr. Birgit Fröhlich vom Botanischen Institut der Universität Würzburg danke ich für die Zusammenarbeit am Propolis–Thema. Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Reinhard Jetter für die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung der GC–MS Untersuchungen in der Diplomarbeit von Anke Pokolm. Meiner F–Praktikantin Franziska Jenke danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Raman–spektroskopischen Untersuchung der Bienenwaben.

In Jena danke ich den Sekretärinnen Frau Zeise und Frau Krause sowie Renate Petry, Petra Rösch, Ute Uhlemann, Ute Neugebauer, Torsten Frosch, Susanne Liedtke, Antje Kriltz, Thomas Mayerhöfer, Beate Truckenbrodt, Marion Ludwig, Dirk Bender und allen anderen neuen Kolleginnen und Kollegen recht herzlich für die freundliche Aufnahme am Institut für Physikalische Chemie. Dies hat mir den Abschied von Würzburg etwas leichter gemacht.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und mich auch sonst immer in allen Lebenslagen unterstützen.

Meinem Mann Markus danke ich für die motivierende Unterstützung, die mir seit der Schulzeit immer wieder geholfen hat, alle schwierigen Situationen zu meistern. Ich weiß nicht, ob ich ohne Dich so weit gekommen wäre.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Marion Anne Strehle (geb. Schöller)  
Wohnort: Breite Straße 18, 07749 Jena  
geboren am: 06. Februar 1973 in Werneck

## Schulbildung:

1979 - 1983 Grundschule in Hambach  
1983 - 1984 Hauptschule in Dittelbrunn  
1984 - 1993 Olympia–Morata–Gymnasium in Schweinfurt  
1993 Allgemeine Hochschulreife

## Studium:

11/1993 - 06/1999 Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an  
Gymnasien an der Universität Würzburg  
05/1998 Auslandspraktikum am Lehrstuhl von Prof. Jérôme Casas  
an der Université Francois Rabelais Tours / Frankreich  
19. Juni 1999 Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien  
09/1999 Beginn des Promotionsstudiums in Physikalischer Chemie  
am Lehrstuhl von Prof. Dr. W. Kiefer  
in der Arbeitsgruppe von PD Dr. J. Popp  
an der Julius–Maximilians–Universität Würzburg  
04/2002 Fortsetzung des Promotionsstudiums in Physikalischer  
Chemie am Lehrstuhl von Prof. Dr. J. Popp  
an der Friedrich–Schiller–Universität Jena

## Berufsweg:

09/1999 - 03/2002 Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Würzburg  
seit 04/2002 Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Jena

